



**Universidad de Concepción
Facultad de Ciencias Biológicas**

**PARTICIPACIÓN DE LA LIBERACIÓN VESICULAR
DE ATP Y GLUTAMATO DURANTE LA
NEURULACIÓN Y SUS IMPLICACIONES EN LA
INDUCCIÓN DE DEFECTOS DEL TUBO NEURAL**

NICOLÁS ANTONIO FUENTES CIFUENTES

Tesis de Magíster presentada a la Dirección de Postgrado de la
Universidad de Concepción como parte de los requisitos para
optar al Grado de Magíster en Neurobiología

Por

Nicolás Antonio Fuentes Cifuentes

DICIEMBRE, 2025

Concepción, Chile

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

© 2025, NICOLÁS ANTONIO FUENTES CIFUENTES

Este trabajo está dedicado a mi familia, en especial a mi padre y a mi madre,
por su apoyo incondicional a lo largo de toda mi formación profesional.

AGRADECIMIENTOS

Al finalizar este trabajo, quisiera agradecer a todos quienes hicieron posible su desarrollo:

En primer lugar, quisiera agradecer al Dr. Patricio Castro por permitirme realizar este trabajo en el Laboratorio de Fisiología y Farmacología para el Desarrollo Neural (LAND), bajo su guía y consejos valiosos que me han permitido crecer tanto profesional como académicamente.

A las Dras. Marcela Torrejón, Nery Jara y Laura Borodinsky, miembros de la comisión evaluadora, por su tiempo y buena disposición para generar la retroalimentación necesaria que me ha permitido finalizar con éxito este trabajo.

A mis compañeros de laboratorio: Claudio, Ángel y Gloria, gracias por su colaboración y grato ambiente de trabajo brindado durante esta etapa de mi formación profesional.

A mis compañeras del Magíster en Neurobiología: Berni y Vicky, por su apoyo y compañerismo.

Agradezco inmensamente a mi familia por su apoyo incondicional, por creer en mí y por el cariño que recibí de ellos, lo cual me dio la fuerza para avanzar y finalizar este proceso.

Finalmente, quiero agradecer al proyecto FONDECYT Regular 1231038, a cargo del Dr. Patricio Castro, que permitió el financiamiento necesario para realizar este trabajo.

1 ÍNDICE

1	ÍNDICE.....	i
1.1	Índice de Figuras	v
1.2	Índice de Tablas	vi
2	RESUMEN.....	vii
3	ABSTRACT.....	ix
4	INTRODUCCIÓN.....	1
4.1	Neurulación	1
4.2	Defectos del tubo neural.....	3
4.3	Comunicación celular durante la neurulación	4
4.4	Señalización mediada por adenosín trifosfato (ATP).....	5
4.5	Señalización mediada por glutamato.....	7
4.6	Mecanismo de liberación vesicular en el sistema nervioso	8
4.6.1	Ciclo vesicular	9
4.6.2	Complejo SNARE y fusión vesicular.....	10
4.6.3	Reciclaje vesicular.....	11
4.7	Liberación vesicular de ATP.....	11

4.8	Liberación vesicular de glutamato	14
5	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	17
5.1	HIPÓTESIS	17
5.2	OBJETIVO GENERAL.....	17
5.3	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
6	METODOLOGÍA.....	19
6.1	Manipulación de animales y embriones.....	19
6.1.1	Declaración ética y animales de experimentación.....	19
6.1.2	Obtención de embriones de <i>Xenopus laevis</i>	19
6.2	Técnicas de biología molecular: RT-qPCR y Western blot	21
6.2.1	RT-qPCR.....	21
6.2.1.1	Extracción de ARN total	21
6.2.1.2	Transcripción reversa (RT) del ARN total.....	22
6.2.1.3	Ensayo de RT-qPCR.....	22
6.2.2	Western blot	24
6.2.2.1	Extracción de proteínas totales	24
6.2.2.2	Electroforesis y electrotransferencia proteica.....	24
6.2.2.3	Detección inmunológica de proteínas	25
6.3	Tratamientos farmacológicos.....	26

6.4	Caracterización fenotípica	27
6.5	Cuantificación de ATP	28
6.6	Cuantificación de glutamato	28
6.7	Análisis estadístico	29
7	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	30
7.1	Los transcritos y proteínas asociadas a la liberación vesicular de ATP y glutamato están presentes durante el proceso de neurulación.	30
7.1.1	Expresión del transportador vesicular de nucleótidos	31
7.1.2	Expresión del transportador vesicular de glutamato.....	33
7.1.3	Expresión de la V-ATPasa	35
7.1.4	Expresión de transcritos asociados a proteínas SNARE.....	37
7.1.5	Discusión	39
7.2	El tratamiento de embriones de <i>Xenopus laevis</i> con bafilomicina A1 durante la neurulación induce defectos del tubo neural	44
7.2.1	Evaluación fenotípica en estadio 20	45
7.2.2	Evaluación de la migración lateromedial durante la neurulación .	47
7.2.3	Evaluación fenotípica en estadio 45	50
7.2.4	Evaluación de rescate fenotípico en estadio 20	51
7.2.5	Discusión	53

7.3	Bafilomicina A1 disminuye los niveles extracelulares de ATP y glutamato durante la neurulación.	58
7.3.1	Cuantificación de los niveles de ATP	58
7.3.2	Cuantificación de los niveles de glutamato.....	60
7.3.3	Discusión	62
8	CONCLUSIONES	65
9	BIBLIOGRAFÍA.....	68

1.1 Índice de Figuras

Figura 1. Etapas del cierre del tubo neural	2
Figura 2. Liberación de ATP mediante exocitosis vesicular	13
Figura 3. Transporte vesicular de glutamato.....	15
Figura 4. Modelo hipotético de liberación vesicular de ATP y glutamato durante la neurulación.....	18
Figura 5. Línea de tiempo de estadios (E) del desarrollo en estudio y periodo de recolección de muestras junto con las horas post-fertilización (hpf).....	30
Figura 6. Expresión de VNUT durante la neurulación mediante RT-qPCR y Western blot.....	32
Figura 7. Expresión de VGLUT durante la neurulación mediante RT-qPCR y Western blot.....	34
Figura 8. Expresión de la V-ATPasa durante la neurulación mediante RT-qPCR	36
Figura 9. Expresión de transcritos SNARE durante la neurulación mediante RT-qPCR	38
Figura 10. Línea de tiempo de los estadios (E) estudiados y periodo de tratamiento con bafilomicina A1 junto con las horas post-fertilización (hpf).....	44
Figura 11. Evaluación fenotípica en estadio 20 de embriones tratados con bafilomicina A1 durante la neurulación	46
Figura 12. Evaluación de la migración orientada de células pigmentadas durante la formación del tubo neural bajo tratamiento con BafA1.....	49

Figura 13. Evaluación fenotípica en estadio 45 de embriones tratados con bafilomicina A1 durante la neurulación	51
Figura 14. Evaluación fenotípica de embriones con BafA1 y NMDA durante la neurulación	53
Figura 15. Cuantificación de los niveles de ATP en embriones en estadio 18 tratados con bafilomicina A1 durante la neurulación.....	59
Figura 16. Cuantificación de los niveles de glutamato en embriones en estadio 18 tratados con bafilomicina A1 durante la neurulación.....	61
Figura 17. Modelo integrador de la participación de la liberación vesicular de ATP y glutamato durante la neurulación.	67

1.2 Índice de Tablas

Tabla 1. Lista de partidores utilizados para RT-qPCR.....	23
---	----

2 RESUMEN

La neurulación es un proceso embrionario que involucra la diferenciación de una región del ectodermo hacia células neuroectodermales, a través de eventos morfogénicos, proliferativos y migratorios. Esta etapa concluye con la formación de una estructura tubular denominada tubo neural, de la cual se origina todo el sistema nervioso central. Los eventos celulares involucrados en la formación del tubo neural están dirigidos por distintas vías de señalización paracrina, como la vía Wntless-int (Wnt), factores de crecimiento de fibroblastos (FGFs), proteína morfogénica ósea (BMP), Noggin y Chordin, las cuales modulan procesos como la proliferación, diferenciación y migración de los precursores neurales.

La evidencia sugiere que la señalización purinérgica y glutamatérgica están involucradas en el proceso de formación del tubo neural, con el receptor purinérgico P2X4 y glutamatérgico NMDA como participantes relevantes durante la neurulación. Complementariamente, se han descrito mecanismos de liberación paracrina de ATP que activan receptores purinérgicos durante la neurulación, identificándose la participación de la conexina 46 como parte de un posible mecanismo mediado por hemicanales durante la formación del tubo neural. Sin embargo, se desconoce si durante este proceso existe un mecanismo de liberación de ATP y glutamato dependiente de vesículas, similar al utilizado en el sistema nervioso central. Por lo anterior, el presente trabajo tiene por objetivo

evaluar la presencia de un mecanismo de liberación de ATP y glutamato dependiente de vesículas, así como su participación en el cierre del tubo neural.

En este trabajo, se utilizaron embriones de *Xenopus laevis* en proceso de neurulación como modelo de estudio. Se recolectaron embriones en estadio de neurulación temprana (E12,5), intermedia (E14) y tardía (E20), con el fin de evaluar la expresión de transcritos y proteínas relevantes para la liberación vesicular de ATP y glutamato, mediante los métodos de RT-qPCR y Western blot, respectivamente. Posteriormente, se evaluó el efecto de bafilomicina A1, un inhibidor de la V-ATPasa que impide el llenado vesicular, sobre la inducción de defectos del tubo neural, cuyos resultados fueron congruentes con los niveles extracelulares de ATP y glutamato en la etapa final de la neurulación. Los resultados de este trabajo evidencian la presencia de transcritos y proteínas asociadas al llenado y liberación vesicular de ATP y glutamato, así como un retraso en el cierre del tubo neural acompañado de una disminución en la liberación de estos neurotransmisores como consecuencia del tratamiento con bafilomicina A1 durante la neurulación. Estos hallazgos sugieren que la liberación de ATP y glutamato asociada a vesículas se encuentra activa durante la neurulación y que la inhibición de este mecanismo mediante bafilomicina A1 induce defectos del tubo neural.

3 ABSTRACT

Neurulation is an embryonic process that involves the differentiation of a region of the ectoderm into neuroectodermal cells, through morphogenetic, proliferative, and migratory events. This process concludes with the formation of a tubular structure called the neural tube, from which the entire central nervous system originates. The cellular events involved in the formation of the neural tube are directed by different paracrine signaling pathways, such as the Wingless-int (Wnt) pathway, fibroblast growth factors (FGFs), bone morphogenetic protein (BMP), Noggin, and Chordin, which modulate processes such as proliferation, differentiation, and migration of neural precursors.

Evidence suggests that purinergic and glutamatergic signaling are involved in the process of neural tube formation, with the purinergic receptor P2X4 and the glutamatergic NMDA receptor as relevant participants during neurulation. Complementarily, paracrine ATP release mechanisms that activate purinergic receptors during neurulation have been described, identifying the participation of connexin 46 as part of a possible hemichannel-mediated mechanism during neural tube formation. However, it is unknown whether a vesicular-dependent ATP and glutamate release mechanism, similar to the one used in the mature central nervous system, exists during this process. Therefore, the present work aims to determine the presence of a vesicular-dependent ATP and glutamate release mechanism, as well as its participation in neural tube closure.

In this study, *Xenopus laevis* embryos undergoing neurulation were used as a model. Embryos were collected at early (Stg12.5), intermediate (Stg14), and late (Stg20) neurulation stages, in order to evaluate the expression of transcripts and proteins relevant to vesicular ATP and glutamate release, through RT-qPCR and Western blot methods, respectively. Subsequently, the effect of bafilomycin A1, a V-ATPase inhibitor that prevents vesicular loading, was evaluated on the induction of neural tube defects, with results that were consistent with decreased extracellular levels of ATP and glutamate at the final stage of neurulation. The results of this work show the presence of transcripts and proteins associated with vesicular loading and release of ATP and glutamate, as well as a delay in neural tube closure accompanied by a decrease in the release of these neurotransmitters as a consequence of bafilomycin A1 treatment during neurulation. These findings suggest that vesicular-associated ATP and glutamate release is active during neurulation and that the inhibition of this mechanism by bafilomycin A1 induces neural tube defects.

4 INTRODUCCIÓN

4.1 Neurulación

El desarrollo del sistema nervioso central (SNC) comienza con la neurulación, un proceso que ocurre durante la embriogénesis temprana y es altamente conservado en cordados (Nikolopoulou et al., 2017). La neurulación se caracteriza por una serie de eventos morfogénicos que requieren de una compleja coordinación celular y molecular (Wilde et al., 2014). Un evento clave es la formación del tubo neural, que incluye la participación del ectodermo neural y tejidos circundantes, entre los que encontramos el ectodermo no neural, mesodermo y notocorda (Nikolopoulou et al., 2017). En humanos, este proceso ocurre entre los días 20 y 28 post-fertilización, comenzando en la etapa 8 (CS8, Carnegie stages) con el engrosamiento de la región medial del ectodermo, que da origen a la placa neural, y finalizando en la etapa 13 con el cierre del tubo neural (Colas & Schoenwolf, 2001; O’Rahilly & Müller, 1994). Dado que los procesos celulares y moleculares fundamentales, como la constricción apical, la migración orientada, la extensión convergente, entre otros, están altamente conservados entre los cordados, el modelo *Xenopus laevis* constituye un modelo válido para el estudio de este proceso (Borodinsky, 2017). En *X. laevis*, la neurulación comienza con el cierre del blastoporo (fin de la gastrulación) y, para el estadio 12,5 (aproximadamente 14 horas post-fertilización), la notocorda, la cual se forma desde el mesodermo, ya se encuentra formada bajo el tejido

ectodérmico. Esto conduce a la elevación de los pliegues neurales y su posterior fusión en la línea media del embrión, finalizando con el cierre del tubo neural en el estadio 20 (aproximadamente 22 horas post-fertilización) (Nieuwkoop et al., 1994) (Figura 1).

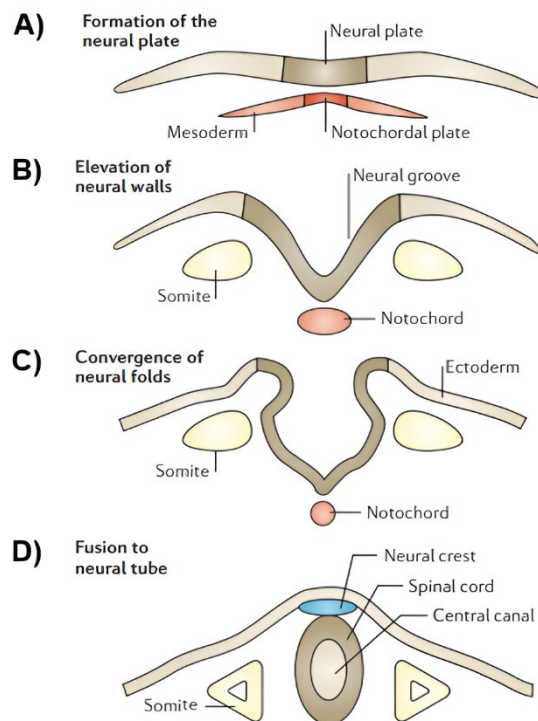


Figura 1. Etapas del cierre del tubo neural

(A) Formación de la placa neural a partir de la diferenciación celular de una región de la zona dorsal del ectodermo en precursores neurales, dirigido por moléculas de señalización provenientes de la notocorda mesodermal (Noggin, Chordin). **(B)** Formación del surco neural a través de la elevación de los bordes laterales de la placa neural. **(C)** Los bordes elevados migran de manera orientada desde regiones laterales a mediales. **(D)** Fusión de los bordes neurales laterales, conformando el tubo neural cerrado (modificada de Blom et al., 2006).

4.2 Defectos del tubo neural

Alteraciones en la formación del tubo neural dan origen a los denominados defectos del tubo neural (DTN), que corresponden a malformaciones congénitas asociadas a una elevada tasa de morbilidad en la población infantil (Copp & Greene, 2013). Existen diversos tipos de DTN, con sus características fenotípicas propias, como la espina bífida y la anencefalia, los cuales pueden provocar distintos grados de daño neuronal, discapacidad e incluso inviabilidad (Avagliano et al., 2019; Copp & Greene, 2013). Los DTN afectan aproximadamente a 1 de cada 1000 embarazos en humanos, constituyendo la malformación congénita más frecuente del sistema nervioso central (SNC) a nivel mundial (Copp & Greene, 2010). Los DTN son causados por múltiples factores, que pueden ser de origen genético, epigenéticos y/o ambientales (Lee & Gleeson, 2020; Wilde et al., 2014). Entre los factores ambientales podemos encontrar el uso de drogas anticonvulsivas, como el ácido valproico, durante el embarazo (Nau, 1994; Werler et al., 2011). El riesgo de DTN asociado a esta familia de medicamentos se maneja principalmente mediante la suplementación materna con ácido fólico, lo que puede disminuir la incidencia en aproximadamente un 70% (Blom et al., 2006; Običan et al., 2010). Sin embargo, aún queda un porcentaje significativo de casos (aproximadamente un 30%) que no son prevenibles pese al tratamiento con ácido fólico. Dada su relevancia clínica y a la falta de tratamientos efectivos que prevengan el desarrollo de DTN, es necesaria investigación adicional que permita dilucidar y profundizar en los

mecanismos fisiológicos implicados en el cierre del tubo neural. Lo anterior permitirá generar estrategias terapéuticas más efectivas a las ya existentes, con el fin de prevenir estas patologías (Wallingford et al., 2013).

4.3 Comunicación celular durante la neurulación

Durante la neurulación, la señalización paracrina, comunicación intercelular de corto alcance mediada por ligandos como Wnt (Wingless/Int-1), los factores de crecimiento de fibroblastos (FGF), la proteína morfogenética ósea (BMP) y sus antagonistas Noggin y Chordin, coordina la proliferación, la diferenciación y la migración de los precursores neurales (Gratsch & O'Shea, 2002; Hébert, 2011; Shariatmadari et al., 2005; Stottmann et al., 2006). Esto permite la generación de fenómenos como la extensión convergente, así como la formación, aposición y fusión de los pliegues neurales (Hébert, 2011; Nikolopoulou et al., 2017; Yamaguchi & Miura, 2012). La señalización mediada por FGF participa en la inducción neural, al favorecer que una región del ectodermo se diferencie en células neuroectodermales, lo que permite la posterior formación del tubo neural (Hébert, 2011). La vía de señalización Wnt/PCP (de sus siglas en inglés, Planar Cell Polarity) regula la remodelación del citoesqueleto de células del neuroepitelio, lo que permite la extensión y convergencia, fenómenos esenciales para el alargamiento del eje corporal y el cierre del tubo neural durante la neurulación (Nikolopoulou et al., 2017). BMP es una molécula de señalización paracrina que induce la diferenciación del ectodermo hacia un destino epidérmico (Dale & Jones, 1999; Wilson & Hemmati-Brivanlou, 1997), por lo tanto, su

actividad debe ser inhibida en la línea media dorsal del embrión para permitir la inducción y el establecimiento del neuroectodermo. Esta inhibición es mediada por los antagonistas paracrinós Noggin y Chordin, los cuales bloquean la señalización de BMP, favoreciendo así la especificación neural (Gratsch & O'Shea, 2002; McMahon et al., 1998; Wessely et al., 2001).

4.4 Señalización mediada por adenosín trifosfato (ATP)

El ATP es una molécula que actúa como neurotransmisor y neuromodulador en el sistema nervioso, formando parte de la señalización purinérgica (Abbracchio et al., 2009; Zimmermann, 2006) y ejerciendo efectos tróficos al modular la proliferación, diferenciación y crecimiento axonal (Cavaliere et al., 2015; Lecca et al., 2012; Rathbone et al., 1999; Welsh & Kucenas, 2018; Zimmermann, 2011). La señalización mediada por este neurotransmisor se lleva a cabo a través de receptores ionotrópicos P2X activados por ligando (P2X1–7), los cuales permiten el paso de cationes, principalmente Na^+ y Ca^{2+} (North, 2002). Además, el ATP es capaz de modular receptores metabotrópicos P2Y acoplados a proteína G. En este contexto, los receptores P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6 y P2Y11 se acoplan preferentemente a proteínas $G_{\alpha q}$, lo que conduce a la activación de la fosfolipasa $C\beta$ y la generación de IP_3 y DAG, incrementando la concentración de calcio intracelular. El receptor P2Y11 también puede acoplarse a proteínas G_s , activando la adenilil ciclasa y aumentando los niveles de AMPc. En contraste, los receptores P2Y12, P2Y13 y P2Y14 están acoplados a proteínas G_i , cuya activación inhibe la adenilil ciclasa y reduce la producción de AMPc (Erb &

Weisman, 2012). Se ha determinado que la señalización purinérgica podría jugar un rol morfogénico durante el desarrollo embrionario (Massé & Dale, 2012). Se ha descrito la presencia de un receptor P2Y, denominado XIP2Y, el cual se expresa específicamente en la placa neural de embriones de *X. laevis*, lo que sugiere que la señalización purinérgica podría desempeñar un rol importante durante la neurulación (Bogdanov et al., 1997).

El ATP puede ser liberado al medio extracelular a través de conexinas y vesículas, así como por gránulos y lisosomas secretorios (Coco et al., 2003; Larsson et al., 2012; Oya et al., 2013; Stout et al., 2002; Verderio et al., 2012; Zhang et al., 2007). Las conexinas (Cxs) son proteínas de membrana que se ensamblan en forma de hexámeros, formando un hemicanal llamado conexón (Evans et al., 2006; Willecke et al., 2002), a través del cual es posible la liberación al medio extracelular tanto de ATP como de otros neurotransmisores, como el glutamato (Cotrina et al., 1998; Jiang et al., 2011; Leybaert et al., 2003; Malarkey & Parpura, 2008; Orellana et al., 2011; Stout et al., 2002). En nuestro laboratorio se realizaron ensayos de bloqueos farmacológicos de Cx 46 durante la neurulación utilizando carbenoxolona (CBX) y enoxolona (ENX), produciendo DTN de manera concentración dependiente, lo que se asoció a una disminución de los niveles extracelulares de ATP (Tovar et al., 2023).

4.5 Señalización mediada por glutamato

El glutamato es el principal neurotransmisor excitatorio del SNC y ha sido asociado ampliamente con procesos de memoria y aprendizaje (McEntee & Crook, 1993; Meldrum, 2000; Peng et al., 2011; Riedel et al., 2003). La señalización mediada por glutamato modula receptores ionotrópicos que permiten el paso de los cationes Na^+ y Ca^{2+} a través de la membrana plasmática. Entre estos receptores se encuentran los de NMDA (N-metil-D-aspartato), AMPA (α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiónico) y Kainato (KA), nombres que derivan de sus respectivos agonistas sintéticos (Duarte et al., 1996; Kew & Kemp, 2005; Mayer & Miller, 1990; Mayer & Westbrook, 1987). Además, glutamato es capaz de modular receptores metabotrópicos acoplados a proteína G (mGluR1-mGluR8, por sus siglas en inglés de metabotropic Glutamate Receptors). Estos últimos se agrupan en tres clases funcionales: el grupo I (mGluR1 y mGluR5) está acoplado a proteína $G_{\alpha q/11}$, que activan la fosfolipasa C (PLC) e inducen la liberación de Ca^{2+} intracelular; los grupos II (mGluR2 y mGluR3) y III (mGluR4, mGluR6, mGluR7 y mGluR8) están acoplados a proteína $G_{\alpha i/o}$, inhibiendo la adenilil ciclase y reduciendo los niveles de AMPc, modulando negativamente la excitabilidad neuronal y la liberación de neurotransmisores (Kew & Kemp, 2005). En el SNC, el glutamato es sintetizado principalmente por la enzima glutaminasa 1 (GLS1) a partir de glutamina (Gln) (Masson et al., 2006). En nuestro laboratorio se evaluó la inhibición farmacológica de GLS1 durante la neurulación con L-DON (6-diazo-5-oxo-L-norleucina) induciendo DTN en embriones de *X. laevis*

(Benavides-Rivas et al., 2020), indicando que glutamato es relevante en el comienzo de la formación del sistema nervioso. La disrupción de la señalización glutamatérgica durante la neurulación, a través de la aplicación de ácido valproico, el uso de D-AP5 (D-2-amino-5-fosfonopentanoato), el cual es un antagonista selectivo del receptor NMDA, o, mediante un modelo de *knockdown* de la subunidad N1 del receptor NMDA, induce DTN en embriones de *X. laevis*, lo que sugiere que la señalización glutamatérgica se encuentra activa y es relevante para el proceso de neurulación (Sequerra et al., 2018). La liberación vesicular de ATP y glutamato requiere la acción coordinada de diversas proteínas, que permiten tanto el llenado de las vesículas con estas moléculas señalizadoras, como su posterior fusión con la membrana plasmática para liberar su contenido.

4.6 Mecanismo de liberación vesicular en el sistema nervioso

La liberación vesicular es un mecanismo fundamental para la comunicación intercelular, especialmente en el sistema nervioso, donde permite la exocitosis de neurotransmisores, neuromoduladores y señales paracrinas hacia el espacio extracelular. Este proceso se lleva a cabo mediante un ciclo vesicular altamente regulado, que involucra la formación, carga, transporte, acoplamiento, fusión y reciclaje de vesículas sinápticas (Südhof, 2004).

4.6.1 Ciclo vesicular

El ciclo vesicular inicia con la biogénesis de las vesículas en compartimentos intracelulares como el aparato de Golgi o endosomas (Hannah et al., 1999). Estas vesículas son cargadas activamente con nucleótidos, como el ATP, o neurotransmisores, como el glutamato, mediante transportadores específicos dependientes de protones, como los transportadores vesiculares de nucleótidos (VNUT) o de glutamato (VGLUT), respectivamente (Fremeau, Voglmaier, et al., 2004; Sawada et al., 2008). Esta carga depende de la acción de la V-ATPasa, que genera un gradiente electroquímico de protones necesario para el transporte activo del contenido vesicular (Eriksen et al., 2016; Herzog et al., 2001; Moriyama et al., 2017; Preobraschenski et al., 2014; Sawada et al., 2008; Schenck et al., 2009; Varoqui et al., 2002).

Una vez cargadas, las vesículas son transportadas a lo largo del citoesqueleto hacia zonas específicas de liberación, como las terminaciones presinápticas o dominios especializados en células no neuronales. Este transporte es mediado por proteínas motoras, como quinesinas o dineínas, que se desplazan sobre microtúbulos (Guedes-Dias & Holzbaur, 2019).

En la zona de liberación, las vesículas atraviesan una serie de pasos que incluyen el anclaje, el cebado (*priming*) y finalmente la fusión con la membrana plasmática. Estos pasos están regulados por un conjunto altamente conservado de proteínas, entre las que destacan las proteínas SNARE (de sus siglas en inglés, Soluble

NSF Attachment Protein Receptors), responsables de mediar la fusión vesicular (Südhof & Rothman, 2009).

4.6.2 Complejo SNARE y fusión vesicular

El complejo SNARE está conformado por tres proteínas principales: las v-SNAREs, ubicadas en la membrana vesicular y que corresponden a VAMP (de sus siglas en inglés, Vesicular-Associated Membrane Protein); y las t-SNAREs, localizadas en la membrana plasmática y que corresponden a STX (de sus siglas en inglés, Syntaxin) y SNAP-25 (de sus siglas en inglés, Synaptosome-Associated Protein 25) (Schiavo et al., 1997). Durante el proceso de acoplamiento, estas proteínas interactúan de forma específica y complementaria, formando un complejo (Hay, 2001; Hong & Lev, 2014).

Adicionalmente, la fusión vesicular está regulada por el aumento local de Ca^{2+} intracelular, el cual es detectado por sensores de calcio como la SYT (de sus siglas en inglés, Synaptotagmin). Esta proteína posee dominios C2 capaces de unirse al calcio y a los fosfolípidos de la membrana plasmática, desencadenando una reorganización del complejo SNARE que culmina en la apertura del poro de fusión y la liberación del contenido vesicular (Brose et al., 1992; Südhof & Rothman, 2009).

Posterior a la fusión, los componentes SNARE deben ser desensamblados para permitir un nuevo ciclo. Este paso está mediado por las proteínas NSF (de sus siglas en inglés, N-ethylmaleimide Sensitive Factor) y α -SNAP (de sus siglas en

inglés, alpha-Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor Attachment Protein), utilizando energía derivada del ATP para disociar el complejo SNARE y reciclar sus componentes (Südhof, 2013).

4.6.3 Reciclaje vesicular

Tras la exocitosis, la membrana vesicular se recupera mediante procesos de endocitosis, que pueden ser rápidos (como la endocitosis clatrina-independiente) o más lentos (como la endocitosis clatrina-dependiente) (Daly et al., 2000; Fuchs et al., 2014; Milosevic, 2018). Las vesículas recuperadas pueden ser recargadas con neurotransmisores y reincorporadas al pool vesicular, cerrando así el ciclo (Rizzoli, 2014; Soykan et al., 2016).

4.7 Liberación vesicular de ATP

En el sistema nervioso, el ATP es liberado a través de vesículas (Figura 2) y conexinas, así como también por gránulos y lisosomas secretorios (Bowser & Khakh, 2007; Coco et al., 2003; Imura et al., 2013; Oya et al., 2013; Pankratov et al., 2006; Stout et al., 2002; Verderio et al., 2012; Zhang et al., 2007). El transportador vesicular de nucleótidos (VNUT) es una proteína perteneciente a la familia de transportadores de fosfato inorgánico tipo I del transportador de solutos 17 (SLC17A9) (Sawada et al., 2008). VNUT es el responsable del llenado vesicular y de lisosomas secretorios con nucleótidos, principalmente ATP, promoviendo su exocitosis (Larsson et al., 2012; Oya et al., 2013; Sawada et al., 2008; Verderio et al., 2012). El ATP liberado puede activar directamente

receptores purinérgicos de membrana o bien, tras su metabolización por ectonucleotidasas a ADP, actuar sobre receptores de las familias P2 (P2X y P2Y) y P1 (Honda et al., 2001; Moriyama et al., 2017; Ralevic & Burnstock, 1998; Sawada et al., 2008). Funcionalmente, VNUT depende de la ATPasa vacuolar (V-ATPasa), una proteína que actúa como bomba primaria de protones, modificando tanto el potencial de membrana ($\Delta\psi$) vesicular como el pH (ΔpH) intravesicular (Figura 2), proporcionando la fuerza impulsora necesaria para el llenado vesicular de ATP (Moriyama et al., 2017). El uso de bafilomicina A1 (BafA1), un inhibidor específico de la V-ATPasa, disminuye el llenado vesicular y, en consecuencia, la liberación de ATP al medio extracelular (Hanada et al., 1990; Moriyama et al., 2017; Yoshimori et al., 1991).

Durante el desarrollo del sistema nervioso, células progenitoras neurales liberan ATP mediante exocitosis, el cual actúa como factor mitogénico y regula la migración celular mediante señalización autocrina y paracrina. (Striedinger et al., 2007; Tsao et al., 2013).

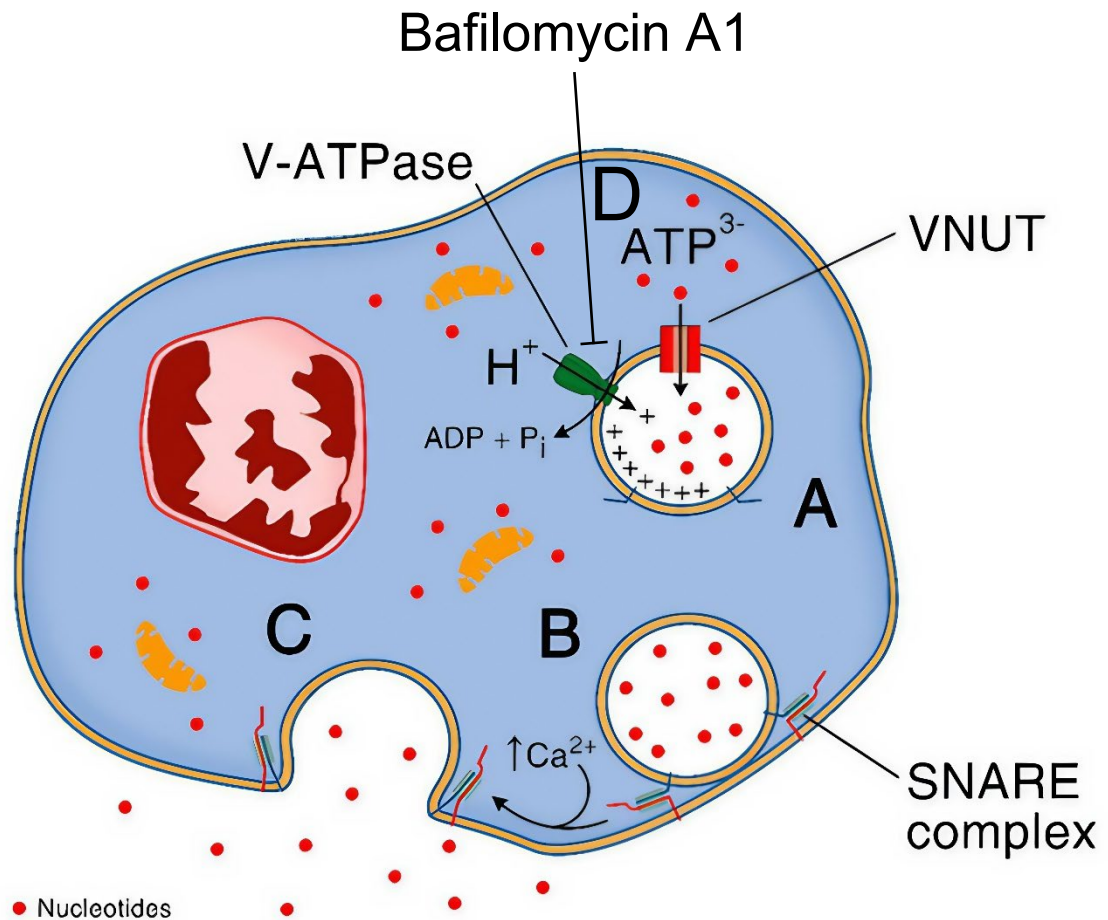


Figura 2. Liberación de ATP mediante exocitosis vesicular

(A) Transporte activo de ATP al interior de las vesículas a través del transportador vesicular de nucleótidos (VNUT), utilizando como fuerza impulsora el gradiente de protones generado por la V-ATPasa (positivo en el interior de la vesícula); **(B)** Unión espontánea de los complejos SNARE; **(C)** El aumento en la concentración intracelular de calcio conduce a la fusión de membranas mediada por SNAREs y a la liberación de ATP al espacio extracelular; **(D)** La inhibición de la V-ATPasa mediante bafilomicina A1 impide el llenado vesicular con ATP (modificada de Dosch et al., 2018).

4.8 Liberación vesicular de glutamato

Al igual que VNUT, el transportador vesicular de glutamato (VGLUT) es una proteína perteneciente a la familia de transportadores de fosfato inorgánico tipo I del transportador de solutos 17 (SLC17) (Reimer, 2013). VGLUT se encarga del llenado vesicular de glutamato, que posteriormente es liberado al medio extracelular (Fremeau, Voglmaier, et al., 2004) (Figura 3). Se han identificado tres isoformas de VGLUT: VGLUT1 (SLC17A7), VGLUT2 (SLC17A6) y VGLUT3 (SLC17A8). Estas isoformas se distribuyen en distintas regiones del sistema nervioso. VGLUT1 se expresa principalmente en la corteza cerebral, hipocampo, y corteza cerebelar; VGLUT2 en el tálamo, mesencéfalo y en los núcleos cerebelosos profundos; mientras que VGLUT3 se expresa en neuronas colinérgicas del estriado ventral y dorsal, así como en neuronas serotoninérgicas del núcleo del rafe (Fremeau et al., 2001; Herzog et al., 2001; Takamori et al., 2001; Varoqui et al., 2002). Estudios sobre las propiedades cinéticas de VGLUT demuestran que tanto el potencial de membrana vesicular ($\Delta\psi$) como el gradiente de H^+ (ΔpH) son necesarios para su función (Figura 3). Estos parámetros son establecidos por la V-ATPasa, lo que constituye una característica compartida con VNUT (Eriksen et al., 2016; Herzog et al., 2001; Moriyama et al., 2017; Preobraschenski et al., 2014; Sawada et al., 2008; Schenck et al., 2009; Varoqui et al., 2002). Adicionalmente, VNUT corresponde al transportador vesicular de neurotransmisores evolutivamente más antiguo, seguido temporalmente por los

VGLUTs (Arendt, 2020; Sreedharan et al., 2010), lo que sustenta una relación ontogenia-filogenia.

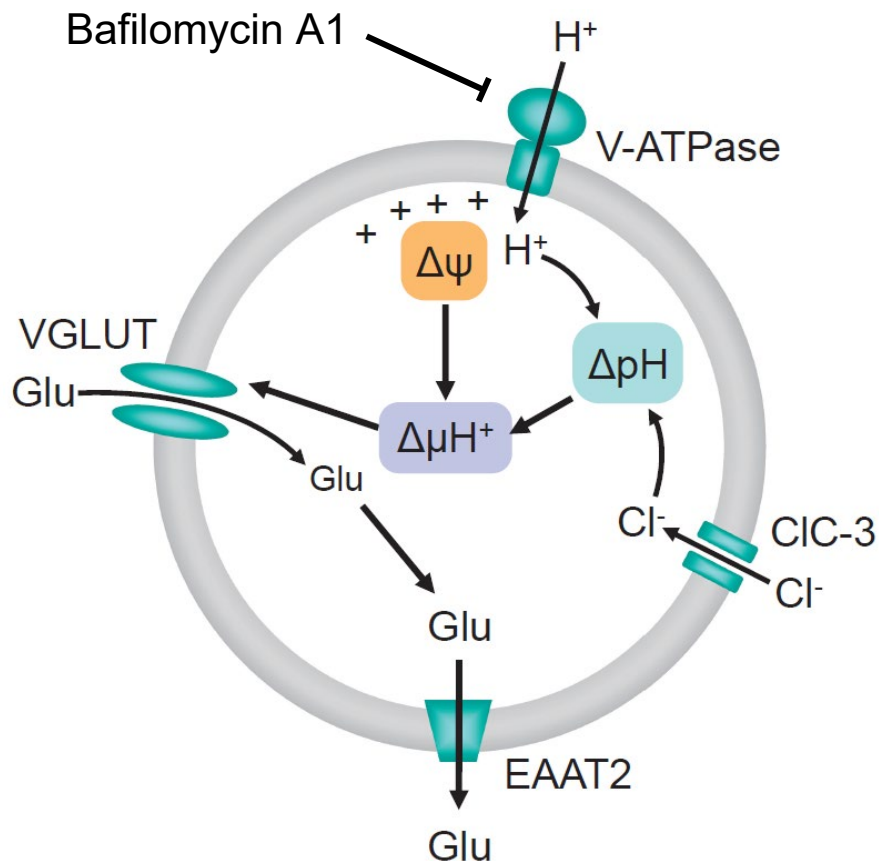


Figura 3. Transporte vesicular de glutamato

El gradiente electroquímico de protones ($\Delta\mu H^+$), compuesto por el potencial de membrana ($\Delta\psi$) y el gradiente de pH (ΔpH), es la fuerza impulsora del transporte de glutamato (Glu). El influjo de protones a través de la V-ATPasa genera $\Delta\psi$ y ΔpH , el cual puede ser inhibido mediante bafilomicina A1. El transporte de iones cloruro (Cl^-) mediado por CIC-3 contribuye indirectamente al gradiente electroquímico de H^+ al favorecer la disipación del potencial eléctrico vesicular. El transportador de aminoácidos excitatorios 2 (de sus siglas en inglés, EAAT2) permite el eflujo de glutamato hacia el citoplasma en células no neuronales (modificada de Takahashi et al., 2019).

La inhibición de la expresión de VGLUT, en cualquiera de sus tres isoformas, sugiere que este transportador es relevante para el desarrollo del sistema nervioso. En ratones *knockout* para VGLUT1 se han descrito alteraciones en el fenotipo neurológico, como ceguera y descoordinación motora (Freneau, Kam, et al., 2004; Tordera et al., 2007; Wojcik et al., 2004). VGLUT2 presenta una alta expresión durante el desarrollo embrionario, cuya inactivación genética causa letalidad perinatal (Dumas & Wallén-Mackenzie, 2019; Majumdar & Wu, 2025; Miyazaki et al., 2003; Moechars et al., 2006; Ohmomo et al., 2011). Por otro lado, la inhibición de la expresión VGLUT3 genera alteraciones en la función auditiva y una hipersensibilidad a estímulos mecánicos (Seal et al., 2008).

Si bien el ATP y el glutamato son moléculas de señalización relevantes durante el desarrollo del sistema nervioso, los mecanismos de liberación extracelular durante la neurulación aún no están completamente esclarecidos. Este trabajo busca evaluar si la liberación de estas moléculas es mediada por un mecanismo vesicular durante la formación del tubo neural. Para ello se evaluará la presencia de proteínas claves para la liberación vesicular de ATP y glutamato, los efectos fenotípicos asociados a la inhibición de esta vía de liberación y la funcionalidad de la liberación de ATP y glutamato dependiente de vesículas durante la neurulación.

5 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

5.1 HIPÓTESIS

Los neurotransmisores ATP y glutamato participan en la neurulación de *Xenopus laevis*, siendo liberados a través de un mecanismo dependiente de la V-ATPasa, cuya inhibición mediante bafilomicina A1 induce defectos en el tubo neural.

5.2 OBJETIVO GENERAL

Evaluar la liberación de ATP y glutamato dependiente de vesículas y el efecto de la inhibición de la V-ATPasa mediante bafilomicina A1 en el cierre del tubo neural de *Xenopus laevis*.

5.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

OE1. Evaluar la expresión de transcritos y proteínas relacionadas con la liberación vesicular de ATP y glutamato durante la neurulación en embriones de *X. laevis*.

OE2. Caracterizar el fenotipo obtenido al exponer embriones de *X. laevis* a bafilomicina A1 durante la neurulación y evaluar su rescate farmacológico con NMDA.

OE3. Evaluar la liberación de ATP y glutamato dependiente de la V-ATPasa en presencia y ausencia de bafilomicina A1 durante la neurulación en embriones de *X. laevis*.

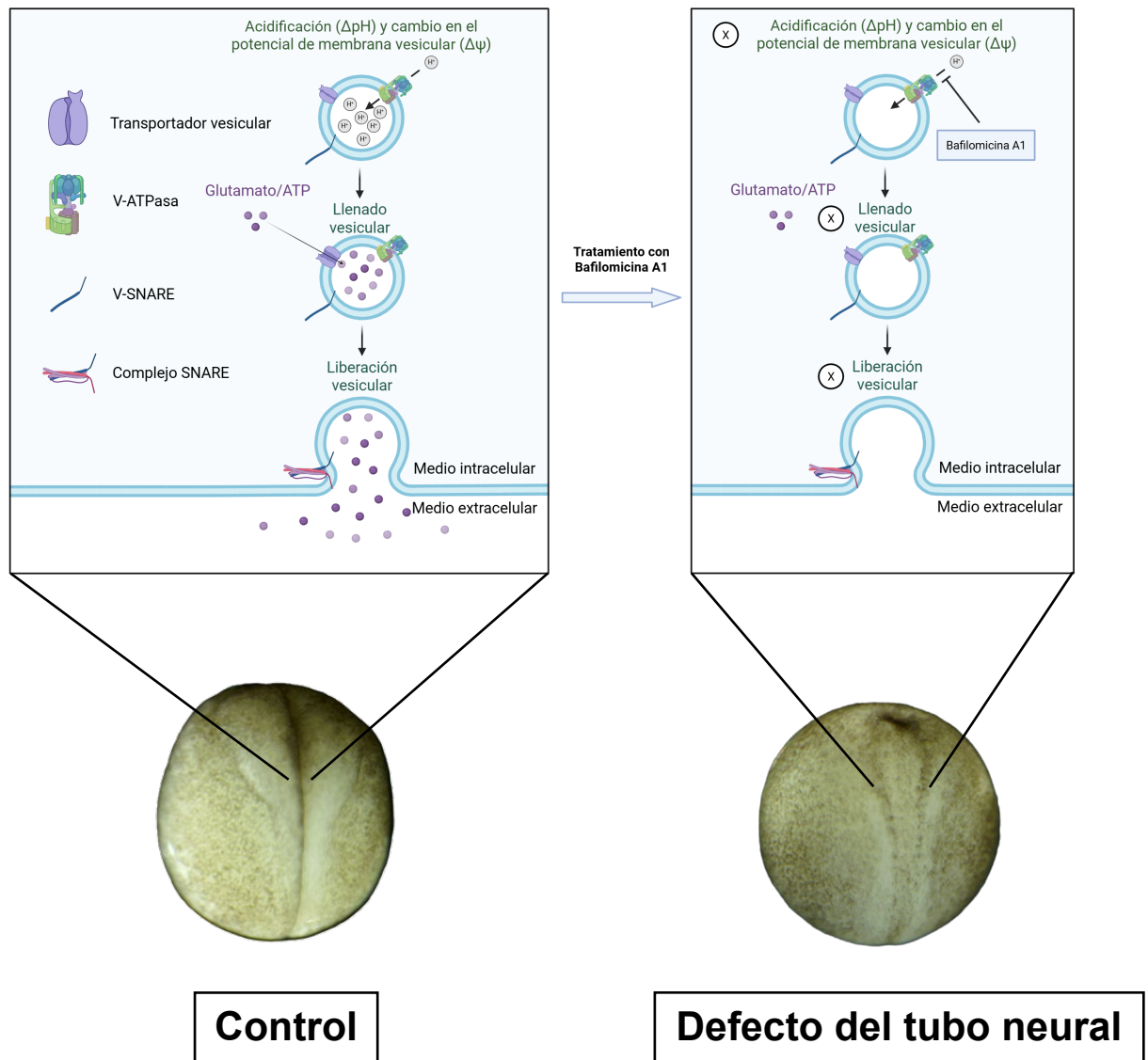


Figura 4. Modelo hipotético de liberación vesicular de ATP y glutamato durante la neurulación

La V-ATPasa establece el gradiente electroquímico de protones ($\Delta \mu H^+$), compuesto por ΔpH y $\Delta \psi$, que impulsa el llenado vesicular con ATP y/o glutamato mediante transportadores vesiculares. Su inhibición con bafilomicina A1 colapsa $\Delta \mu H^+$, bloquea el llenado y puede conducir a defectos del tubo neural.

6 METODOLOGÍA

6.1 Manipulación de animales y embriones.

6.1.1 Declaración ética y animales de experimentación

Todos los protocolos relacionados con el manejo de los animales de experimentación están aprobados por el comité de ética de la Universidad de Concepción y asociados al proyecto FONDECYT 1231038.

El protocolo de eutanasia de anfibios se basó en los métodos descritos por (Close et al., 1996, 1997).

6.1.2 Obtención de embriones de *Xenopus laevis*

La recolección de ovocitos de *X. laevis* se realizó por medio de la técnica de fertilización *in vitro*. La ovulación de la rana hembra seleccionada fue inducida previamente mediante la inyección subcutánea de hormona Gonadotrofina Coriónica Humana (hCG). Con 48 hrs de anterioridad a la fertilización (*pre-prime*), la hembra fue inyectada con 50 unidades de hCG. 24 hrs después la hembra fue inyectada nuevamente con 400-500 unidades de hCG (*prime*). El macho fue previamente anestesiado con benzocaína y luego sacrificado, para extraer sus testículos mediante una incisión abdominal. Los testículos fueron almacenados en medio MMR 1X (NaCl 100 mM, KCl 2 mM, MgSO₄ * 7H₂O 1 mM, CaCl₂ * 2H₂O 2 mM, HEPES 5 mM, H₂O) suplementado con FBS al 30%. 12 hrs después de la segunda inyección de hCG se recolectaron los ovocitos en solución MMR 1X, posteriormente se fertilizaron con extracto de testículos de *X. laevis* y se

incubaron por 1 hora a temperatura ambiente (23°C) en solución MMR al 10% (NaCl 10 mM, KCl 200 µM, MgSO₄ * 7H₂O 100 µM, CaCl₂ * 2H₂O 200 µM, HEPES 500 µM). Después, el medio de fertilización fue reemplazado por una solución de cisteína al 2% en MMR al 10%, con un pH 7,8-7,9 durante 10 minutos, con el objetivo de remover la capa gelatinosa que recubre y protege a los embriones, proceso conocido como “desgelatinización”. Posteriormente, los embriones fueron lavados e incubados en MMR al 10% a temperatura ambiente (23°C), para luego evaluar la formación del tubo neural entre 10,5 y 21,5 horas post-fertilización (hpf).

Para el análisis del cierre del tubo neural y la evaluación de los efectos morfológicos, se seleccionaron embriones en los estadios 20 y 45 del desarrollo. Durante el estadio de gástrula (estadio 10), se especifican las capas germinales (ectodermo, mesodermo y endodermo) y el embrión adquiere una orientación axial. En la neurulación temprana (estadio 12,5), la región media del embrión comienza a definir la posición futura de la placa neural. Posteriormente, en la neurulación intermedia (estadio 14), se observa la elevación inicial de los pliegues neurales, siendo esta más pronunciada en la región anterior. En el estadio de neurulación tardía (estadio 20), los pliegues neurales se aproximan y permiten el cierre del tubo neural. Finalmente, en el estadio 45, correspondiente al final de la fase de larva inicial temprana, el cual presenta estructuras diferenciadas como los ojos pigmentados, la boca, la cola funcional y órganos

internos en desarrollo, lo que facilita la evaluación de posibles alteraciones morfológicas más evidentes a nivel macroscópico (Nieuwkoop et al., 1994).

6.2 Técnicas de biología molecular: RT-qPCR y Western blot

6.2.1 RT-qPCR

6.2.1.1 Extracción de ARN total

Para la extracción de ARN total de los estadios embrionarios de *X. laevis*: estadio 12,5 (temprano), estadio 14 (intermedio), estadio 20 (tardío) y cerebro adulto (como control positivo), se utilizó el kit E.Z.N.A.® HP Total RNA, homogenizando las muestras en 700 µL de tampón de lisis GTC sumado a β-mercaptoetanol, este volumen se implementó según instrucciones del fabricante por cantidad de tejido (30 mg). Las muestras se sometieron a centrifugaciones y lavados con 500 µL de etanol 70% v/v. Finalmente, el ARN total se eluyó en 30 µL de agua libre de ARNasa, se cuantificó su concentración midiendo su absorbancia a 260 nm en el equipo Infinite® F200 Pro NanoQuant (Tecan Group Ltd., Männedorf, Suiza) y su pureza de acuerdo con la relación 260/280. Se aceptaron valores superiores a 200 ng/µL y una relación 260/280 igual o superior a 2,0. La integridad de las muestras de ARN extraídas se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%, observando la presencia y definición de las bandas correspondientes a las subunidades 28S y 18S del ARN ribosomal.

6.2.1.2 Transcripción reversa (RT) del ARN total

La síntesis de ADN complementario (ADNc) se realizó utilizando la enzima transcriptasa reversa M-MuLV Enzyme Mix (ProtoScript® II First Strand cDNA Synthesis Kit), agregando 1 µg de cada muestra de ARN total. Para un volumen final de 20 µL, se incubó el ARN con 0,5 µg de oligo-dT, se desnaturalizó a 70°C por 5 minutos y se llevó a hielo por 2 minutos. Posteriormente se agregó el tampón de transcripción M-MuLV Reaction Mix (Tris-HCl 50 mM pH 8,3, KCl 75 mM, MgCl₂ 3 mM, DTT 10 mM), 400 U de la enzima transcriptasa reversa M-MuLV Enzyme Mix (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE. UU.) y se incubó por 1 h a 42°C y finalmente a 70°C por 5 min.

6.2.1.3 Ensayo de RT-qPCR

La reacción de RT-qPCR se preparó con el kit Brilliant II SYBR Green qPCR Master Mix (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE. UU.) en un volumen final de 20 µL, que contuvo 5 microlitros de ADNc y 250 nM de cada partidor (Tabla 1). Cada mezcla de reacción se incubó a 95°C durante 10 minutos, seguido de 40 ciclos a 95°C durante 15 segundos, 60°C durante 15 segundos, 72°C durante 15 segundos, y una extensión final a 95°C durante 30 segundos, 65°C durante 30 segundos y 95°C durante 30 segundos en un termociclador Mx3000P (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, EE. UU.). La expresión relativa de los transcritos de interés se calculó mediante el método $\Delta\Delta CT$ ($2^{-\Delta\Delta CT}$) (Livak & Schmittgen, 2001), utilizando SUB-1 como gen de referencia (*housekeeping*) (Mughal et al., 2018) y normalizando las condiciones al estadio 12,5. Los

controles negativos para la amplificación de cada muestra se realizaron utilizando el mismo protocolo, pero reemplazando el ADNc por H₂O.

Tabla 1. Lista de partidores utilizados para RT-qPCR

NOMBRE	PARTIDOR SENTIDO 5'-3'	PARTIDOR ANTISENTIDO 3'-5'	TAMAÑO DEL PRODUCTO (PB)
VGLUT1	TACACTAGGACGTCTGCACAGGAT	CGAGGAAGCCCAAAGCAAGTACAA	141
VGLUT2	GCAGGAGCTGTTATTGCTATGCCA	GAAGAGGTACCAAACCAGGCCAAA	108
VGLUT3	TCAGACTCAGCCACCTCCAAGATT	ATGCAAAACCCCAAGCCACTCA	93
VNUT	CTTTGCTATACCCGCTGGCATTCT	GAATCCCATCCCAACGATCTGCAT	112
V-ATPASA	TACGGAGAGCTCGTCAGCC	CTGCTCCCAAGGCGCTAAA	119
SYT1	TGAATCGATCCCATTGCCA	GGCCCCGATATTCCACCTTC	233
SNAP25	AGGTGAGGAACGTTGCTTGT	TGCTCTCCAGTGACTCATCG	200
VAMP1	GCTCAGTGGGCCTCATTAATGACA	CCTGCAGTAACCCACAGCAAAAAGA	140
VAMP2	GATGACCGTACAGATGCCCT	TGATAGCACACATCACACCCA	127
STX1A	CCGTTCCAAGCTGAAGGGTAT	TGTGGCGTTGTATTCCGACA	145
STX1B	GCATTCTACTCTGTCCCGCA	TCCAGTGATCTCCAGCTGTCT	115
SUB-1	CAACTGAAGGAGCAGATGTCGGAT	CATGGTTTCGTCAAGGCGTAGGTA	80

6.2.2 Western blot

6.2.2.1 Extracción de proteínas totales

Se utilizaron embriones de *X. laevis* en las diferentes etapas de neurulación. Los embriones completos fueron homogeneizados manualmente (aguja/jeringa) utilizando el tampón de lisis Triton 1X (Tris pH 7,4 1 M, NaCl 150 mM, Triton X-100 1% v/v, EDTA 1 mM) en conjunto con un inhibidor de proteasas (ROCHE, Suiza). La concentración de proteínas lisadas totales se determinó mediante el kit Micro BSA (Thermofisher, Waltham, MA, EE. UU.) en el equipo NOVOstar (BMG Labtech, Ortenberg, Alemania).

6.2.2.2 Electroforesis y electrotransferencia proteica

Se utilizó un gel desnaturalizante de acrilamida al 12% (SDS-PAGE) para separar la proteína de interés. Las muestras se incubaron a 95°C durante 5 minutos con tampón de carga (62,5 mM Tris-HCl pH 6,8, 2% SDS, 10% glicerol, 0,01% azul de bromofenol) y 100 mM de DTT. Se cargaron 125 µg de proteína total en el gel junto con el estándar de proteínas (Spectra Multicolor, Broad Range Protein Ladder, Thermo Scientific, MA, EE. UU.) y se corrieron a 100 V en una solución de corrida (25 mM de Tris, 250 mM de glicina y 0,1% de SDS). Las proteínas se transfirieron a una membrana de Immobilon-P (0,45 µm de poro, Merck Millipore, Tullagreen, Carrigtwohill, Irlanda) con solución de transferencia (25 mM de Tris, 192 mM de glicina, 20% de metanol) a 250 mA durante 2 horas.

6.2.2.3 Detección inmunológica de proteínas

Se realizaron cinco lavados de 5 minutos cada uno con TBS-Tween (150 mM de NaCl, 10 mM de Tris, 0,05% de Tween20). La membrana se bloqueó con leche al 5% en TBS-Tween durante 1 hora. Se llevó a cabo una incubación durante toda la noche a 4°C con los siguientes anticuerpos primarios disueltos en solución bloqueante: anti-SLC17A9 (ANT-085, Alomone Labs) y anti-VGLUT1/2 (135.503, Synaptic Systems), ambos a una dilución de 1:400, y anti-G β (H-1) (sc-166123, Santa Cruz Biotechnology, Inc.) a 1:500. La membrana se lavó cinco veces con TBS-Tween, durante 5 minutos por lavado. La incubación con el anticuerpo secundario se realizó durante 1 hora a temperatura ambiente (23°C), utilizando anticuerpos conjugados con peroxidasa (Anti-Rabbit y Anti-Mouse, según corresponda), a una concentración de 1:5000, disueltos en solución bloqueante. La membrana se lavó cinco veces con TBS-Tween, durante 5 minutos por lavado. Finalmente, la membrana se reveló con una solución quimioluminiscente (Western Lightening Plus-ECL, Perkin Elmer, Waltham, MA, EE. UU.) en el equipo quimioluminiscente y fluorescente (Odyssey FC, Li-COR, Lincoln, NE, EE. UU.).

La cuantificación densitométrica de las bandas correspondientes a las proteínas de interés se efectuó utilizando el software ImageJ (Schneider et al., 2012). Para cada carril del gel, se seleccionó un área rectangular alrededor de cada banda, manteniendo un tamaño constante entre muestras. Se midió la intensidad

integrada de la señal para cada banda. Como control de carga, se utilizó la subunidad G-beta ($G\beta$), cuya señal fue cuantificada de la misma manera.

Para la normalización, la intensidad de las proteínas de interés en cada muestra fue dividida por la intensidad correspondiente de $G\beta$, utilizada como control de carga, obteniéndose así la expresión relativa normalizada.

6.3 Tratamientos farmacológicos

Embriones en estadio 12,5 (neurulación temprana) fueron incubados hasta el estadio 20 (neurulación tardía) con concentraciones crecientes de bafilomicina A1 (Cayman Chemical). Como controles, se utilizaron dos soluciones: solución salina (MMR al 10%) y solución salina con vehículo (DMSO al 0,1%). Al término de la neurulación, los embriones se lavaron tres veces (5 minutos por lavado) con solución MMR al 10% y se mantuvieron en dicha solución hasta el estadio larval temprano (estadio 45). La captura de imágenes se realizó utilizando un estereomicroscopio NIKON modelo SMZ25, acoplado a una cámara de campo claro AmScope. Se empleó una magnificación de 2x para los embriones en estadio 20 y de 0,63x para las larvas en estadio 45. Bajo estas condiciones, se evaluaron los fenotipos resultantes del tratamiento con bafilomicina A1 durante la neurulación.

6.4 Caracterización fenotípica

De las fotografías obtenidas con estereomicroscopio NIKON modelo SMZ25, se determinó el número de embriones en estadio 20 que presentaban un cierre incompleto del tubo neural, en comparación al grupo control. Posteriormente, utilizando el programa ImageJ, se analizó el fenotipo resultante del tratamiento con bafilomicina A1 durante la neurulación. Se evaluaron alteraciones fenotípicas, entre las cuales se incluyó la medición de la longitud de las larvas en estadio 45, migración de las células pigmentadas del neuroepitelio y la prevención del fenotipo generado por la exposición de BafA1 co-administrando NMDA al medio de cultivo durante la neurulación.

La migración de las células pigmentadas fue evaluada mediante observación directa de su patrón general de desplazamiento en imágenes obtenidas por estereomicroscopía. La orientación de la migración se analizó de manera cualitativa, comparando embriones control y tratados, considerándose como migración no orientada aquella que no siguió el patrón direccional característico observado en los embriones control durante la neurulación.

Para la cuantificación de la migración celular, se analizaron secuencias de imágenes utilizando el software ImageJ. La posición de células pigmentadas individuales fue determinada en imágenes consecutivas, registrando sus coordenadas espaciales. La distancia total recorrida se calculó a partir del desplazamiento entre la posición inicial y final, expresándose en micrómetros

(μm), mientras que la velocidad de migración se obtuvo como la razón entre la distancia recorrida y el tiempo transcurrido ($\mu\text{m}/\text{min}$).

6.5 Cuantificación de ATP

Los embriones fueron dispuestos en placas de cultivo y tratados con bafilomicina A1 0,125 μM . Las concentraciones de ATP extracelular presentes en 100 μL de sobrenadante, así como los niveles intracelulares de ATP obtenidos a partir del lisado mecánico de tres embriones, fueron cuantificados mediante un ensayo de luminiscencia basado en la reacción luciferina/luciferasa (ATPlite Kit 6016943, Revvity). Como control positivo, se utilizaron embriones tratados con Gramicidina A 100 μM , una molécula capaz de formar poros en la membrana plasmática, facilitando la liberación de ATP al medio extracelular. Como condición control, se utilizaron embriones incubados en solución MMR al 10% con DMSO al 0,1%. También se utilizaron soluciones con una concentración conocida de ATP (0,1 μM , 0,5 μM y 10 μM) con el fin de normalizar los resultados.

6.6 Cuantificación de glutamato

Los embriones fueron dispuestos en placas de cultivo y tratados con bafilomicina A1 0,125 μM . Las concentraciones de glutamato extracelular presentes en 50 μL de sobrenadante, así como los niveles intracelulares de glutamato obtenidos a partir del lisado mecánico de 20 embriones y su posterior dilución 1:5 en MMR al 10%, fueron cuantificados mediante un ensayo de fluorescencia (Glutamate Assay Kit ab252893, Abcam). Como control positivo, se utilizaron embriones

tratados con Gramicidina A 100 μM , una molécula que forma poros en la membrana plasmática, permitiendo la liberación de glutamato al medio extracelular. Como condición control, se utilizaron embriones incubados en solución MMR al 10% con DMSO al 0,1%. También se utilizaron soluciones con una concentración conocida de glutamato (0,4 pmol/ μL , 2 pmol/ μL y 10 pmol/ μL) con el fin de normalizar los resultados.

6.7 Análisis estadístico

Para el análisis estadístico, cada grupo experimental fue comparado con su respectivo control utilizando el software GraphPad Prism versión 8.0. Previo al análisis estadístico se realizó la prueba de Shapiro-Wilk para evaluar la distribución normal de los datos. Las diferencias significativas se evaluaron mediante pruebas t de Student o ANOVA de una vía, según correspondiera, aplicando la corrección de Welch en los análisis paramétricos cuando se detectó desigualdad de varianzas. Las comparaciones post-hoc se realizaron mediante la prueba de Tamhane T2. Se consideraron diferencias estadísticamente significativas aquellos valores de $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***) y $p < 0,0001$ (****). Las expresiones relativas obtenidas mediante ensayos RT-qPCR se expresaron como $\log_2$ del valor obtenido mediante el método $\Delta\Delta\text{CT}$ ($2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$).

7 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Los transcritos y proteínas asociadas a la liberación vesicular de ATP y glutamato están presentes durante el proceso de neurulación.

Con el objetivo de evaluar los niveles de transcritos y de proteínas relacionadas con la liberación vesicular de ATP y glutamato en distintas etapas de la neurulación en embriones de *X. laevis*, se realizaron análisis mediante RT-qPCR y Western blot. Para la realización de estos experimentos se utilizaron embriones de *X. laevis* en distintas etapas de la neurulación: temprana (Estadio 12,5), intermedia (Estadio 14) y tardía (Estadio 20) (Figura 5). Como control positivo se utilizaron muestras de Cerebro Adulto (CA).

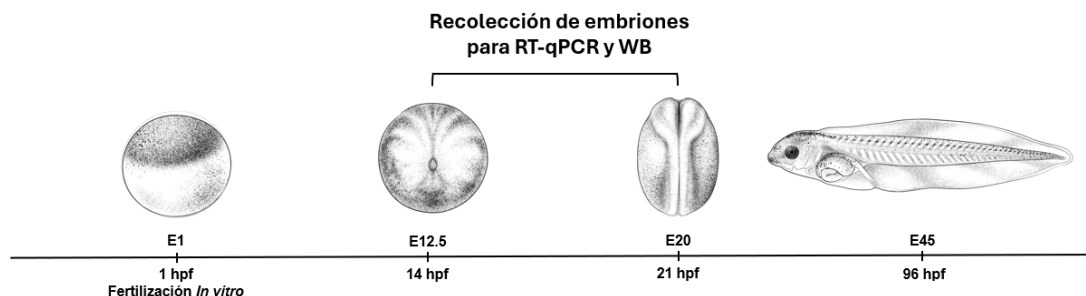


Figura 5. Línea de tiempo de estadios (E) del desarrollo en estudio y periodo de recolección de muestras junto con las horas post-fertilización (hpf)

Para la realización de los ensayos de RT-qPCR y Western blot se tomaron muestras de embriones de *X. laevis* durante el proceso de neurulación, específicamente en los estadios 12,5 (neurulación temprana), 14 (neurulación intermedia) y 20 (neurulación tardía).

7.1.1 Expresión del transportador vesicular de nucleótidos

Con el fin de determinar los niveles de expresión de VNUT durante la neurulación, se llevaron a cabo análisis de RT-qPCR (Figura 6A y B) y Western blot (Figura 6C y D).

Los resultados de RT-qPCR muestran que hay presencia de transcritos de VNUT (Figura 6A) durante la neurulación (estadios 12,5; 14; 20), con niveles de expresión relativa significativamente mayores en comparación con CA (estadio 12,5 y 14 $p < 0,001$; estadio 20 $p < 0,01$).

Mediante Western blot se demostró que la proteína VNUT se expresa durante la neurulación (Figura 6C), sin observarse diferencias significativas en sus niveles de expresión relativa (Figura 6D).

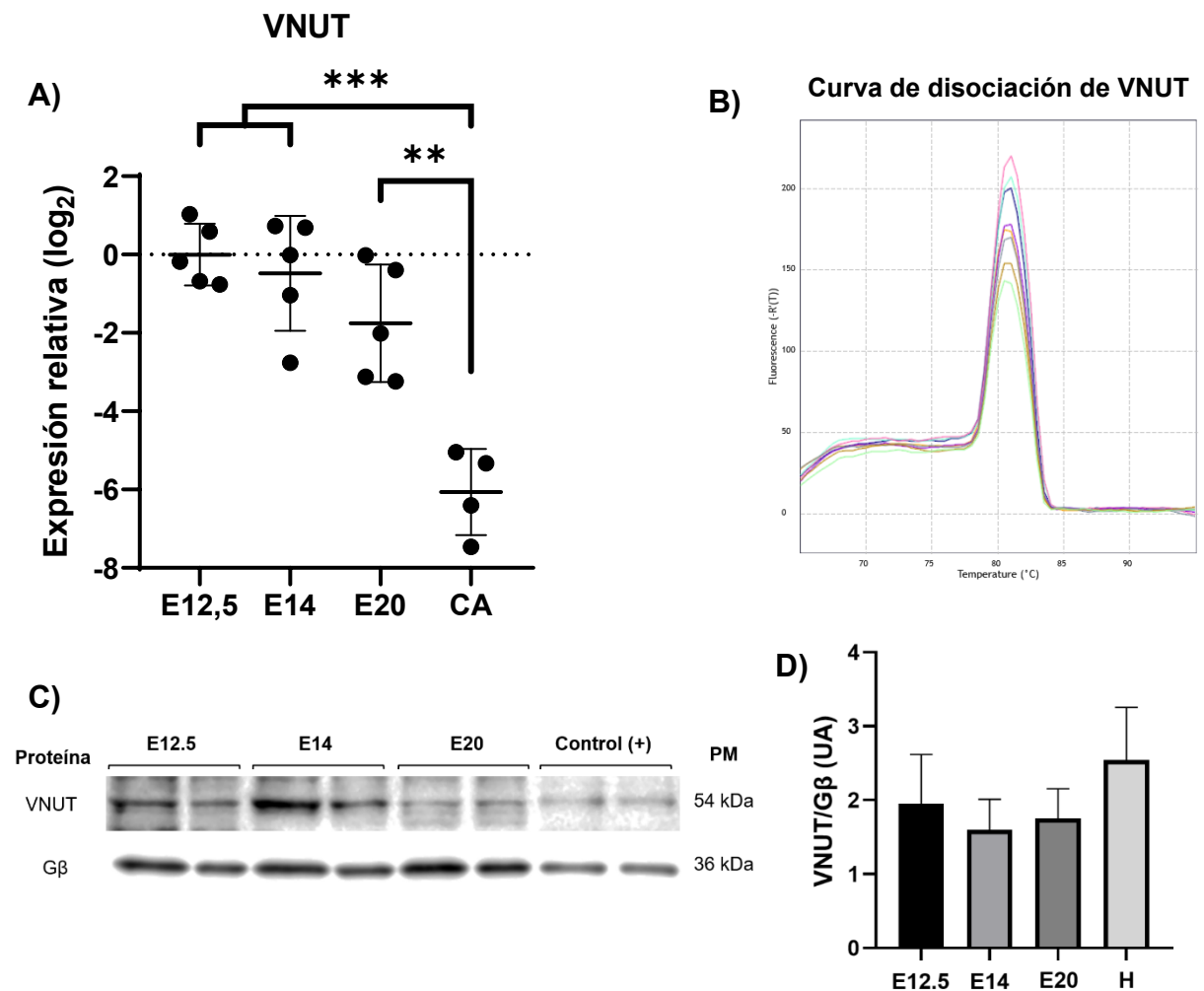


Figura 6. Expresión de VNUT durante la neurulación mediante RT-qPCR y Western blot

(A) RT-qPCR de VNUT en estadios de neurulación (12,5; 14; 20) y Cerebro Adulto (CA). N=4. La expresión transcripcional del transportador fue normalizada con respecto al E12,5. SUB-1 fue utilizado como housekeeping. N=5. **(B)** Curva de disociación de la reacción RT-qPCR correspondiente a VNUT (Amarillo: E12,5; azul: E12,5 réplica; celeste: E14; rosado: E14 réplica; morado: E20; gris: E20 réplica; naranja: CA; verde: CA réplica). **(C)** Western blot de VNUT en estadios de neurulación (12,5; 14 y 20), utilizando hígado (H) como control positivo. **(D)** Cuantificación de los niveles de expresión proteica expresada en unidades arbitrarias (UA). Gβ se usó como control de carga. N=4. ANOVA de una vía (** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$). Las barras de error para los datos representan desviación estándar.

7.1.2 Expresión del transportador vesicular de glutamato

Para evaluar la expresión de VGLUT1, VGLUT2 y VGLUT3 durante la neurulación, se emplearon las técnicas de RT-qPCR (Figura 7A-G) y Western blot (Figura 7H-I).

Los resultados de RT-qPCR indican que existen diferencias significativas en los niveles de transcritos de VGLUT1 (Figura 7A y E) durante la neurulación entre los estadios 12,5 y 20 ($p < 0,01$) y los estadios 14 y 20 ($p < 0,05$). Respecto a VGLUT2 y VGLUT3 (Figura 7B y F; C y G) no hay diferencias significativas de los niveles de expresión relativa durante la neurulación (12,5; 14; 20). Comparando los niveles de expresión relativa de las tres isoformas de VGLUT (Figura 7D), en estadio 20 se observa que VGLUT1 tiene unos niveles de transcritos significativamente mayores que VGLUT2 y VGLUT3 ($p < 0,01$).

Mediante ensayos de Western blot se demostró que la proteína VGLUT1 se expresa durante la neurulación (Figura 7H), sin observarse diferencias significativas en sus niveles de expresión relativa en los estadios estudiados (Figura 7I).

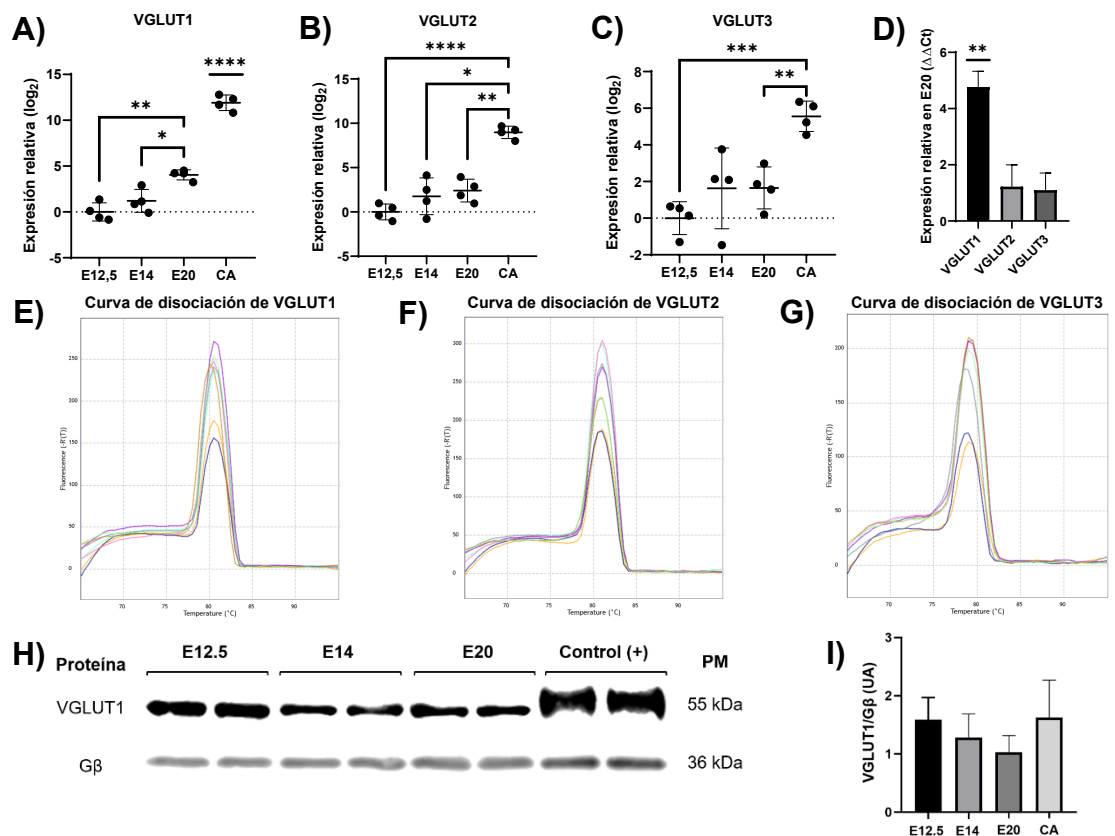


Figura 7. Expresión de VGLUT durante la neurulación mediante RT-qPCR y Western blot

RT-qPCR de VGLUT1 (**A**), VGLUT2 (**B**) y VGLUT3 (**C**) en estadios de neurulación (12,5; 14; 20) y Cerebro Adulto (CA), N=4. La expresión transcripcional del transportador fue normalizada con respecto al E12,5. SUB-1 fue utilizado como housekeeping. (**D**) Análisis comparativo entre los niveles de expresión en E20 obtenidos mediante RT-qPCR de las 3 isoformas de VGLUT, N=3. La expresión transcripcional del transportador fue normalizada a VGLUT3. SUB-1 fue utilizado como housekeeping. Curva de disociación de la reacción RT-qPCR correspondiente a VGLUT1 (**E**), VGLUT2 (**F**) y VGLUT3 (**G**) (Amarillo: E12,5; azul: E12,5 réplica; celeste: E14; rosado: E14 réplica; morado: E20; gris: E20 réplica; naranja: CA; verde: CA réplica). (**H**) Western blot de VGLUT1 en estadios de neurulación (12,5; 14; 20) y Cerebro Adulto (CA). N=4. (**I**) Cuantificación de los niveles de expresión proteica expresada en unidades arbitrarias (UA). Gβ se usó como control de carga. N=4. ANOVA de una vía (* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$; **** = $p < 0,0001$). Las barras de error para los datos representan desviación estándar.

7.1.3 Expresión de la V-ATPasa

Con el objetivo de determinar los niveles de expresión de la V-ATPasa durante la neurulación, se llevaron a cabo análisis de RT-qPCR (Figura 8).

Los resultados obtenidos indican que la V-ATPasa se expresa durante la neurulación (Figura 8A y B), lo que sugiere un posible rol en la generación del gradiente de protones y en la regulación del pH intravesicular de vesículas liberadoras de ATP y glutamato. Considerando que la V-ATPasa es responsable de la acidificación del medio intravesicular, un proceso esencial para el almacenamiento vesicular de estos neurotransmisores como ATP y glutamato (Eriksen et al., 2016; Herzog et al., 2001; Moriyama et al., 2017; Preobraschenski et al., 2014; Sawada et al., 2008; Schenck et al., 2009; Varoqui et al., 2002), se llevaron a cabo experimentos dirigidos a inhibir su función, con el objetivo de dilucidar su participación durante la neurulación, cuyos resultados son presentados en secciones posteriores.

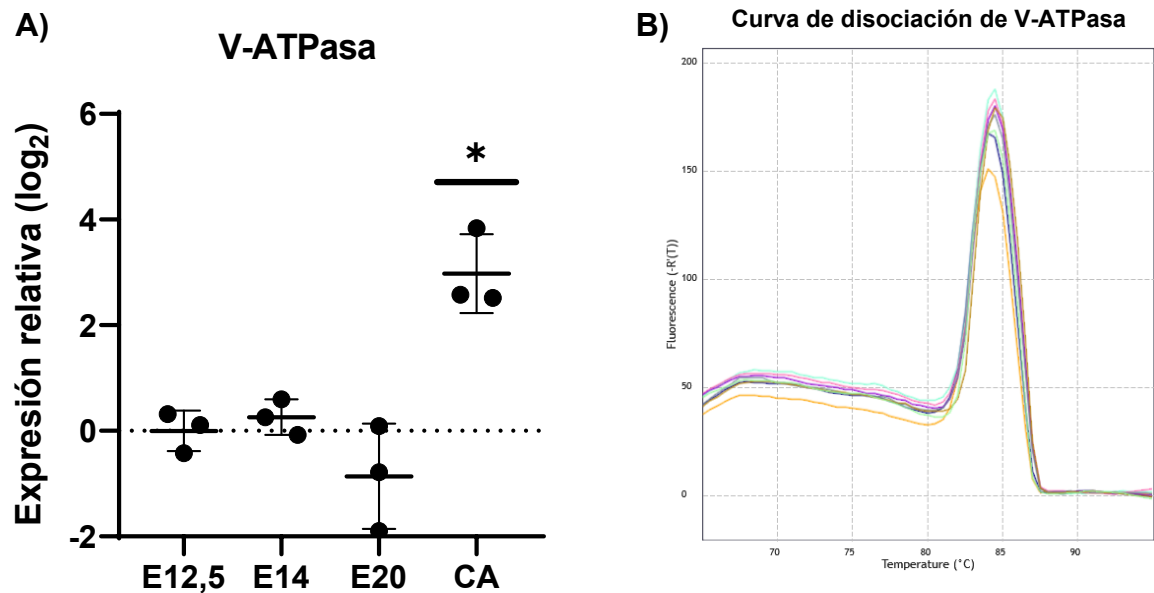


Figura 8. Expresión de la V-ATPase durante la neurulación mediante RT-qPCR

(A) RT-qPCR de la V-ATPase en estadios de neurulación (12,5; 14; 20) y Cerebro Adulto (CA). N=4. La expresión del transcrito perteneciente al transportador fue normalizada con respecto al E12,5. SUB-1 fue utilizado como housekeeping. ANOVA de una vía (* = $p < 0,05$). Las barras de error para los datos representan la desviación estándar. **(B)** Curva de disociación de la reacción RT-qPCR correspondiente a la V-ATPase (Amarillo: E12,5; azul: E12,5 réplica; celeste: E14; rosado: E14 réplica; morado: E20; gris: E20 réplica; naranja: CA; verde: CA réplica).

7.1.4 Expresión de transcritos asociados a proteínas SNARE

Se realizaron análisis de RT-qPCR con el objetivo de determinar los niveles de expresión de los transcritos asociados a proteínas SNARE (SYT1, SNAP25, VAMP1, VAMP2, STX1A y STX1B) relevantes para la fusión y liberación del contenido vesicular durante la neurulación (Hanson et al., 1997; Südhof, 2004, 2013; Südhof & Rothman, 2009), (Figura 9).

Los resultados obtenidos indican que durante la neurulación se expresan transcritos de SYT1, SNAP25, VAMP1, VAMP2, STX1A y STX1B (Figura 9A-F). Entre ellos, SYT1 (Figura 9A) muestra una expresión significativamente mayor en comparación con el control CA ($p < 0,01$). El número de copias de transcritos pertenecientes a SNAP25 (Figura 9B) aumenta de forma significativa durante la neurulación.

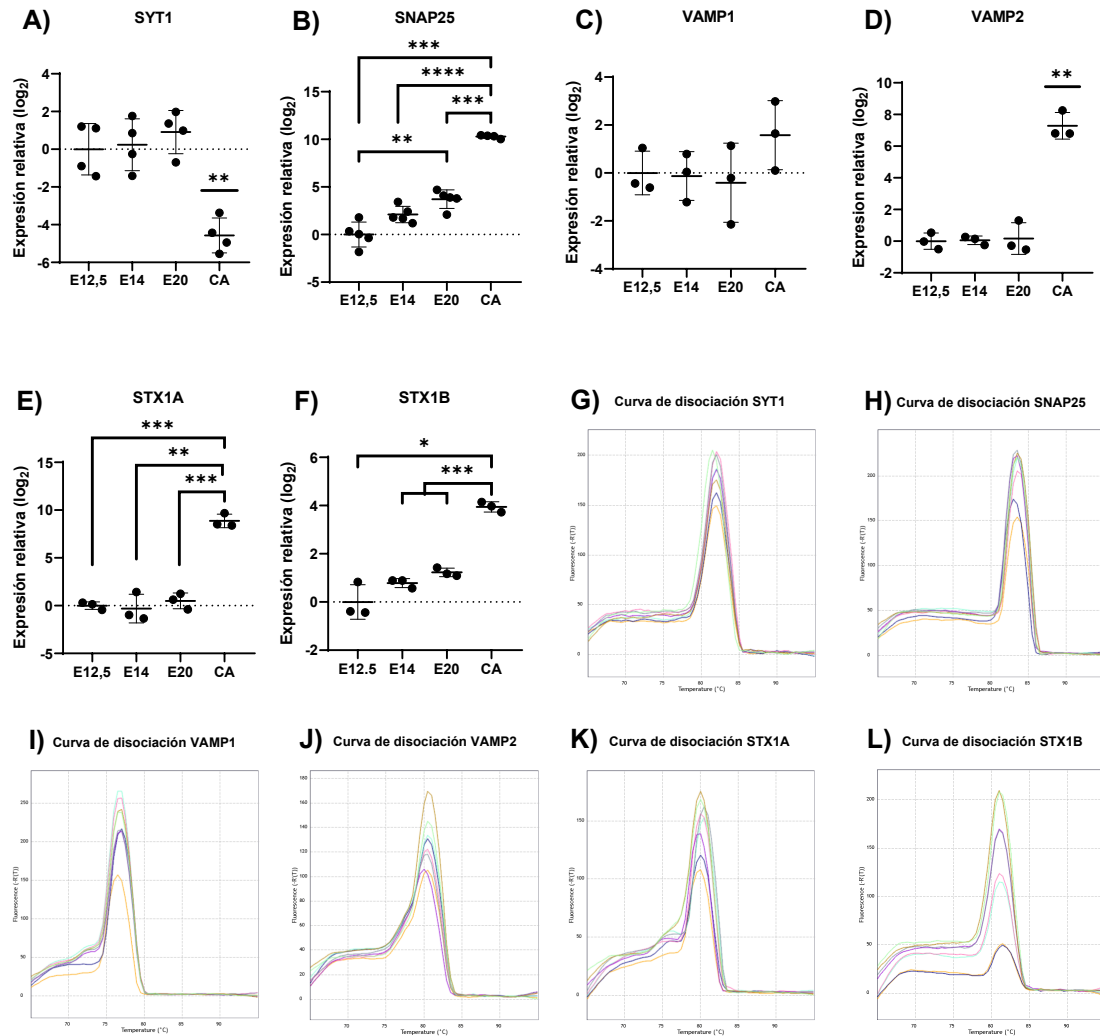


Figura 9. Expresión de transcritos SNARE durante la neurulación mediante RT-qPCR

RT-qPCR de (A) SYT1, (B) SNAP25, (C) VAMP1, (D) VAMP2, (E) STX1A y (F) STX1B en estadios de neurulación (12,5; 14; 20) y Cerebro Adulto (CA), N=3 (al menos). Con sus respectivas curvas de disociación (G-L) (Amarillo: E12,5; azul: E12,5 réplica; celeste: E14; rosado: E14 réplica; morado: E20; gris: E20 réplica; naranja: CA; verde: CA réplica). SUB-1 fue utilizado como housekeeping. ANOVA de una vía (* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$; **** = $p < 0,0001$). Las barras de error para los datos representan desviación estándar.

7.1.5 Discusión

Los resultados obtenidos indican que los transcritos y proteínas relacionadas con la liberación vesicular de ATP y glutamato se expresan durante la neurulación en embriones de *X. laevis*, lo que sugiere que estos componentes se encuentran disponibles molecularmente durante este periodo del desarrollo embrionario.

Durante la neurulación, el transcrito asociado al transportador vesicular de nucleótidos (VNUT) presenta niveles significativamente mayores en comparación al control Cerebro Adulto (CA), por lo que el mecanismo de liberación vesicular de nucleótidos y/o mediado por gránulos o lisosomas secretorios podría ser relevante durante la formación del tubo neural.

En este contexto, la presencia de VNUT durante la neurulación resulta concordante con antecedentes que indican que el ATP cumple funciones relevantes durante el desarrollo embrionario, actuando como una molécula señalizadora involucrada en procesos como proliferación, diferenciación y migración celular. Diversos estudios han demostrado que la señalización purinérgica se encuentra activa en etapas tempranas del desarrollo del sistema nervioso, incluso antes de la formación de sinapsis funcionales, lo que sugiere un rol no clásico del ATP durante la morfogénesis neural (Rathbone et al., 1999; Zimmermann, 2011).

En *X. laevis*, se ha descrito previamente la participación de la señalización purinérgica durante la neurulación, incluyendo la expresión de receptores

purinérgicos en la placa neural y su implicancia funcional en el cierre del tubo neural. En este sentido, la expresión de VNUT observada en este trabajo aporta evidencia adicional que sugiere la presencia de mecanismos celulares capaces de contribuir a la disponibilidad de ATP extracelular durante este proceso (Bogdanov et al., 1997; Massé & Dale, 2012).

En cuanto a los transportadores vesiculares de glutamato (VGLUT), se observó una expresión diferencial de sus isoformas durante la neurulación mediante los ensayos de RT-qPCR. En particular, VGLUT1 tiene un aumento progresivo en la expresión relativa de transcritos durante la formación del tubo neural, mientras que VGLUT2 y VGLUT3 no mostraron cambios significativos en su expresión durante la neurulación. Del análisis comparativo de la expresión relativa de los transcritos de las tres isoformas de VGLUT, se observa que VGLUT1 presenta una mayor expresión en el estadio 20. Estos resultados sugieren que VGLUT1 podría tener una mayor contribución relativa potencial al llenado vesicular de glutamato durante la formación del tubo neural.

Al evaluar la expresión proteica de VGLUT1 mediante Western blot, no se detectaron diferencias significativas en los niveles de expresión de VGLUT1 durante la neurulación. Esta discrepancia entre los resultados de RT-qPCR y Western blot podría explicarse por una estabilidad diferencial entre el ARNm y la proteína, mecanismos de regulación postraducciona, variaciones en la eficiencia de traducción o procesos de reciclaje y degradación proteica que mantengan

niveles relativamente constantes de VGLUT1 (Mehra et al., 2003; Melo et al., 2013; Oni-Orisan et al., 2008).

La expresión temprana de transportadores vesiculares de glutamato durante etapas previas a la sinaptogénesis ha sido descrita en otros modelos de vertebrados. En particular, se ha observado que VGLUT2 presenta expresión durante el desarrollo embrionario y que su inactivación genética se asocia a alteraciones severas en el desarrollo del sistema nervioso, lo que resalta la relevancia de la señalización glutamatérgica durante etapas tempranas del desarrollo (Dumas & Wallén-Mackenzie, 2019; Majumdar & Wu, 2025; Miyazaki et al., 2003; Moechars et al., 2006; Ohmomo et al., 2011). Si bien el glutamato es reconocido principalmente por su función como neurotransmisor excitatorio en el sistema nervioso maduro, existe evidencia que indica que la señalización glutamatérgica cumple funciones durante el desarrollo embrionario independientes de la neurotransmisión sináptica clásica. Estas funciones incluyen la regulación de procesos como migración celular y diferenciación neuronal, los cuales son fundamentales para la neurulación (Komuro & Rakic, 1993; Manent & Represa, 2007; Spitzer, 2006).

Los ensayos de RT-qPCR demuestran que hay expresión de los transcritos asociados a la V-ATPasa durante la neurulación, lo cual es consistente con su función en la acidificación del medio intravesicular, un requisito esencial para el almacenamiento de ATP y glutamato mediado por VNUT y VGLUT (Eriksen et al.,

2016; Herzog et al., 2001; Moriyama et al., 2017; Preobraschenski et al., 2014; Sawada et al., 2008; Schenck et al., 2009; Varoqui et al., 2002). En este sentido, la alteración de la función de la V-ATPasa con inhibidores específicos podría ayudar a dilucidar la participación y funcionalidad de la liberación de ATP y glutamato dependiente de vesículas durante la formación del tubo neural.

Adicionalmente, mediante RT-qPCR se detectó la expresión de SYT1, SNAP25, VAMP1, VAMP2, STX1A y STX1B durante la neurulación. En particular, la mayor expresión de SYT1 en comparación con la muestra de CA sugiere una posible asociación con la regulación del calcio para la exocitosis en etapas tempranas del desarrollo del SNC. Por otro lado, el alza en la expresión SNAP25 detectada en estadio 20 refuerzan la idea de la participación que podría tener la liberación de ATP y/o glutamato dependiente de vesículas durante el cierre del tubo neural.

La detección de transcritos asociados a proteínas del complejo SNARE durante la neurulación es consistente con reportes previos que indican que la maquinaria de fusión vesicular se expresa en etapas tempranas del desarrollo, incluso antes de la formación de sinapsis, sugiriendo un rol en procesos de secreción regulada durante el desarrollo embrionario (Südhof, 2004; Südhof & Rothman, 2009).

En un sistema nervioso adulto, estos transportadores y proteínas SNARE juegan un papel fundamental en la neurotransmisión sináptica. VGLUT1, por ejemplo, se encuentra predominantemente en sinapsis excitatorias de regiones corticales y del hipocampo, siendo esencial para el almacenamiento de glutamato en

vesículas sinápticas (Fremeau et al., 2001). VNUT regula la liberación de ATP en procesos de señalización purinérgica, influyendo en la modulación sináptica y la comunicación glía-neurona (Bowser & Khakh, 2007; Coco et al., 2003; Imura et al., 2013; Zhang et al., 2007). La V-ATPasa, a su vez, es esencial en la acidificación vesicular en células neuronales maduras, lo que permite un transporte eficiente de glutamato y ATP por VGLUT y VNUT, respectivamente (Eriksen et al., 2016; Herzog et al., 2001; Moriyama et al., 2017; Preobraschenski et al., 2014; Sawada et al., 2008; Schenck et al., 2009; Varoqui et al., 2002). Finalmente, los componentes del complejo SNARE, como SNAP25, VAMP y STX1, son imprescindibles para la fusión de vesículas sinápticas y la liberación de neurotransmisores por parte de células del SNC, facilitando la transmisión de señales en el sistema nervioso central (Hanson et al., 1997; Südhof, 2004, 2013; Südhof & Rothman, 2009).

En conjunto, estos hallazgos sugieren que tanto ATP como glutamato podrían estar asociados a mecanismos de liberación dependientes de vesículas durante la neurulación, respaldado por la expresión de componentes clave como transportadores vesiculares, transcritos SNARE y la V-ATPasa. La relevancia y funcionalidad de este mecanismo durante la neurulación requerirá estudios adicionales, incluyendo experimentos que inhiban la V-ATPasa, evaluando su impacto en la morfogénesis del tubo neural, así como en la función de la liberación vesicular de ATP y glutamato.

7.2 El tratamiento de embriones de *Xenopus laevis* con bafilomicina A1 durante la neurulación induce defectos del tubo neural

Con el objetivo de evaluar el impacto de la inhibición de la liberación vesicular sobre el desarrollo del tubo neural, se trataron embriones de *X. laevis* con BafA1 durante la neurulación. Posteriormente, se analizó el fenotipo resultante en dos etapas: estadio 20, correspondiente al cierre del tubo neural, y estadio 45, que corresponde a la etapa de larva inicial. Esta estrategia experimental permitió caracterizar los efectos fenotípicos inducidos por la inhibición de la V-ATPasa, particularmente sobre la morfología del tubo neural y el desarrollo a largo plazo de la anatomía anteroposterior.

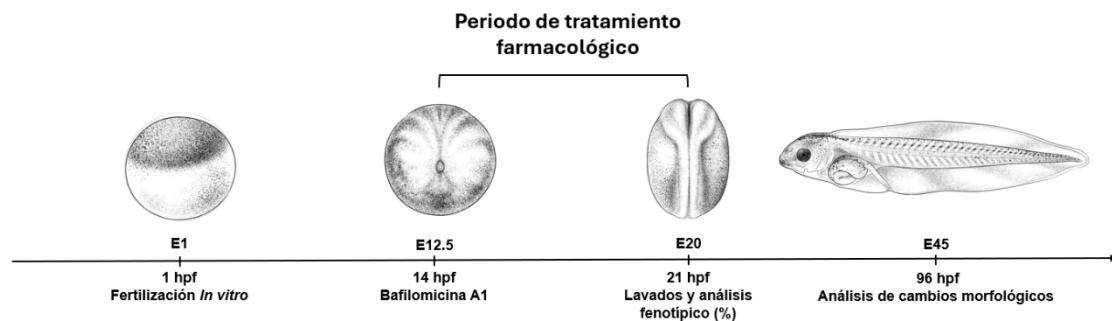


Figura 10. Línea de tiempo de los estadios (E) estudiados y periodo de tratamiento con bafilomicina A1 junto con las horas post-fertilización (hpf)

Los ensayos con BafA1 se realizaron en embriones en estadio 12,5 (neurulación temprana), los cuales fueron incubados en concentraciones crecientes de BafA1 hasta llegar a estadio 20 (neurulación tardía). Una vez finalizada la neurulación, los embriones fueron lavados tres veces con solución MMR al 10%, durante 5 minutos en cada lavado. Posteriormente se permitió el desarrollo de los embriones hasta alcanzar el estadio 45.

7.2.1 Evaluación fenotípica en estadio 20

Para evaluar el impacto de la inhibición del llenado vesicular con ATP y glutamato durante la neurulación, se trataron embriones de *X. laevis* con BafA1, un inhibidor específico de la V-ATPasa (Hanada et al., 1990; Yoshimori et al., 1991), proteína esencial para el llenado de vesículas con ATP y glutamato (Eriksen et al., 2016; Herzog et al., 2001; Moriyama et al., 2017; Preobraschenski et al., 2014; Sawada et al., 2008; Schenck et al., 2009; Varoqui et al., 2002). El tratamiento se realizó desde el inicio de la neurulación (estadio 12,5) hasta el cierre del tubo neural (estadio 20), momento en el cual se evaluó el porcentaje de incidencia de DTN (Figura 10).

La evaluación fenotípica de embriones tratados con BafA1 indica que la inhibición de la V-ATPasa desde el comienzo de la neurulación hasta su final induce DTN con una tendencia a un aumento en su incidencia de manera concentración dependiente, evidenciando un fenotipo de tubo abierto (cierre incompleto). Esto se correlaciona con una apertura del tubo neural que aumenta en su severidad de manera concentración dependiente (Figura 11). Sin embargo, este no es un efecto permanente, ya que el tubo neural de los embriones tratados también completa su cierre, sugiriendo que BafA1 preliminarmente produce un retraso en el cierre del tubo neural.

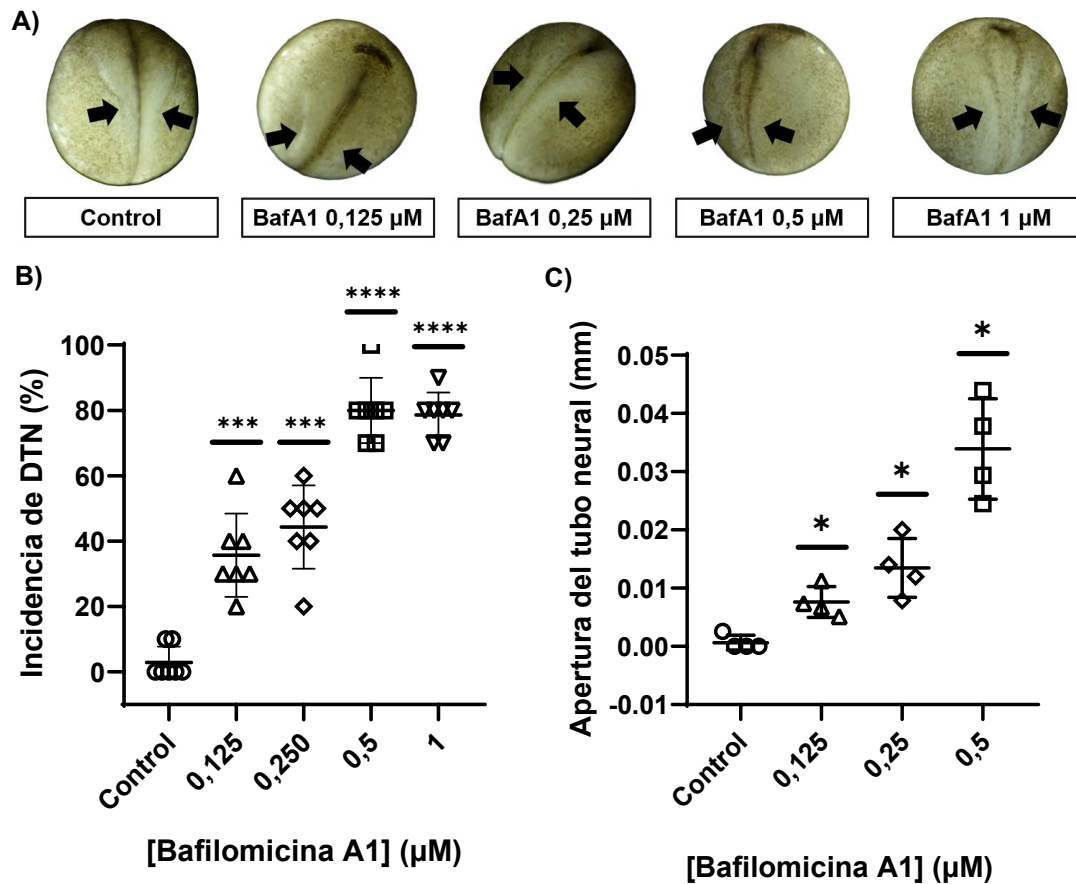


Figura 11. Evaluación fenotípica en estadio 20 de embriones tratados con bafilomicina A1 durante la neurulación

(A) Fotografías realizadas a embriones tratados con BafA1 comparado con el control (DMSO 0,1%). **(B)** Porcentaje de embriones con fenotipo alterado (DTN) en estadio 20, N=6 grupos independientes de embriones fertilizados; 10 réplicas para cada condición. **(C)** Cuantificación de la apertura en milímetros (mm) del tubo neural en estadio 20, N=4 grupos independientes de embriones fertilizados con 10 réplicas para cada condición. ANOVA de una vía (* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$; **** = $p < 0,0001$). Las barras de error para los datos representan desviación estándar.

7.2.2 Evaluación de la migración lateromedial durante la neurulación

Considerando los resultados previos, que evidencian un retraso en el cierre del tubo neural en embriones expuestos a BafA1, se analizó la migración de las células neuroepiteliales, un proceso fundamental para la correcta formación del tubo neural que implica su desplazamiento desde regiones laterales hacia la línea media. (Davidson & Keller, 1999; Greene & Copp, 2014; Ybot-Gonzalez et al., 2007). La literatura indica que alteraciones en esta migración se asocian con la aparición de DTN (Greene & Copp, 2014; Wallingford & Harland, 2002; Ybot-Gonzalez et al., 2007). Mediante la captura de fotografías cada 60 segundos de la última fase de la formación del tubo neural (3 horas), se hizo el seguimiento de la migración de células neuroepiteliales pigmentadas de embriones tratados con BafA1 (0,5 μ M). La orientación de la migración fue evaluada de manera cualitativa en función del patrón general de desplazamiento de las células pigmentadas, considerándose como migración no orientada aquella que no siguió el patrón direccional observado en los embriones control. Se observó una alteración en la orientación de la migración de las células pigmentadas de los embriones tratados con BafA1, los cuales presentan una migración con una orientación que va de posterior a anterior en la región rostral y de anterior a posterior en la región caudal del embrión, mientras que en los embriones no tratados (Control), las células de ambas regiones migran de posterior a anterior (Figura 12A y B). Adicionalmente, se observó que la velocidad de migración y, en consecuencia, la distancia recorrida de las células pigmentadas en los embriones tratados es

significativamente menor que en el control (Figura 12C y D). Este hallazgo concuerda con los experimentos previos que evidenciaron una demora en el cierre del tubo neural, probablemente vinculada a alteraciones de la migración, lo que reduce la distancia recorrida durante la formación del tubo neural.

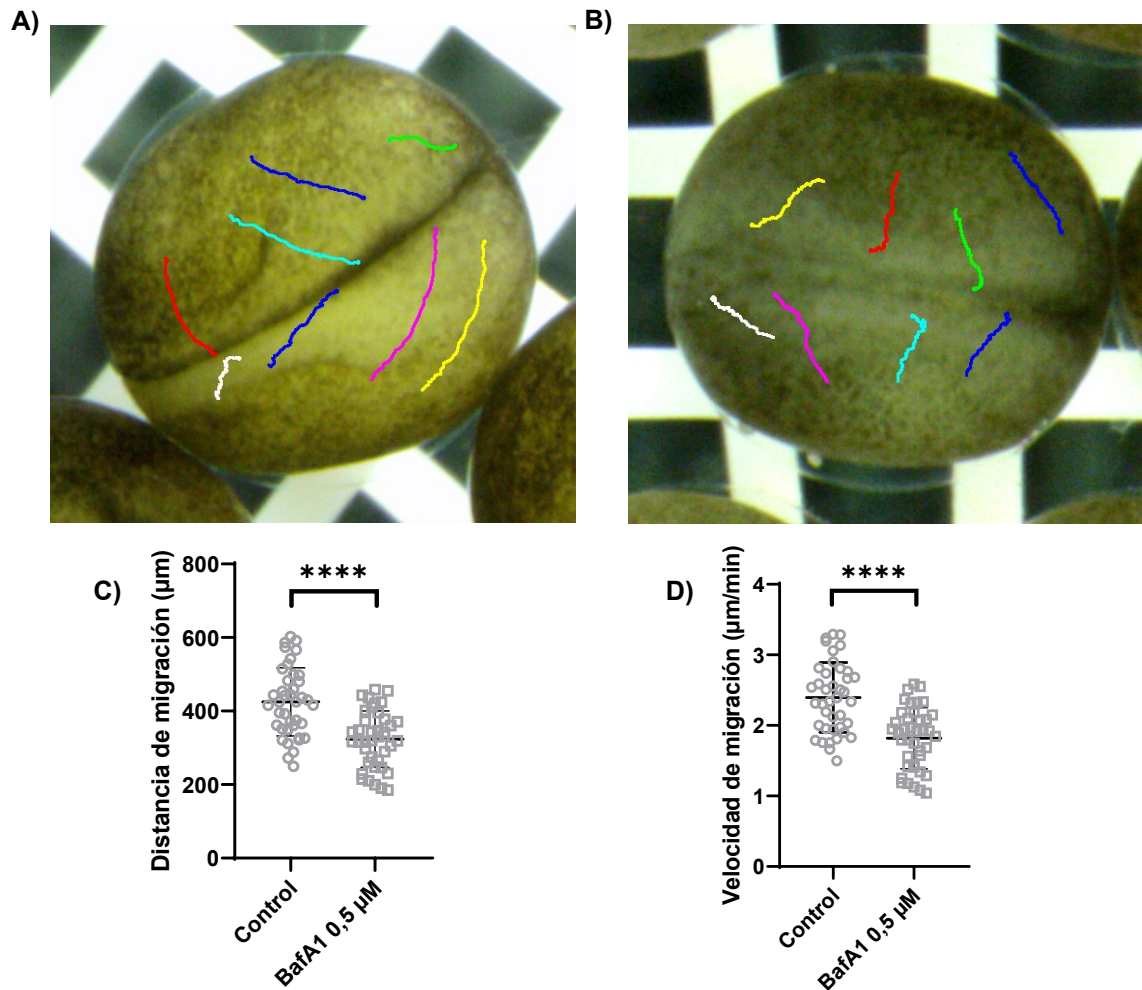


Figura 12. Evaluación de la migración orientada de células pigmentadas durante la formación del tubo neural bajo tratamiento con BafA1

(A) Embrión de *X. laevis* indicando la orientación de la migración de las células pigmentadas del neuroepitelio. Esta condición corresponde al control. (B) Embrión de *X. laevis* indicando la orientación de la migración de las células pigmentadas del neuroepitelio. Esta condición corresponde al tratado con BafA1 (0,5 μ M). La orientación se evaluó cualitativamente en función del patrón general de desplazamiento de las células pigmentadas en comparación al control. (C) Determinación de la distancia de migración de las células pigmentadas de embriones y (D) de la velocidad de migración (μ m/min) de las células pigmentadas de embriones tratados con BafA1 y controles no tratados. N=5 embriones. Se utilizó la prueba *t* de Student (**** = $p < 0,0001$). Las barras de error para los datos representan desviación estándar.

7.2.3 Evaluación fenotípica en estadio 45

Dado que la literatura señala que alteraciones en el cierre del tubo neural pueden condicionar el desarrollo de un organismo, manifestando alteraciones en estadios posteriores a la neurulación (Adzick, 2009; Copp et al., 2013; Devotta et al., 2016; Rolo et al., 2008; Sequerra et al., 2018) los embriones previamente tratados se desarrollaron desde el estadio 20 en medio MMR al 10% (libre de BafA1) hasta alcanzar el estadio 45 (desarrollo larval temprano). Solo aquellos embriones expuestos a concentraciones de BafA1 $\leq 0,5 \mu\text{M}$ lograron desarrollarse hasta este estadio, ya que concentraciones mayores resultaron en efectos tóxicos letales en etapas posteriores al estadio 20.

En el estadio 45, los embriones tratados con BafA1 durante la neurulación a concentraciones $\geq 0,25 \mu\text{M}$ presentaron una longitud significativamente mayor que los controles, sin otros efectos morfológicos aparentes (Figura 13).

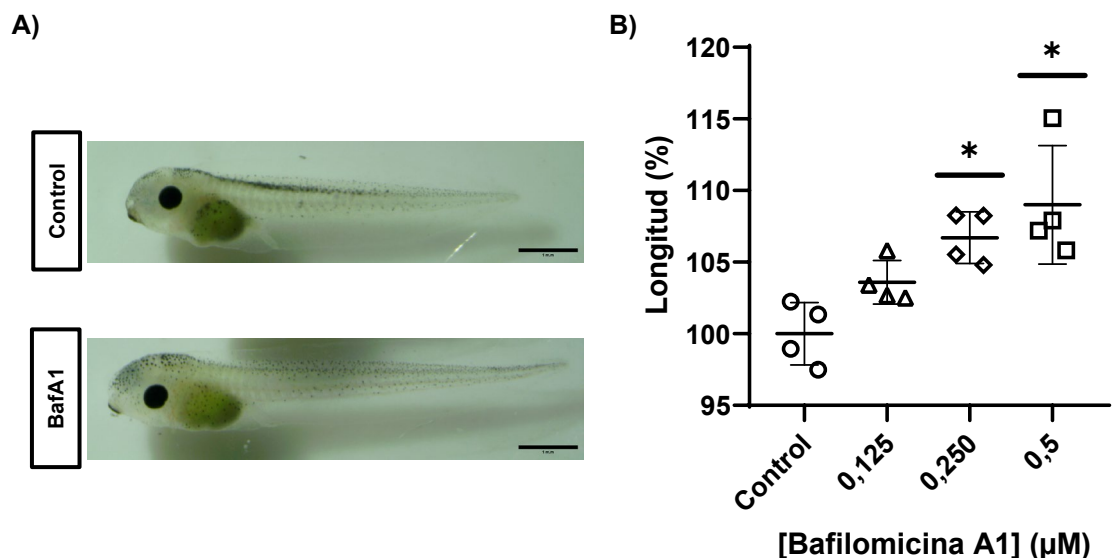


Figura 13. Evaluación fenotípica en estadio 45 de embriones tratados con bafilomicina A1 durante la neurulación

(A) Fotografías realizadas a larvas (estadio 45) de embriones tratados con BafA1 durante la neurulación. **(B)** Cuantificación de la longitud de las larvas. Las mediciones se normalizaron con respecto al grupo control, expresándose los resultados en porcentaje (%), N=4 grupos independientes de embriones fertilizados con 10 réplicas para cada condición. La barra de escala equivale a 1 mm. ANOVA de una vía (* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$). Las barras de error para los datos representan desviación estándar.

7.2.4 Evaluación de rescate fenotípico en estadio 20

Los antecedentes disponibles indican que, durante la neurulación, la actividad del receptor NMDA es crítica, ya que su inhibición con D-AP5 o reducción de la expresión de la subunidad GluN1 induce defectos del tubo neural (Sequerria et al., 2018). El glutamato, agonista endógeno de este receptor, actúa mediante señalización paracrina en el SNC. En este contexto, se postula que la inhibición de la liberación vesicular de glutamato por BafA1 durante la neurulación alteraría

la señalización mediada por el receptor NMDA, lo que explicaría los efectos observados previamente. Para evaluar esta hipótesis, se incubaron embriones de *X. laevis* con BafA1 en presencia de NMDA (agonista específico del receptor NMDA), con el objetivo de determinar un eventual rescate del fenotipo descrito en experimentos anteriores.

Los resultados muestran que el tratamiento combinado con BafA1 y NMDA, iniciado en el estadio 12,5, rescata el fenotipo inducido previamente por BafA1 en embriones de *X. laevis* (Figura 14). La administración de NMDA (10 μ M) reduce de manera significativa el número de embriones con defectos del tubo neural (DTN) expuestos a BafA1 a 0,125 y 0,25 μ M (Figura 14A). Asimismo, la apertura del tubo neural en los embriones co-tratados con NMDA (10 μ M) es significativamente menor que en aquellos tratados únicamente con BafA1 0,125 y 0,25 μ M (Figura 14B).

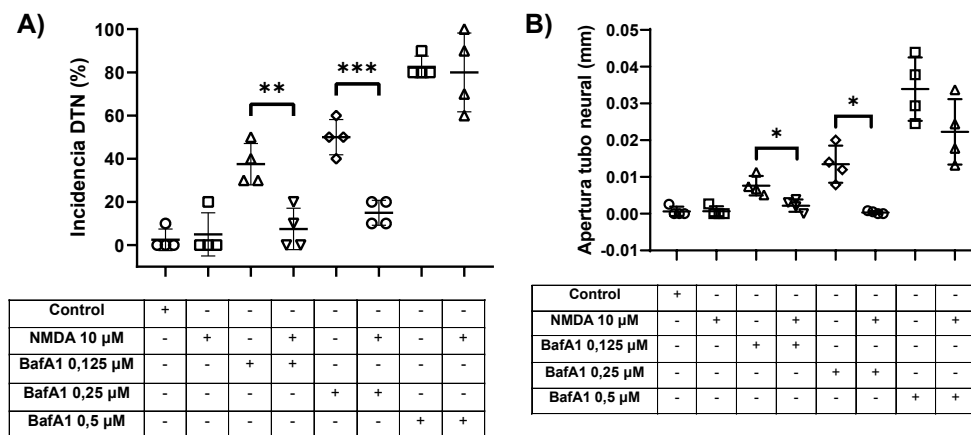


Figura 14. Evaluación fenotípica de embriones con BafA1 y NMDA durante la neurulación

(A) Porcentaje de embriones con fenotipo de defecto del tubo neural (DTN) en estadio 20 tras tratamiento con BafA1 y/o NMDA. **(B)** Apertura del tubo neural (mm) en estadio 20. N = 4 grupos independientes de embriones fertilizados; 10 réplicas por condición en cada grupo. Se utilizó la prueba *t* de Student para las comparaciones entre los grupos tratados con BafA1 y co-tratados con BafA1 + NMDA (* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** $p < 0,001$). Las barras de error para los datos representan desviación estándar.

7.2.5 Discusión

Los resultados de las evaluaciones fenotípicas indican que la V-ATPasa participa en el cierre del tubo neural, ya que su inhibición compromete la velocidad con la que este proceso se completa. Asociado a esto, la migración de las células del neuroepitelio fue alterada, afectando tanto la orientación, la distancia recorrida como la velocidad de desplazamiento celular durante la formación del tubo neural. Además, el efecto fenotípico observado al inhibir la V-ATPasa con BafA1 puede ser prevenido, al menos parcialmente, mediante el tratamiento con NMDA, lo que sugiere que la señalización mediada por la liberación vesicular de

glutamato es relevante para el correcto cierre del tubo neural. Este efecto es consistente con antecedentes que indican que la señalización glutamatérgica mediada por receptores NMDA cumple funciones durante etapas tempranas del desarrollo neural, incluyendo regulación de migración celular y morfogénesis, incluso antes del establecimiento de sinapsis maduras (Komuro & Rakic, 1993; Manent & Represa, 2007; Spitzer, 2006).

Respecto a la señalización mediada por ATP, es posible que esta también sea relevante durante la neurulación. La constricción apical es un proceso celular mediado por actina filamentosa (F-actina) que induce la polarización de las células de neuroepitelio, dando lugar a “puntos de bisagra” que permiten el plegamiento del tejido neuroepitelial y la convergencia de los pliegues neurales (Christodoulou & Skourides, 2015; Morita et al., 2010). En *Xenopus*, se ha descrito recientemente que ATP activa P2Y2 para regular contractilidad supracelular vía actomiosina en epitelios embrionarios, un mecanismo directamente relacionado con la constricción apical y el plegamiento tisular requeridos para el cierre del tubo neural (Joshi et al., 2025). De forma más general, la literatura del desarrollo apoya funciones del ATP/P2 en proliferación, migración y diferenciación de células neurales (Agresti et al., 2005; Lin et al., 2006; Manent & Represa, 2007; Rimbart et al., 2023). Así, aunque aquí sólo se demostró un rescate con NMDA, nuestros datos son compatibles con un segundo eje de señalización ATP/P2 que podría potencialmente cooperar con el glutamato para sostener las dinámicas de citoesqueleto necesarias para el cierre del tubo

neural. Experimentos futuros tendrán por objetivo dilucidar la relevancia de la señalización mediada por ATP durante la neurulación, mediante experimentos de rescate con la aplicación de ATP al medio de incubación.

Es de considerar, que la V-ATPasa no solo participa en el llenado vesicular de moléculas señalizadoras, sino que también en el proceso de la autofagia, permitiendo la acidificación lisosomal y activación de enzimas hidrolasas ácidas que degradan los componentes celulares (Nishi & Forgac, 2002; Stevens & Forgac, 1997). Este proceso de degradación lisosomal permite el reciclaje de componentes celulares, como del citoesqueleto de actina filamentosa (Zhuo et al., 2013), lo que podría contribuir al equilibrio dinámico que permite el fenómeno de constricción apical, por lo que una alteración en la remodelación del citoesqueleto de actina, a causa de la inhibición de la autofagia por BafA1, podría explicar en parte el fenotipo observado, dado que NMDA solo fue capaz de recuperar parcialmente el fenotipo producido por BafA1.

La diabetes materna en ratones suprime la autofagia en el desarrollo del neuroepitelio e induce DTN en el feto. Este defecto fenotípico es prevenido con la administración de trehalosa, el cual es un inductor autofágico en modelos *in vitro* (Sarkar et al., 2007; Xu et al., 2013).

AMBRA1 (de sus siglas en inglés, Activating Molecule in Beclin1-Regulated Autophagy) es un regulador crucial de la iniciación de la autofagia, y su deficiencia en ratones lleva a la exencefalia y/o la espina bífida, dos formas de

DTN (Maria Fimia et al., 2007). Mutaciones asociadas a este gen han sido encontradas en personas con DTN, las cuales afectan la inducción de la autofagia y producen DTN en embriones de peces de cebra (Ye et al., 2020).

Adicionalmente, la autofagia regula procesos de proliferación celular al modular la estabilidad de proteínas. Entre ellas se encuentra la ciclina D, una proteína que regula la transición de G1 a S en el ciclo celular, promoviendo la división celular. Su degradación mediante autofagia genera un efecto supresor de la proliferación (Chaikovsky et al., 2021; Cianfanelli et al., 2014; Pua et al., 2007; Sherr et al., 2016). Estudios indican un aumento en la proliferación de células del tubo neural en modelos de ratones con espina bífida con respecto al fenotipo control, sugiriendo la relevancia de este evento celular en la neurulación (Keller-Peck & Mullen, 1997). En humanos, se ha reportado un aparente incremento en el volumen del tejido del tubo neural disráfico, caracterizado como un “crecimiento excesivo” (Lemire et al., 1965).

La evidencia disponible respalda la relevancia de la autofagia en la formación del tubo neural. En este contexto, es pertinente considerar que la inhibición de la autofagia por BafA1 podría participar, junto con la reducción de la liberación vesicular de glutamato, en el fenotipo observado durante la neurulación.

En trabajos futuros, se evaluará el co-tratamiento con BafA1 y rapamicina. Esta última promueve la autofagia mediante la inhibición del complejo mTORC1 (Ballou & Lin, 2008; Dunlop & Tee, 2014).

En relación con el aumento en la longitud de los embriones en estadio 45, este fenómeno no es común en modelos animales con DTN. Estos defectos generalmente se asocian con una reducción en la longitud del eje anteroposterior debido a la alteración de los procesos de extensión y convergencia durante la neurulación (Keller et al., 1992; Wallingford & Harland, 2002; Ybot-Gonzalez et al., 2007). Estos procesos son fenómenos morfogénicos fundamentales para el cierre del tubo neural, caracterizados por una reorganización celular en la que las células se intercalan, provocando un estrechamiento en un eje (convergencia) y un alargamiento en el eje perpendicular (extensión) (Keller et al., 1992; Ybot-Gonzalez et al., 2007). Este mecanismo podría verse alterado durante la neurulación en los embriones tratados con BafA1, lo que resultaría en un retraso en el cierre del tubo neural. Sin embargo, podrían estar presentes mecanismos compensatorios que intenten restaurar el proceso de extensión y convergencia alterado. Si bien este tipo de compensación no ha sido descrito directamente en la literatura durante la neurulación, una vez retirado el fármaco del medio, el fenómeno de extensión podría ocurrir durante un período más prolongado o con mayor eficiencia.

Una estrategia para evaluar los efectos de BafA1 en el fenómeno de extensión y convergencia, es caracterizar la organización del citoesqueleto de actina mediante tinción con faloidina y microscopía de fluorescencia, tanto al término del cierre del tubo neural como en etapas posteriores.

7.3 Bafilomicina A1 disminuye los niveles extracelulares de ATP y glutamato durante la neurulación.

BafA1 es un inhibidor de la V-ATPasa, proteína clave para el transporte de ATP y glutamato por VNUT y VGLUT, respectivamente (Eriksen et al., 2016; Herzog et al., 2001; Moriyama et al., 2017; Preobraschenski et al., 2014; Sawada et al., 2008; Schenck et al., 2009; Varoqui et al., 2002). Se cuantificaron los niveles extracelulares e intracelulares de ATP y glutamato en embriones tratados con BafA1 durante la neurulación, con el fin de evaluar la funcionalidad de un sistema de liberación vesicular para estas moléculas durante la formación del tubo neural.

7.3.1 Cuantificación de los niveles de ATP

Para evaluar la funcionalidad de un sistema de liberación de ATP dependiente de vesículas durante la neurulación se incubaron embriones de *X. laevis* con BafA1 0,125 μ M en medio MMR al 10%, desde el estadio 12,5 (neurulación temprana) hasta el estadio 18 (previo al cierre completo del tubo neural). Posteriormente, se cuantificaron los niveles de ATP extracelulares e intracelulares (Figura 15).

La cuantificación de ATP en el medio extracelular (correspondiente al medio de incubación) se realizó mediante ensayos de luminiscencia (Figura 15A). En condiciones basales (control), la concentración de ATP fue de aproximadamente 0,277 μ M. La inhibición de la V-ATPasa con BafA1 (0,125 μ M) durante la neurulación disminuyó los niveles de ATP en un 72% en comparación con el

control. A pesar de la inhibición de la V-ATPasa, los niveles intracelulares ATP (Figura 15B) no se vieron afectados, lo que indica que la disminución de los niveles extracelulares no se debe a una alteración en su síntesis, sino a un efecto sobre su liberación vesicular.

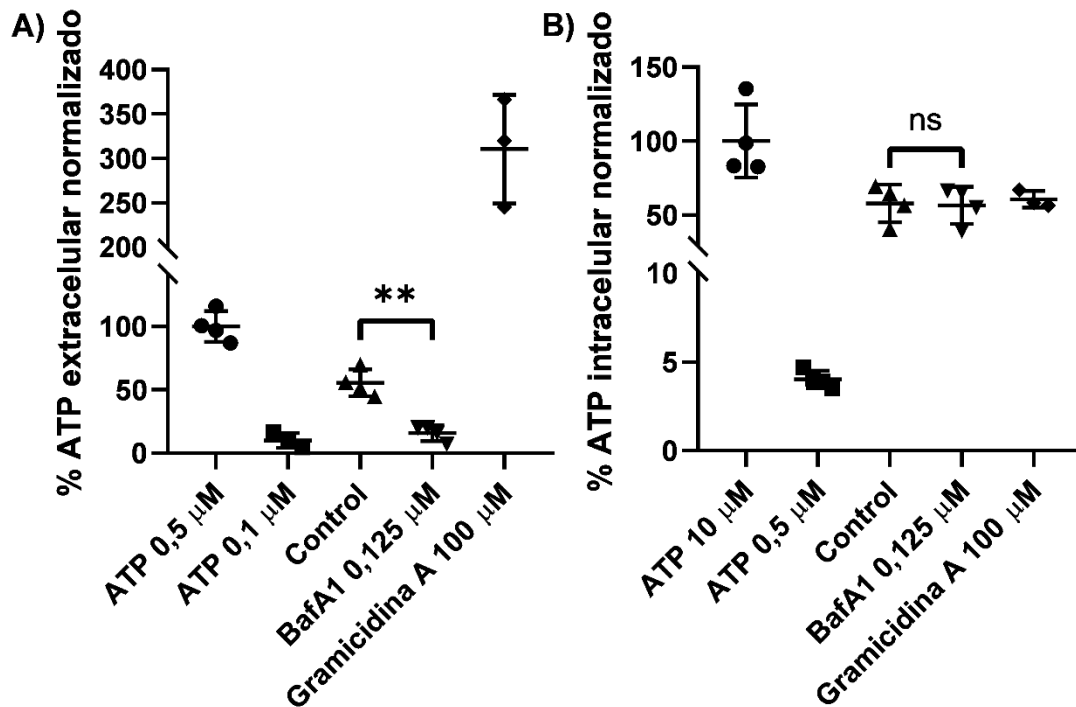


Figura 15. Cuantificación de los niveles de ATP en embriones en estadio 18 tratados con bafilomicina A1 durante la neurulación

(A) Cuantificación de los niveles extracelulares de ATP en embriones de *X. laevis* en estadio 18 tratados con BafA1 0,125 μM durante la neurulación. Los resultados fueron normalizados con respecto al estándar de 0,5 μM **(B)** Cuantificación de los niveles intracelulares de ATP en embriones de *X. laevis* en estadio 18 tratados con BafA1 durante la neurulación. Los resultados fueron normalizados con respecto al estándar de 10 μM. Gramicidina A se utilizó como control positivo. N=4 grupos de embriones fertilizados independientes y 20 réplicas para cada condición. Se utilizó la prueba *t* de Student para las comparaciones entre el grupo control y el tratado con BafA1 (** = $p < 0,01$; ns = no significativo). Las barras de error para los datos representan desviación estándar.

7.3.2 Cuantificación de los niveles de glutamato

Para evaluar la funcionalidad de un sistema de liberación de glutamato dependiente de vesículas durante la neurulación, se incubaron embriones de *X. laevis* con BafA1 0,125 μ M en medio MMR al 10%, desde el estadio 12,5 (neurulación temprana) hasta el estadio 18 (previo al cierre completo del tubo neural). Posteriormente se cuantificaron los niveles de glutamato extracelulares e intracelulares (Figura 16).

La cuantificación de glutamato en el medio extracelular (correspondiente al medio de incubación) se realizó mediante ensayos de fluorescencia (Figura 16A). En condiciones basales (control), la concentración de glutamato fue de aproximadamente 1,53 pmol/ μ L. La inhibición de la V-ATPasa con BafA1 (0,125 μ M) durante la neurulación redujo los niveles de glutamato en un 48% en comparación con el control. A pesar de la inhibición de la V-ATPasa, los niveles intracelulares de glutamato (Figura 16B) no se vieron afectados, lo que indica que la disminución de los niveles extracelulares no se debe a una alteración en su síntesis, sino a un efecto sobre su liberación vesicular.

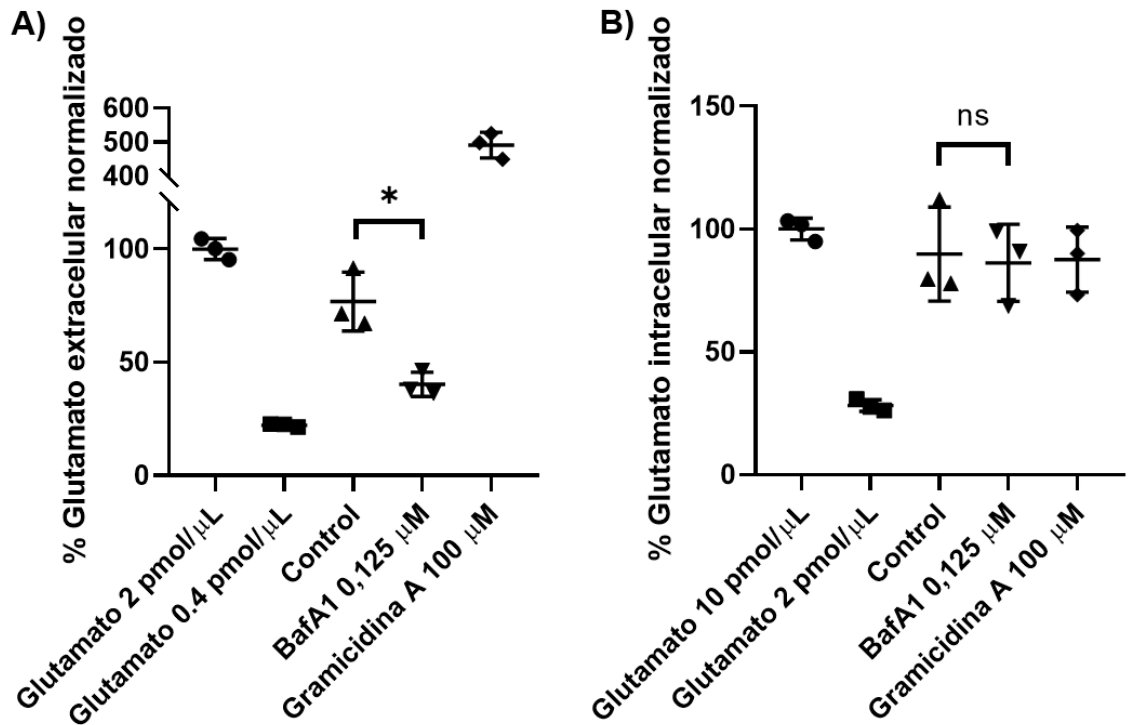


Figura 16. Cuantificación de los niveles de glutamato en embriones en estadio 18 tratados con bafilomicina A1 durante la neurulación

(A) Cuantificación de los niveles extracelulares de glutamato en embriones de *X. laevis* en estadio 18 tratados con BafA1 0,125 μM durante la neurulación. Los resultados fueron normalizados con respecto al estándar de 2 pmol/μL. **(B)** Cuantificación de los niveles intracelulares de glutamato en embriones de *X. laevis* en estadio 18 tratados con BafA1 durante la neurulación. Los resultados fueron normalizados con respecto al estándar de 10 pmol/μL. Gramicidina A se utilizó como control positivo. N=3 grupos de embriones fertilizados independientes y 20 réplicas para cada condición. Se utilizó la prueba *t* de Student (* = $p < 0,05$; ns = no significativo). Las barras de error para los datos representan desviación estándar.

7.3.3 Discusión

Los resultados obtenidos refuerzan la hipótesis de que existe liberación de ATP y glutamato durante la neurulación, la cual depende de la actividad de la V-ATPasa. La inhibición farmacológica de esta proteína redujo los niveles extracelulares de ambas moléculas sin afectar sus concentraciones intracelulares, lo que sugiere que la V-ATPasa es necesaria para la liberación vesicular de ATP y glutamato durante la neurulación. La V-ATPasa juega un papel clave al generar el gradiente de protones necesario para el llenado vesicular de ATP y glutamato, mediado por los transportadores VNUT y VGLUT1, respectivamente (Eriksen et al., 2016; Herzog et al., 2001; Moriyama et al., 2017; Preobraschenski et al., 2014; Sawada et al., 2008; Schenck et al., 2009; Varoqui et al., 2002). Es decir, al bloquear esta proteína, no se impide la síntesis o acumulación intracelular de estos neurotransmisores, sino específicamente su empaquetamiento en vesículas y posterior liberación al espacio extracelular.

En el contexto del desarrollo embrionario, diversos estudios han demostrado que tanto el ATP como el glutamato actúan como moléculas de señalización extracelular antes del establecimiento de sinapsis maduras, regulando procesos como proliferación, migración y cambios morfogénéticos en el desarrollo temprano del sistema nervioso (Cavaliere et al., 2015; Lecca et al., 2012; Rathbone et al., 1999; Welsh & Kucenas, 2018; Zimmermann, 2011) (Komuro & Rakic, 1993; Ben-Ari, 2002; Rathbone et al., 1999). En *X. laevis*, se ha descrito que la señalización purinérgica es relevante durante la neurulación y que la

disminución del ATP extracelular se asocia a defectos en el cierre del tubo neural, principalmente a través de mecanismos no vesiculares como hemicanales de conexinas (Tovar et al., 2023). En este contexto, los resultados obtenidos en el presente trabajo complementan estos antecedentes al aportar evidencia de que, además de las vías no vesiculares previamente descritas, existe una contribución significativa de un mecanismo de liberación vesicular de ATP y glutamato dependiente de la V-ATPasa durante la neurulación.

No obstante, una limitación de estos resultados es que la metodología utilizada no permite obtener una visión localizada de la liberación vesicular de ATP y glutamato. Las cuantificaciones extracelulares se obtuvieron del medio de incubación de embriones completos, por lo que no es posible atribuir la liberación específicamente al neuroectodermo ni descartar la contribución de otros tejidos en desarrollo. Una manera de abordar esta problemática es mediante el cultivo de explantes del neuroepitelio y posterior cuantificación de ATP y glutamato en el medio de cultivo. Adicionalmente, mediante técnicas de inmunofluorescencia dirigida hacia VNUT/VGLUT1 se podría evaluar la distribución de estos transportadores. Mientras que VGLUT1 presenta una expresión exclusiva del sistema nervioso central y es de esperar que esté presente en las células diferenciadas que conforman la placa neural, VNUT tiene una expresión ubicua en organismos adultos y se encuentra en diversos tejidos además del SNC. Por ello, en los estadios del desarrollo analizados, los resultados obtenidos podrían deberse a una alteración en la liberación vesicular de ATP tanto en el tejido

neuroepitelial como en el no neuroepitelial, lo que podría tener implicancias en la regulación del microambiente extracelular durante la morfogénesis del tubo neural.

8 CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este trabajo evidencian una liberación activa de ATP y glutamato al medio extracelular dependiente de la V-ATPasa durante la neurulación en *Xenopus laevis*, compatible con un mecanismo vesicular. Se detectó la expresión de los transcritos correspondientes a los transportadores vesiculares de ATP y glutamato (VNUT y VGLUTs, respectivamente), así como de la V-ATPasa y de distintos componentes del complejo SNARE. Además, se confirmó la presencia de las proteínas VNUT y VGLUT1. En su conjunto, estos hallazgos respaldan la posibilidad de que ATP y glutamato sean liberados mediante vesículas durante la formación del tubo neural.

La inhibición farmacológica de la V-ATPasa mediante BafA1 durante la neurulación provocó un retraso en el cierre del tubo neural, asociado a una alteración de la migración orientada de células neuroepiteliales, lo cual constituye un fenotipo compatible con DTN. Además, se produjo una disminución significativa de los niveles extracelulares de ATP (72%) y glutamato (48%), sin cambios en sus concentraciones intracelulares, lo que sugiere una alteración en la liberación sin afectar la síntesis de ambas moléculas. El fenotipo de retraso en el cierre del tubo neural inducido por BafA1 fue prevenido de forma significativa mediante co-tratamiento con NMDA, lo que refuerza la implicación funcional de la liberación de glutamato dependiente de V-ATPasa en el cierre del tubo neural.

Si bien no se obtuvo evidencia directa de la liberación vesicular de ATP y glutamato, en conjunto, los resultados sugieren que este mecanismo de liberación se encuentra activo desde la morfogénesis temprana del sistema nervioso, modulando procesos como la migración orientada y eventualmente otros como la proliferación.

Serán necesarios experimentos adicionales que permitan determinar la localización de estos eventos y discernir si corresponde a un proceso de liberación vesicular y/o un mecanismo asociado a procesos lisosomales. Estos antecedentes podrían contribuir a dilucidar la relevancia de las vías de comunicación paracrina mediadas por ATP y glutamato en el desarrollo temprano del sistema nervioso, así como a identificar los procesos celulares específicos que son regulados por estas señales.

En conjunto, estos resultados permiten proponer un modelo en el que la inhibición de la V-ATPasa por BafA1 disminuye la liberación vesicular de ATP y glutamato, alterando la migración orientada del neuroepitelio y favoreciendo la aparición de DTN (Figura 17).

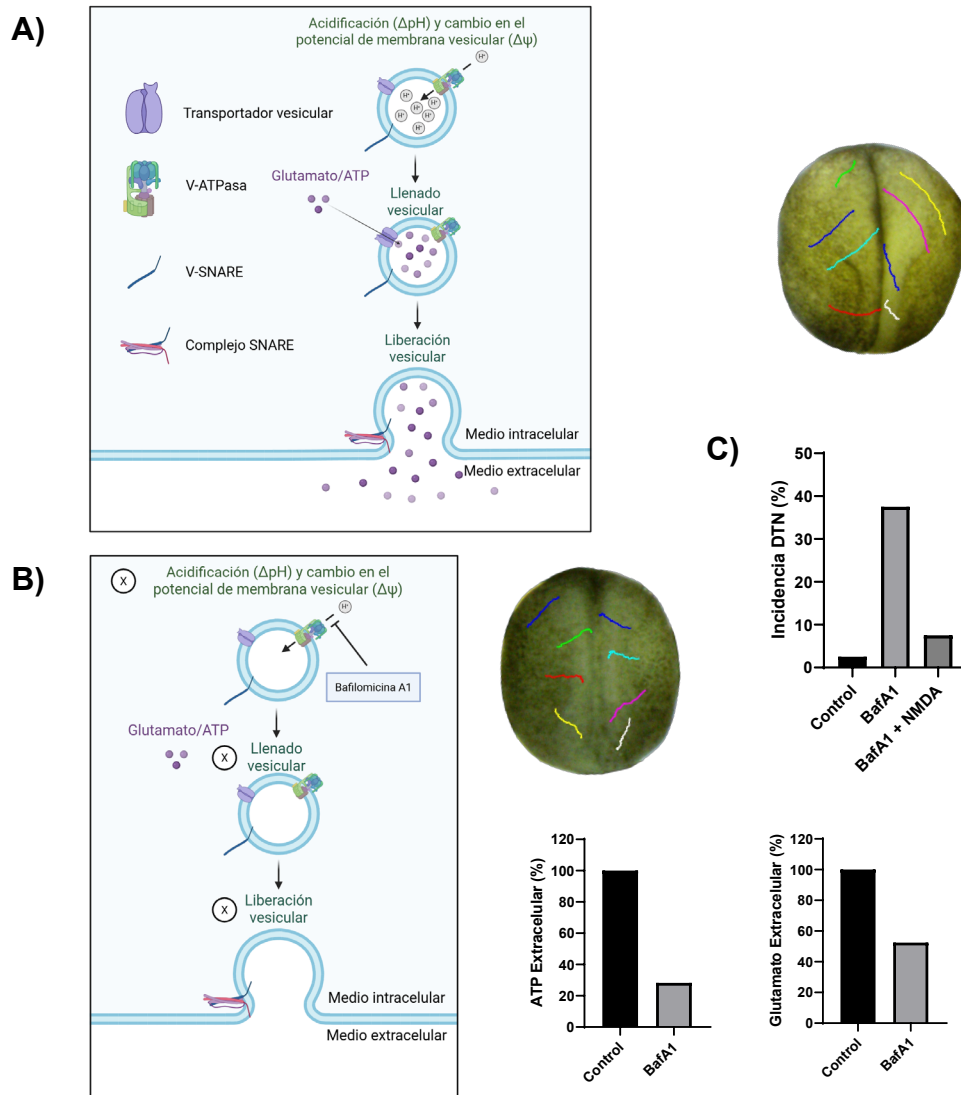


Figura 17. Modelo integrador de la participación de la liberación vesicular de ATP y glutamato durante la neurulación.

(A) En condición control, la actividad de la V-ATPasa establece el gradiente electroquímico necesario para el llenado vesicular y la liberación de ATP y glutamato, favoreciendo la migración orientada latero-medial del neuroepitelio y el cierre adecuado del tubo neural. **(B)** La inhibición con bafilomicina A1 (0,125 μ M) disminuye la liberación extracelular de ATP y glutamato (barras esquemáticas normalizadas al control), se asocia a un aumento de defectos del tubo neural y a una alteración en la migración orientada (imágenes representativas tomadas de la Figura 12). **(C)** El co-tratamiento con NMDA (10 μ M) atenúa el fenotipo inducido por BafA1 (0,125 μ M), disminuyendo la incidencia de defectos del tubo neural, compatible con un rescate parcial del fenotipo.

9 BIBLIOGRAFÍA

Abbracchio, M. P., Burnstock, G., Verkhratsky, A., & Zimmermann, H. (2009).

Purinergic signalling in the nervous system: an overview. *Trends in*

Neurosciences, 32(1), 19–29. <https://doi.org/10.1016/J.TINS.2008.10.001>

Adzick, N. S. (2009). Fetal myelomeningocele: natural history, pathophysiology,

and in-utero intervention. *Seminars in fetal & neonatal medicine*, 15(1), 9.

<https://doi.org/10.1016/J.SINY.2009.05.002>

Agresti, C., Meomartini, M. E., Amadio, S., Ambrosini, E., Volonté, C., Aloisi, F.,

& Visentin, S. (2005). ATP regulates oligodendrocyte progenitor migration, proliferation, and differentiation: Involvement of metabotropic P2 receptors.

Brain Research Reviews, 48(2), 157–165.

<https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2004.12.005>

Arendt, D. (2020). The Evolutionary Assembly of Neuronal Machinery. *Current*

Biology, 30(10), R603–R616. <https://doi.org/10.1016/J.CUB.2020.04.008>

Avagliano, L., Massa, V., George, T. M., Qureshy, S., Bulfamante, G. Pietro, &

Finnell, R. H. (2019). Overview on neural tube defects: From development

to physical characteristics. En *Birth Defects Research* (Vol. 111, Número 19, pp. 1455–1467). John Wiley and Sons Inc.

<https://doi.org/10.1002/bdr2.1380>

- Ballou, L. M., & Lin, R. Z. (2008). Rapamycin and mTOR kinase inhibitors. *Journal of Chemical Biology*, 1(1–4), 27–36.
<https://doi.org/10.1007/S12154-008-0003-5>
- Benavides-Rivas, C., Tovar, L. M., Zúñiga, N., Pinto-Borguero, I., Retamal, C., Yévenes, G. E., Moraga-Cid, G., Fuentealba, J., Guzmán, L., Coddou, C., Bascuñán-Godoy, L., & Castro, P. A. (2020). Altered Glutaminase 1 Activity During Neurulation and Its Potential Implications in Neural Tube Defects. *Frontiers in Pharmacology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00900>
- Blom, H. J., Shaw, G. M., Den Heijer, M., & Finnell, R. H. (2006). Neural tube defects and folate: case far from closed. *Nature Reviews Neuroscience* 2006 7:9, 7(9), 724–731. <https://doi.org/10.1038/nrn1986>
- Bogdanov, Y. D., Dale, L., King, B. F., Whittock, N., & Burnstock, G. (1997). *Early Expression of a Novel Nucleotide Receptor in the Neural Plate of Xenopus Embryos*. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.19.12583>
- Borodinsky, L. N. (2017). *Xenopus laevis* as a model organism for the study of spinal cord formation, development, function and regeneration. *Frontiers in Neural Circuits*, 11, 316489. <https://doi.org/10.3389/fncir.2017.00090>
- Bowser, D. N., & Khakh, B. S. (2007). Vesicular ATP Is the Predominant Cause of Intercellular Calcium Waves in Astrocytes. *Journal of General Physiology*, 129(6), 485–491. <https://doi.org/10.1085/JGP.200709780>

Brose, N., Petrenko, A. G., Südhof, T. C., & Jahn, R. (1992). Synaptotagmin: a Calcium Sensor on the Synaptic Vesicle Surface. *Science*, 256(5059), 1021–1025. <https://doi.org/10.1126/science.1589771>

Cavaliere, F., Donno, C., & D'Ambrosi, N. (2015). Purinergic signaling: A common pathway for neural and mesenchymal stem cell maintenance and differentiation. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 9(JUNE), 145849. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1589771>

Chaikovsky, A. C., Li, C., Jeng, E. E., Loebell, S., Lee, M. C., Murray, C. W., Cheng, R., Demeter, J., Swaney, D. L., Chen, S. H., Newton, B. W., Johnson, J. R., Drainas, A. P., Shue, Y. T., Seoane, J. A., Srinivasan, P., He, A., Yoshida, A., Hipkins, S. Q., ... Sage, J. (2021). The AMBRA1 E3 ligase adaptor regulates the stability of cyclin D. *Nature* 2021 592:7856, 592(7856), 794–798. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03474-7>

Christodoulou, N., & Skourides, P. A. A. (2015). Cell-Autonomous Ca²⁺ Flashes Elicit Pulsed Contractions of an Apical Actin Network to Drive Apical Constriction during Neural Tube Closure. *Cell Reports*, 13(10), 2189–2202. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.11.017>

- Cianfanelli, V., Fuoco, C., Lorente, M., Salazar, M., Quondamatteo, F., Gherardini, P. F., De Zio, D., Nazio, F., Antonioli, M., D'Orazio, M., Skobo, T., Bordi, M., Rohde, M., Dalla Valle, L., Helmer-Citterich, M., Gretzmeier, C., Dengjel, J., Fimia, G. M., Piacentini, M., ... Cecconi, F. (2014). AMBRA1 links autophagy to cell proliferation and tumorigenesis by promoting c-Myc dephosphorylation and degradation. *Nature Cell Biology* 2014 17:1, 17(1), 20–30. <https://doi.org/10.1038/ncb3072>
- Close, B., Banister, K., Baumans, V., Bernoth, E. M., Bromage, N., Bunyan, J., Erhardt, W., Flecknell, P., Gregory, N., Hackbarth, H., Morton, D., & Warwick, C. (1996). Recommendations for euthanasia of experimental animals: Part 1. *Laboratory Animals*, 30(4), 293–316. <https://doi.org/10.1258/002367796780739871>
- Close, B., Banister, K., Baumans, V., Bernoth, E. M., Bromage, N., Bunyan, J., Erhardt, W., Flecknell, P., Gregory, N., Hackbarth, H., Morton, D., & Warwick, C. (1997). Recommendations for euthanasia of experimental animals: Part 2. *Laboratory Animals*, 31(1), 1–32. <https://doi.org/10.1258/002367797780600297>
- Coco, S., Calegari, F., Pravettoni, E., Pozzi, D., Taverna, E., Rosa, P., Matteoli, M., & Verderio, C. (2003). Storage and Release of ATP from Astrocytes in Culture. *Journal of Biological Chemistry*, 278(2), 1354–1362. <https://doi.org/10.1074/JBC.M209454200>

- Colas, J. F., & Schoenwolf, G. C. (2001). Towards a cellular and molecular understanding of neurulation. *Developmental Dynamics*, 221(2), 117–145. <https://doi.org/10.1002/DVDY.1144>
- Copp, A. J., & Greene, N. D. E. (2010). Genetics and development of neural tube defects. En *Journal of Pathology* (Vol. 220, Número 2, pp. 217–230). <https://doi.org/10.1002/path.2643>
- Copp, A. J., & Greene, N. D. E. (2013). Neural tube defects-disorders of neurulation and related embryonic processes. En *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology* (Vol. 2, Número 2, pp. 213–227). <https://doi.org/10.1002/wdev.71>
- Copp, A. J., Stanier, P., & Greene, N. D. E. (2013). Neural tube defects – recent advances, unsolved questions and controversies. *Lancet neurology*, 12(8), 799. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(13\)70110-8](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(13)70110-8)
- Cotrina, M. L., Lin, J. H. C., Alves-Rodrigues, A., Liu, S., Li, J., Azmi-Ghadimi, H., Kang, J., Naus, C. C. G., & Nedergaard, M. (1998). Connexins regulate calcium signaling by controlling ATP release. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(26), 15735–15740. <https://doi.org/10.1073/PNAS.95.26.15735>
- Dale, L., & Jones, C. M. (1999). BMP signalling in early *Xenopus* development. *BioEssays*, 21(9), 751–760. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-1878\(199909\)21:9<751::AID-BIES6>3.0.CO;2-I](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-1878(199909)21:9<751::AID-BIES6>3.0.CO;2-I)

- Daly, C., Sugimori, M., Moreira, J. E., Ziff, E. B., & Llinás, R. (2000). Synaptophysin regulates clathrin-independent endocytosis of synaptic vesicles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(11), 6120–6125. <https://doi.org/10.1073/PNAS.97.11.6120>
- Davidson, L. A., & Keller, R. E. (1999). Neural tube closure in *Xenopus laevis* involves medial migration, directed protrusive activity, cell intercalation and convergent extension. *Development (Cambridge, England)*, 126(20), 4547–4556. <https://doi.org/10.1242/DEV.126.20.4547>
- Devotta, A., Juraver-Geslin, H., Gonzalez, J. A., Hong, C. S., & Saint-Jeannet, J. P. (2016). Sf3b4-depleted *Xenopus* embryos: A model to study the pathogenesis of craniofacial defects in Nager syndrome. *Developmental Biology*, 415(2), 371–382. <https://doi.org/10.1016/J.YDBIO.2016.02.010>
- Dosch, M., Gerber, J., Jebbawi, F., & Beldi, G. (2018). Mechanisms of ATP release by inflammatory cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(4). <https://doi.org/10.3390/IJMS19041222>
- Duarte, C. B., Santos, P. F., & Carvalho, A. P. (1996). $[Ca^{2+}]_i$ regulation by glutamate receptor agonists in cultured chick retina cells. *Vision Research*, 36(8), 1091–1102. [https://doi.org/10.1016/0042-6989\(95\)00208-1](https://doi.org/10.1016/0042-6989(95)00208-1)

- Dumas, S., & Wallén-Mackenzie, Å. (2019). Developmental Co-expression of Vglut2 and Nurr1 in a Mes-Di-Encephalic Continuum Preceeds Dopamine and Glutamate Neuron Specification. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 7, 307. <https://doi.org/10.3389/FCELL.2019.00307/FULL>
- Dunlop, E. A., & Tee, A. R. (2014). mTOR and autophagy: A dynamic relationship governed by nutrients and energy. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 36, 121–129. <https://doi.org/10.1016/J.SEMCDB.2014.08.006>
- Erb, L., & Weisman, G. A. (2012). Coupling of P2Y receptors to G proteins and other signaling pathways. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Membrane Transport and Signaling*, 1(6), 789–803. <https://doi.org/10.1002/WMTS.62>
- Eriksen, J., Chang, R., McGregor, M., Silm, K., Suzuki, T., & Edwards, R. H. (2016). Protons Regulate Vesicular Glutamate Transporters through an Allosteric Mechanism. *Neuron*, 90(4), 768–780. <https://doi.org/10.1016/J.NEURON.2016.03.026>
- Evans, W. H., De Vuyst, E., & Leybaert, L. (2006). The gap junction cellular internet: connexin hemichannels enter the signalling limelight. *Biochemical Journal*, 397(1), 1–14. <https://doi.org/10.1042/BJ20060175>

- Freneau, R. T., Kam, K., Qureshi, T., Johnson, J., Copenhagen, D. R., Storm-Mathisen, J., Chaudhry, F. A., Nicoll, R. A., & Edwards, R. H. (2004). *Vesicular Glutamate Transporters 1 and 2 Target to Functionally Distinct Synaptic Release Sites*. <https://doi.org/10.3389/fnins.2011.00133>
- Freneau, R. T., Troyer, M. D., Pahner, I., Nygaard, G. O., Tran, C. H., Reimer, R. J., Bellocchio, E. E., Fortin, D., Storm-Mathisen, J., & Edwards, R. H. (2001). The expression of vesicular glutamate transporters defines two classes of excitatory synapse. *Neuron*, 31(2), 247–260. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(01\)00344-0](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(01)00344-0)
- Freneau, R. T., Voglmaier, S., Seal, R. P., & Edwards, R. H. (2004). VGLUTs define subsets of excitatory neurons and suggest novel roles for glutamate. *Trends in Neurosciences*, 27(2), 98–103. <https://doi.org/10.1016/J.TINS.2003.11.005>
- Fuchs, M., Brandstätter, J. H., & Regus-Leidig, H. (2014). Evidence for a Clathrin-independent mode of endocytosis at a continuously active sensory synapse. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 8(FEB), 74616. <https://doi.org/10.3389/FNCEL.2014.00060/BIBTEX>
- Gratsch, T. E., & O'Shea, K. S. (2002). Noggin and Chordin Have Distinct Activities in Promoting Lineage Commitment of Mouse Embryonic Stem (ES) Cells. *Developmental Biology*, 245(1), 83–94. <https://doi.org/10.1006/DBIO.2002.0629>

- Greene, N. D. E., & Copp, A. J. (2014). Neural Tube Defects. *Annual review of neuroscience*, 37, 221. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-NEURO-062012-170354>
- Guedes-Dias, P., & Holzbaur, E. L. F. (2019). Axonal transport: Driving synaptic function. *Science*, 366(6462). <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.AAW9997>
- Hanada, H., Moriyama, Y., Maeda, M., & Futai, M. (1990). *Kinetic studies of chromaffin granule H⁺-ATPase and effects of bafilomycin A1* (Vol. 170, Número 2). [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(90\)92172-V](https://doi.org/10.1016/0006-291X(90)92172-V)
- Hannah, M. J., Schmidt, A. A., & Huttner, W. B. (1999). Synaptic vesicle biogenesis. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 15(Volume 15, 1999), 733–798. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.CELLBIO.15.1.733>
- Hanson, P. I., Heuser, J. E., & Jahn, R. (1997). Neurotransmitter release — four years of SNARE complexes. *Current Opinion in Neurobiology*, 7(3), 310–315. [https://doi.org/10.1016/S0959-4388\(97\)80057-8](https://doi.org/10.1016/S0959-4388(97)80057-8)
- Hay, J. C. (2001). SNARE Complex Structure and Function. *Experimental Cell Research*, 271(1), 10–21. <https://doi.org/10.1006/EXCR.2001.5368>
- Hébert, J. M. (2011). FGFs: Neurodevelopment's jack-of-all-trades - How do they do it? *Frontiers in Neuroscience*, DEC, 1–10. <https://doi.org/10.3389/fnins.2011.00133>

- Herzog, E., Bellenchi, G. C., Gras, C., Ronique Bernard, V., Ravassard, P., Cile Bedet, C., Gasnier, B., Giros, B., & Mestikawy, S. El. (2001). *The Existence of a Second Vesicular Glutamate Transporter Specifies Subpopulations of Glutamatergic Neurons*. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.21-22-j0001.2001>
- Honda, S., Sasaki, Y., Ohsawa, K., Imai, Y., Nakamura, Y., Inoue, K., & Kohsaka, S. (2001). Extracellular ATP or ADP Induce Chemotaxis of Cultured Microglia through Gi/o-Coupled P2Y Receptors. *Journal of Neuroscience*, 21(6), 1975–1982. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.21-06-01975.2001>
- Hong, W. J., & Lev, S. (2014). Tethering the assembly of SNARE complexes. *Trends in Cell Biology*, 24(1), 35–43. <https://doi.org/10.1016/J.TCB.2013.09.006>
- Imura, Y., Morizawa, Y., Komatsu, R., Shibata, K., Shinozaki, Y., Kasai, H., Moriishi, K., Moriyama, Y., & Koizumi, S. (2013). Microglia release ATP by exocytosis. *GLIA*, 61(8), 1320–1330. <https://doi.org/10.1002/glia.22517>
- Jiang, S., Yuan, H., Duan, L., Cao, R., Gao, B., Xiong, Y. F., & Rao, Z. R. (2011). Glutamate release through connexin 43 by cultured astrocytes in a stimulated hypertonicity model. *Brain Research*, 1392, 8–15. <https://doi.org/10.1016/J.BRAINRES.2011.03.056>

- Joshi, S. D., Jackson, T. R., Zhang, L., Stuckenholtz, C., & Davidson, L. A. (2025). Supracellular contractility in *Xenopus* embryo epithelia regulated by extracellular ATP and the purinergic receptor P2Y2. *Journal of cell science*. <https://doi.org/10.1242/JCS.263877>
- Keller, R., Shih, J., & Sater, A. (1992). The cellular basis of the convergence and extension of the *Xenopus* neural plate. *Developmental Dynamics*, 193(3), 199–217. <https://doi.org/10.1002/AJA.1001930302>
- Keller-Peck, C. R., & Mullen, R. J. (1997). Altered cell proliferation in the spinal cord of mouse neural tube mutants curly tail and Pax3 splotch-delayed. *Developmental Brain Research*, 102(2), 177–188. [https://doi.org/10.1016/S0165-3806\(97\)00095-3](https://doi.org/10.1016/S0165-3806(97)00095-3)
- Kew, J. N. C., & Kemp, J. A. (2005). Ionotropic and metabotropic glutamate receptor structure and pharmacology. *Psychopharmacology*, 179(1), 4–29. <https://doi.org/10.1007/S00213-005-2200-Z/FIGURES/13>
- Komuro, H., & Rakic, P. (1993). Modulation of neuronal migration by NMDA receptors. *Science (New York, N.Y.)*, 260(5104), 95–97. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.8096653>
- Larsson, M., Sawada, K., Morland, C., Hiasa, M., Ormel, L., Moriyama, Y., & Gundersen, V. (2012). Functional and Anatomical Identification of a Vesicular Transporter Mediating Neuronal ATP Release. *Cerebral Cortex*, 22(5), 1203–1214. <https://doi.org/10.1093/CERCOR/BHR203>

- Lecca, D., Ceruti, S., Fumagalli, M., & Abbracchio, M. P. (2012). Purinergic trophic signalling in glial cells: functional effects and modulation of cell proliferation, differentiation, and death. *Purinergic Signalling*, 8(3), 539. <https://doi.org/10.1007/S11302-012-9310-Y>
- Lee, S., & Gleeson, J. G. (2020). Closing in on Mechanisms of Open Neural Tube Defects. *Trends in Neurosciences*, 43(7), 519–532. <https://doi.org/10.1016/J.TINS.2020.04.009>
- Lemire, R. J., Shepard, T. H., & Alvord, E. C. (1965). Caudal myeloschisis (lumbo-sacral spina bifida cystica) in a five millimeter (Horizon XIV) human embryo. *The Anatomical Record*, 152(1), 9–16. <https://doi.org/10.1002/AR.1091520103>
- Leybaert, L., Braet, K., Vandamme, W., Cabooter, L., Martin, P. E. M., & Evans, W. H. (2003). Connexin Channels, Connexin Mimetic Peptides and ATP Release. *Cell Communication & Adhesion*, 10(4–6), 251–257. <https://doi.org/10.1080/CAC.10.4-6.251.257>
- Lin, J. H. C., Takano, T., Arcuino, G., Wang, X., Hu, F., Darzynkiewicz, Z., Nunes, M., Goldman, S. A., & Nedergaard, M. (2006). Purinergic signaling regulates neural progenitor cell expansion and neurogenesis. *Developmental biology*, 302(1), 356. <https://doi.org/10.1016/J.YDBIO.2006.09.017>

- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods*, 25(4), 402–408. <https://doi.org/10.1006/METH.2001.1262>
- Majumdar, S., & Wu, V. (2025). Genetic Loss of VGLUT1 Alters Histogenesis of Retinal Glutamatergic Cells and Reveals Dynamic Expression of VGLUT2 in Cones. *Brain Sciences*, 15(9), 1024. <https://doi.org/10.3390/BRAINSKI15091024/S1>
- Malarkey, E. B., & Parpura, V. (2008). Mechanisms of glutamate release from astrocytes. *Neurochemistry International*, 52(1–2), 142–154. <https://doi.org/10.1016/J.NEUINT.2007.06.005>
- Manent, J. B., & Represa, A. (2007). Neurotransmitters and brain maturation: early paracrine actions of GABA and glutamate modulate neuronal migration. *The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry*, 13(3), 268–279. <https://doi.org/10.1177/1073858406298918>
- Massé, K., & Dale, N. (2012). Purines as potential morphogens during embryonic development. *Purinergic Signalling*, 8(3), 503–521. <https://doi.org/10.1007/s11302-012-9290-y>

- Masson, J., Darmon, M., Conjard, A., Chuhma, N., Ropert, N., Thoby-Brisson, M., Foutz, A. S., Parrot, S., Miller, G. M., Jorisch, R., Polan, J., Hamon, M., Hen, R., & Rayport, S. (2006). Mice Lacking Brain/Kidney Phosphate-Activated Glutaminase Have Impaired Glutamatergic Synaptic Transmission, Altered Breathing, Disorganized Goal-Directed Behavior and Die Shortly after Birth. *Journal of Neuroscience*, 26(17), 4660–4671.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4241-05.2006>
- Mayer, M. L., & Miller, R. J. (1990). Excitatory amino acid receptors, second messengers and regulation of intracellular Ca^{2+} in mammalian neurons. *Trends in pharmacological sciences*, 11(6), 254–260.
[https://doi.org/10.1016/0165-6147\(90\)90254-6](https://doi.org/10.1016/0165-6147(90)90254-6)
- Mayer, M. L., & Westbrook, G. L. (1987). Permeation and block of N-methyl-D-aspartic acid receptor channels by divalent cations in mouse cultured central neurones. *The Journal of Physiology*, 394(1), 501–527.
<https://doi.org/10.1113/JPHYSIOL.1987.SP016883>
- McEntee, W. J., & Crook, T. H. (1993). Glutamate: its role in learning, memory, and the aging brain. *Psychopharmacology*, 111(4), 391–401.
<https://doi.org/10.1007/BF02253527>

- McMahon, J. A., Takada, S., Zimmerman, L. B., Fan, C. M., Harland, R. M., & McMahon, A. P. (1998). Noggin-mediated antagonism of BMP signaling is required for growth and patterning of the neural tube and somite. *Genes & Development*, 12(10), 1438–1452. <https://doi.org/10.1101/GAD.12.10.1438>
- Mehra, A., Lee, K. H., & Hatzimanikatis, V. (2003). Insights into the relation between mRNA and protein expression patterns: I. theoretical considerations. *Biotechnology and Bioengineering*, 84(7), 822–833. <https://doi.org/10.1002/BIT.10860>
- Meldrum, B. S. (2000). Glutamate as a Neurotransmitter in the Brain: Review of Physiology and Pathology. *The Journal of Nutrition*, 130(4), 1007S-1015S. <https://doi.org/10.1093/JN/130.4.1007S>
- Melo, C. V., Mele, M., Curcio, M., Comprido, D., Silva, C. G., & Duarte, C. B. (2013). BDNF Regulates the Expression and Distribution of Vesicular Glutamate Transporters in Cultured Hippocampal Neurons. *PLOS ONE*, 8(1), e53793. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0053793>
- Milosevic, I. (2018). Revisiting the role of clathrin-mediated endocytosis in synaptic vesicle recycling. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 12, 316254. <https://doi.org/10.3389/FNCEL.2018.00027/XML/NLM>

- Miyazaki, T., Fukaya, M., Shimizu, H., & Watanabe, M. (2003). Subtype switching of vesicular glutamate transporters at parallel fibre–Purkinje cell synapses in developing mouse cerebellum. *European Journal of Neuroscience*, 17(12), 2563–2572. <https://doi.org/10.1046/J.1460-9568.2003.02698.X>
- Moechars, D., Weston, M. C., Leo, S., Callaerts-Vegh, Z., Goris, I., Daneels, G., Buist, A., Cik, M., Van Der Spek, P., Kass, S., Meert, T., D’Hooge, R., Rosenmund, C., & Hampson, R. M. (2006). Vesicular Glutamate Transporter VGLUT2 Expression Levels Control Quantal Size and Neuropathic Pain. *Journal of Neuroscience*, 26(46), 12055–12066. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2556-06.2006>
- Morita, H., Nandadasa, S., Yamamoto, T. S., Terasaka-Iioka, C., Wylie, C., & Ueno, N. (2010). Nectin-2 and N-cadherin interact through extracellular domains and induce apical accumulation of F-actin in apical constriction of *Xenopus* neural tube morphogenesis. *Development*, 137(8), 1315–1325. <https://doi.org/10.1242/DEV.043190>
- Moriyama, Y., Hiasa, M., Sakamoto, S., Omote, H., & Nomura, M. (2017). Vesicular nucleotide transporter (VNUT): appearance of an actress on the stage of purinergic signaling. *Purinergic Signalling* 2017 13:3, 13(3), 387–404. <https://doi.org/10.1007/S11302-017-9568-1>

- 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* 2017 8:1, 8(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-18684-1>
- Nau, H. (1994). Valproic Acid-Induced Neural Tube Defects. *Ciba Foundation symposium*, 181, 144–160. <https://doi.org/10.1002/9780470514559.CH9>
- Nieuwkoop, P. D. ., Faber, Jacob., Gerhart, John., & Kirschner, Marc. (1994). *Normal table of Xenopus laevis (Daudin): a systematical and chronological survey of the development from the fertilized egg till the end of metamorphosis*. Routledge, Taylor & Francis Group.
- Nikolopoulou, E., Galea, G. L., Rolo, A., Greene, N. D. E., & Copp, A. J. (2017). Neural tube closure: cellular, molecular and biomechanical mechanisms. *Development*, 144(4), 552–566. <https://doi.org/10.1242/DEV.145904>
- Nishi, T., & Forgac, M. (2002). The vacuolar (H⁺)-ATPases — nature's most versatile proton pumps. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2002 3:2, 3(2), 94–103. <https://doi.org/10.1038/nrm729>

- North, R. A. (2002). Molecular physiology of P2X receptors. *Physiological Reviews*, 82(4), 1013–1067. <https://doi.org/10.1152/PHYSREV.00015.2002>
- Običan, S. G., Finnell, R. H., Mills, J. L., Shaw, G. M., & Scialli, A. R. (2010). Folic acid in early pregnancy: a public health success story. *The FASEB Journal*, 24(11), 4167–4174. <https://doi.org/10.1096/fj.10-165084>
- Ohmomo, H., Ehara, A., Yoshida, S., Shutoh, F., Ueda, S. ichi, & Hisano, S. (2011). Temporally distinct expression of vesicular glutamate transporters 1 and 2 during embryonic development of the rat olfactory system. *Neuroscience Research*, 70(4), 376–382. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2011.05.005>
- Oni-Orisan, A., Kristiansen, L. V., Haroutunian, V., Meador-Woodruff, J. H., & McCullumsmith, R. E. (2008). Altered Vesicular Glutamate Transporter Expression in the Anterior Cingulate Cortex in Schizophrenia. *Biological Psychiatry*, 63(8), 766–775. <https://doi.org/10.1016/J.BIOPSYCH.2007.10.020>
- O’Rahilly, R., & Müller, F. (1994). Neurulation in the Normal Human Embryo. *Ciba Foundation symposium*, 181, 70–89. <https://doi.org/10.1002/9780470514559.CH5>

- Orellana, J. A., Froger, N., Ezan, P., Jiang, J. X., Bennett, M. V. L., Naus, C. C., Giaume, C., & Sáez, J. C. (2011). ATP and glutamate released via astroglial connexin 43 hemichannels mediate neuronal death through activation of pannexin 1 hemichannels. *Journal of Neurochemistry*, 118(5), 826–840. <https://doi.org/10.1111/J.1471-4159.2011.07210.X>
- Oya, M., Kitaguchi, T., Yanagihara, Y., Numano, R., Takeyama, M., Ikematsu, K., & Tsuboi, T. (2013). Vesicular nucleotide transporter is involved in ATP storage of secretory lysosomes in astrocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 438(1), 145–151. <https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2013.07.043>
- Pankratov, Y., Lalo, U., Verkhratsky, A., & North, R. A. (2006). Vesicular release of ATP at central synapses. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*, 452(5), 589–597. <https://doi.org/10.1007/S00424-006-0061-X>
- Peng, S., Zhang, Y., Zhang, J., Wang, H., & Ren, B. (2011). Glutamate receptors and signal transduction in learning and memory. *Molecular biology reports*, 38(1), 453–460. <https://doi.org/10.1007/S11033-010-0128-9>
- Preobraschenski, J., Zander, J. F., Suzuki, T., Ahnert-Hilger, G., & Jahn, R. (2014). Vesicular glutamate transporters use flexible anion and cation binding sites for efficient accumulation of neurotransmitter. *Neuron*, 84(6), 1287–1301. <https://doi.org/10.1016/J.NEURON.2014.11.008>

Pua, H. H., Dzhagalov, I., Chuck, M., Mizushima, N., & He, Y. W. (2007). A critical role for the autophagy gene Atg5 in T cell survival and proliferation. *Journal of Experimental Medicine*, 204(1), 25–31.
<https://doi.org/10.1084/JEM.20061303>

Ralevic, V., & Burnstock, G. (1998). Receptors for Purines and Pyrimidines. *Pharmacological Reviews*, 50(3), 413–492. [https://doi.org/10.1016/S0031-6997\(24\)01373-5](https://doi.org/10.1016/S0031-6997(24)01373-5)

Rathbone, M. P., Middlemiss, P. J., Gysbers, J. W., Andrew, C., Herman, M. A. R., Reed, J. K., Ciccarelli, R., Di Iorio, P., & Caciagli, F. (1999). Trophic effects of purines in neurons and glial cells. *Progress in neurobiology*, 59(6), 663–690. [https://doi.org/10.1016/S0301-0082\(99\)00017-9](https://doi.org/10.1016/S0301-0082(99)00017-9)

Reimer, R. J. (2013). SLC17: A functionally diverse family of organic anion transporters. *Molecular Aspects of Medicine*, 34(2–3), 350–359.
<https://doi.org/10.1016/J.MAM.2012.05.004>

Riedel, G., Platt, B., & Micheau, J. (2003). Glutamate receptor function in learning and memory. *Behavioural Brain Research*, 140(1–2), 1–47.
[https://doi.org/10.1016/S0166-4328\(02\)00272-3](https://doi.org/10.1016/S0166-4328(02)00272-3)

Rimbert, S., Moreira, J. B., Xapelli, S., & Lévi, S. (2023). Role of purines in brain development, from neuronal proliferation to synaptic refinement. *Neuropharmacology*, 237.
<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2023.109640>

- Rizzoli, S. O. (2014). Synaptic vesicle recycling: Steps and principles. *EMBO Journal*, 33(8), 788–822. <https://doi.org/10.1002/EMBJ.201386357>
- Rolo, A., Skoglund, P., & Keller, R. (2008). Morphogenetic movements driving neural tube closure in *Xenopus* require myosin IIB. *Developmental biology*, 327(2), 327. <https://doi.org/10.1016/J.YDBIO.2008.12.009>
- Sarkar, S., Davies, J. E., Huang, Z., Tunnacliffe, A., & Rubinsztein, D. C. (2007). Trehalose, a novel mTOR-independent autophagy enhancer, accelerates the clearance of mutant huntingtin and α -synuclein. *Journal of Biological Chemistry*, 282(8), 5641–5652. <https://doi.org/10.1074/JBC.M609532200>
- Sawada, K., Echigo, N., Juge, N., Miyaji, T., Otsuka, M., Omote, H., Yamamoto, A., & Moriyama, Y. (2008). Identification of a vesicular nucleotide transporter. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(15), 5683–5686. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0800141105>
- Schenck, S., Wojcik, S. M., Brose, N., & Takamori, S. (2009). A chloride conductance in VGLUT1 underlies maximal glutamate loading into synaptic vesicles. *Nature Neuroscience* 2009 12:2, 12(2), 156–162. <https://doi.org/10.1038/nn.2248>

- Schiavo, G., Stenbeck, G., Rothman, J. E., & Söllner, T. H. (1997). Binding of the synaptic vesicle v-SNARE, synaptotagmin, to the plasma membrane t-SNARE, SNAP-25, can explain docked vesicles at neurotoxin-treated synapses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(3), 997–1001. <https://doi.org/10.1073/PNAS.94.3.997>
- Schneider, C. A., Rasband, W. S., & Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*, 9(7), 671–675. <https://doi.org/10.1038/NMETH.2089>
- Seal, R. P., Akil, O., Yi, E., Weber, C. M., Grant, L., Yoo, J., Clause, A., Kandler, K., Noebels, J. L., Glowatzki, E., Lustig, L. R., & Edwards, R. H. (2008). Sensorineural Deafness and Seizures in Mice Lacking Vesicular Glutamate Transporter 3. *Neuron*, 57(2), 263–275. <https://doi.org/10.1016/J.NEURON.2007.11.032>
- Sequerra, E. B., Goyal, R., Castro, P. A., Levin, J. B., & Borodinsky, L. N. (2018). NMDA receptor signaling is important for neural tube formation and for preventing antiepileptic drug-induced neural tube defects. *Journal of Neuroscience*, 38(20), 4762–4773. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2634-17.2018>

- Shariatmadari, M., Peyronnet, J., Papachristou, P., Horn, Z., Sousa, K. M., Arenas, E., & Ringstedt, T. (2005). Increased Wnt levels in the neural tube impair the function of adherens junctions during neurulation. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 30(3), 437–451.
<https://doi.org/10.1016/j.mcn.2005.08.008>
- Sherr, C. J., Beach, D., & Shapiro, G. I. (2016). Targeting CDK4 and CDK6: From Discovery to Therapy. *Cancer discovery*, 6(4), 353–367.
<https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-15-0894>
- Soykan, T., Maritzen, T., & Haucke, V. (2016). Modes and mechanisms of synaptic vesicle recycling. *Current Opinion in Neurobiology*, 39, 17–23.
<https://doi.org/10.1016/J.CONB.2016.03.005>
- Spitzer, N. C. (2006). Electrical activity in early neuronal development. En *Nature* (Vol. 444, Número 7120, pp. 707–712). Nature Publishing Group.
<https://doi.org/10.1038/nature05300>
- Sreedharan, S., Shaik, J. H. A., Olszewski, P. K., Levine, A. S., Schiöth, H. B., & Fredriksson, R. (2010). Glutamate, aspartate and nucleotide transporters in the SLC17 family form four main phylogenetic clusters: evolution and tissue expression. *BMC Genomics* 2010 11:1, 11(1), 1–12.
<https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-17>

Stevens, T. H., & Forgac, M. (1997). Structure, function and regulation of the vacuolar (H⁺)-ATpase. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 13(Volume 13, 1997), 779–808.

<https://doi.org/10.1146/ANNUREV.CELLBIO.13.1.779>

Stottmann, R. W., Berrong, M., Matta, K., Choi, M., & Klingensmith, J. (2006).

The BMP antagonist Noggin promotes cranial and spinal neurulation by distinct mechanisms. *Developmental Biology*, 295(2), 647–663.

<https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2006.03.051>

Stout, C. E., Costantin, J. L., Naus, C. C. G., & Charles, A. C. (2002).

Intercellular calcium signaling in astrocytes via ATP release through connexin hemichannels. *Journal of Biological Chemistry*, 277(12), 10482–10488. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109902200>

Striedinger, K., Meda, P., & Scemes, E. (2007). Exocytosis of ATP from astrocyte progenitors modulates spontaneous Ca²⁺ oscillations and cell migration. *Glia*, 55(6), 652–662. <https://doi.org/10.1002/GLIA.20494>

Südhof, T. C. (2004). The synaptic vesicle cycle. *Annual Review of Neuroscience*, 27(Volume 27, 2004), 509–547.

<https://doi.org/10.1146/ANNUREV.NEURO.26.041002.131412>

Südhof, T. C. (2013). Neurotransmitter release: The last millisecond in the life of a synaptic vesicle. *Neuron*, 80(3), 675–690.

<https://doi.org/10.1016/J.NEURON.2013.10.022>

- Südhof, T. C., & Rothman, J. E. (2009). Membrane fusion: Grappling with SNARE and SM proteins. *Science*, 323(5913), 474–477.
<https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1161748>
- Takahashi, H., Yokoi, N., & Seino, S. (2019). Glutamate as intracellular and extracellular signals in pancreatic islet functions. *Proceedings of the Japan Academy, Series B*, 95(6), 246–260. <https://doi.org/10.2183/PJAB.95.017>
- Takamori, S., Rhee, J. S., Rosenmund, C., & Jahn, R. (2001). *Identification of Differentiation-Associated Brain-Specific Phosphate Transporter as a Second Vesicular Glutamate Transporter (VGLUT2)*.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.21-22-j0002.2001>
- Tordera, R. M., Totterdell, S., Wojcik, S. M., Brose, N., Elizalde, N., Lasheras, B., & Rio, J. Del. (2007). *Enhanced anxiety, depressive-like behaviour and impaired recognition memory in mice with reduced expression of the vesicular glutamate transporter 1 (VGLUT1)*. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2006.05259.x>
- Tovar, L. M., Burgos, C. F., Yévenes, G. E., Moraga-Cid, G., Fuentealba, J., Coddou, C., Bascunan-Godoy, L., Catrupay, C., Torres, A., & Castro, P. A. (2023). Understanding the Role of ATP Release through Connexins Hemichannels during Neurulation. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(3), 2159. <https://doi.org/10.3390/IJMS24032159/S1>

- Tsao, H. K., Chiu, P. H., & Sun, S. H. (2013). PKC-dependent ERK phosphorylation is essential for P2X7 receptor-mediated neuronal differentiation of neural progenitor cells. *Cell Death & Disease* 2013 4:8, 4(8), e751–e751. <https://doi.org/10.1038/cddis.2013.274>
- Varoqui, H., Schäfer, M. K. H., Zhu, H., Weihe, E., & Erickson, J. D. (2002). Identification of the Differentiation-Associated Na⁺/PI Transporter as a Novel Vesicular Glutamate Transporter Expressed in a Distinct Set of Glutamatergic Synapses. *Journal of Neuroscience*, 22(1), 142–155. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.22-01-00142.2002>
- Verderio, C., Cagnoli, C., Bergami, M., Francolini, M., Schenk, U., Colombo, A., Riganti, L., Frassoni, C., Zuccaro, E., Danglot, L., Wilhelm, C., Galli, T., Canossa, M., & Matteoli, M. (2012). TI-VAMP/VAMP7 is the SNARE of secretory lysosomes contributing to ATP secretion from astrocytes. *Biology of the Cell*, 104(4), 213–228. <https://doi.org/10.1111/BOC.201100070>
- Wallingford, J. B., & Harland, R. M. (2002). Neural tube closure requires Dishevelled-dependent convergent extension of the midline. *Development (Cambridge, England)*, 129(24), 5815–5825. <https://doi.org/10.1242/DEV.00123>

- Wallingford, J. B., Niswander, L. A., Shaw, G. M., & Finnell, R. H. (2013). The continuing challenge of understanding, preventing, and treating neural tube defects. En *Science* (Vol. 339, Número 6123). American Association for the Advancement of Science. <https://doi.org/10.1126/science.1222002>
- Welsh, T. G., & Kucenas, S. (2018). Purinergic signaling in oligodendrocyte development and function. *Journal of neurochemistry*, 145(1), 6–18. <https://doi.org/10.1111/JNC.14315>
- Werler, M. M., Ahrens, K. A., Bosco, J. L. F., Mitchell, A. A., Anderka, M. T., Gilboa, S. M., & Holmes, L. B. (2011). Use of Antiepileptic Medications in Pregnancy in Relation to Risks of Birth Defects. *Annals of Epidemiology*, 21(11), 842–850. <https://doi.org/10.1016/J.ANNEPIDEM.2011.08.002>
- Wessely, O., Agius, E., Oelgeschläger, M., Pera, E. M., & De Robertis, E. M. (2001). Neural Induction in the Absence of Mesoderm: β -Catenin-Dependent Expression of Secreted BMP Antagonists at the Blastula Stage in *Xenopus*. *Developmental Biology*, 234(1), 161–173. <https://doi.org/10.1006/DBIO.2001.0258>
- Wilde, J. J., Petersen, J. R., & Niswander, L. (2014). Genetic, epigenetic, and environmental contributions to neural tube closure. *Annual Review of Genetics*, 48, 583–611. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-120213-092208>

Willecke, K., Eiberger, J., Degen, J., Eckardt, D., Romualdi, A., Güldenagel, M., Deutsch, U., & Söhl, G. (2002). Structural and functional diversity of connexin genes in the mouse and human genome. *Biological Chemistry*, 383(5), 725–737. <https://doi.org/10.1515/BC.2002.076>

Wilson, P. A., & Hemmati-Brivanlou, A. (1997). Vertebrate neural induction: Inducers, inhibitors, and a new synthesis. *Neuron*, 18(5), 699–710. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80311-6](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80311-6)

Wojcik, S. M., Rhee, J. S., Herzog, E., Sigler, A., Jahn, R., Takamori, S., Brose, N., & Rosenmund, C. (2004). *An essential role for vesicular glutamate transporter 1 (VGLUT1) in postnatal development and control of quantal size*. <https://doi.org/10.1073/pnas.0401764101>

Xu, C., Li, X., Wang, F., Weng, H., & Yang, P. (2013). Trehalose prevents neural tube defects by correcting maternal diabetes-suppressed autophagy and neurogenesis. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 305(5), 667–678. <https://doi.org/10.1152/AJPENDO.00185.2013>

Yamaguchi, Y., & Miura, M. (2012). How to form and close the brain: insight into the mechanism of cranial neural tube closure in mammals. *Cellular and Molecular Life Sciences* 2012 70:17, 70(17), 3171–3186. <https://doi.org/10.1007/S00018-012-1227-7>

- Ybot-Gonzalez, P., Savery, D., Gerrelli, D., Signore, M., Mitchell, C. E., Faux, C. H., Greene, N. D. E., & Copp, A. J. (2007). Convergent extension, planar-cell-polarity signalling and initiation of mouse neural tube closure. *Development*, 134(4), 789–799. <https://doi.org/10.1242/DEV.000380>
- Yoshimori, T., Yamamoto, A., Moriyamas, Y., Futais, M., & Tashiroq, Y. (1991). *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY Bafilomycin A1, a Specific Inhibitor of Vacuolar-type H⁺-ATPase, Inhibits Acidification and Protein Degradation in Lysosomes of Cultured Cells* (Vol. 266, Número 26). [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)47429-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)47429-2)
- Zhang, Z., Chen, G., Zhou, W., Song, A., Xu, T., Luo, Q., Wang, W., Gu, X. S., & Duan, S. (2007). Regulated ATP release from astrocytes through lysosome exocytosis. *Nature Cell Biology* 2007 9:8, 9(8), 945–953. <https://doi.org/10.1038/ncb1620>
- Zhuo, C., Ji, Y., Chen, Z., Kitazato, K., Xiang, Y., Zhong, M., Wang, Q., Pei, Y., Ju, H., & Wang, Y. (2013). Proteomics analysis of autophagy-deficient Atg7^{-/-} MEFs reveals a close relationship between F-actin and autophagy. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 437(3), 482–488. <https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2013.06.111>
- Zimmermann, H. (2006). Nucleotide signaling in nervous system development. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*, 452(5), 573–588. <https://doi.org/10.1007/S00424-006-0067-4/FIGURES/6>

Zimmermann, H. (2011). Purinergic signaling in neural development. *Seminars in cell & developmental biology*, 22(2), 194–204.
<https://doi.org/10.1016/J.SEMCDB.2011.02.007>