



ESCUELA DE PREGRADO
FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE

**LA VÍA NO-CANÓNICA DE WNT
ES ESENCIAL PARA LA MIGRACIÓN DE LAS CRESTAS NEURALES
EN EL EMBRIÓN DE *Xenopus laevis***

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular

JAIME BOLÍVAR DE CALISTO CONTRERAS

Director del Seminario de Título: **Dr. Roberto Mayor C.**

Santiago de Chile, Septiembre 2010.



INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile, que el Seminario de Título presentado por el Sr.:

JAIME BOLÍVAR DE CALISTO CONTRERAS

Ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular.

Director Seminario de Título:

Dr. Roberto Mayor C.

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'R. Mayor', written over a horizontal line.

Comisión de Evaluación:

Dr. Juan Fernández H.

(Presidente de la Comisión)

A handwritten signature in blue ink, appearing to be 'Juan Fernández', written over a horizontal line.

Dr. Miguel Allende C.

(Evaluador)

A handwritten signature in blue ink, appearing to be 'Miguel Allende', written over a horizontal line.

Santiago de Chile, Septiembre 2010

AUTOBIOGRAFÍA

Nací un 24 de Noviembre del año 1979 en la ciudad de Santiago de Chile.



Soy el primogénito, y por ende el más regalón de mis padres. Desde que tengo uso de razón que ellos me incitaron a realizar todo tipo de deportes. Pero la verdad, nunca fui muy bueno para eso. Yo creo que eso se debe a que soy medio ciego del ojo izquierdo. Aunque de pequeño fui bastante curioso, siempre he dicho que la película *Jurassic Park* y la clonación de la oveja Dolly (Q.E.P.D.) tuvieron la culpa de que entrara al “frío mundo de la ciencia”.

DEDICATORIA

Quiero partir agradeciendo a mi familia, ya que gran parte de lo que soy como persona y profesional se los debo a ellos. Gracias por su constante cariño y preocupación. Siempre están presentes en todo lo que hago y haré en el futuro.

Doy las gracias también a una persona que sin conocerme, me apoyó como un verdadero *Mecenas* de la época del Renacimiento. Espero algún día poder “devolver la mano” a esta sociedad. Muchas gracias Don JAFY.

Infinitas gracias a mi primer mentor, el Dr. Roberto Mayor, el cuál me mostró con su ejemplo, la dedicación y el amor por la Ciencia. Estoy orgulloso de haber sido parte de su laboratorio aquí en Chile y en Londres. Fue una experiencia con altos y bajos, pero totalmente positiva al final de cuentas.

Las gracias también son para mis ex-compañeros de laboratorio, en especial a el Floro y el Pancho Bastidas por su ayuda técnica y buena onda. A mis amigos Claudio Araya y Ronald Carpio (estés donde estés), y a todos con los que compartí dos años de mi vida: Pancho Romero, Eli, Gustavo, Manuel, Celeste y Stella Maris.

Finalmente, agradezco a los correctores de este seminario de Título el Dr. Juan Fernández y el Dr. Miguel Allende, por su paciencia y dedicación en hacer de este escrito un documento más amigable para el lector.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

AUTOBIOGRAFÍA	ii
DEDICATORIA	iii
ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	iv
ÍNDICE DE FIGURAS.....	vi
ABREVIATURAS.....	vii
RESUMEN	viii
ABSTRACT	ix
INTRODUCCIÓN.....	x
HIPÓTESIS	xvi
OBJETIVO GENERAL.....	xvi
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	xvi
MATERIALES Y MÉTODOS.....	xvii
Manejo de animales y fecundación de los óvulos de <i>Xenopus laevis</i> :.....	xvii
Reactivos y soluciones:	xvii
Transcripción <i>in vitro</i> y microinyección de RNAm:	xviii
Constructos para microinyección de RNAm:.....	xix
Hibridación <i>in situ</i> :.....	xix
Constructos para sondas de RNAm anti-sentido:	xx
Sondas de RNAm anti-sentido:	xx
Transplantes de crestas neurales:.....	xx
Diseción de las crestas neurales, cultivos <i>in vitro</i> , <i>time-lapse</i> y tinción del citoesqueleto:.....	xx
Preparación de los cubreobjetos recubiertos con fibronectina:.....	xxi
Microscopía electrónica de barrido (SEM):	xxii

RESULTADOS.....	24
La inducción de las crestas neurales es controlada por la vía canónica de Wnt.....	24
La migración de las crestas neurales es controlada por la vía no-canónica de Wnt	
.....	26
Wnt11 participa en la migración de las crestas neurales.....	31
Wnt11 tiene la capacidad de atraer a las crestas neurales.....	33
La vía no-canónica de Wnt modula el citoesqueleto de las crestas neurales.....	37
DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.....	40
AGRADECIMIENTOS ESPECIALES	45
REFERENCIAS.....	46

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Endodermo, mesodermo y ectodermo: las tres capas germinales del embrión de los vertebrados.....	X
Figura 2. Las crestas neurales se originan como consecuencia de las señales procedentes de la epidermis, de la placa neural, y el mesodermo.....	xi
Figura 3. Las células de la cresta neural migran por rutas altamente conservadas en el embrión de <i>Xenopus laevis</i> , y dan origen a una gran diversidad de linajes celulares.	xiii
Figura 4. La proteína Dishevelled es el factor común entre la vía canónica y no-canónica de Wnt.....	xv
Figura 5. La inducción de las crestas neurales en el embrión de <i>Xenopus laevis</i> es dependiente de la vía canónica de Wnt.	25
Figura 6. La vía no-canónica de Wnt controla la migración de las crestas neurales en el embrión de <i>Xenopus laevis</i>	27
Figura 7. <i>Wnt11</i> y <i>Fz7</i> se expresan en el tiempo y lugar adecuados para desempeñar un rol en la migración de las crestas neurales en el embrión de <i>Xenopus laevis</i>	30
Figura 8. <i>Wnt11</i> se requiere para la migración de las crestas neurales en el embrión de <i>Xenopus laevis</i>	32
Figura 9. <i>Wnt11</i> modula la ruta de migración de las crestas neurales.	34
Figura 10. <i>Wnt11</i> tiene capacidad quimioatrayente sobre las crestas neurales.	35
Figura 11. <i>Wnt11</i> tiene capacidad quimioatrayente sobre las crestas neurales.	36
Figura 12. La vía no-canónica de Wnt modula la formación de filopodios y lamelipodios en las crestas neurales del embrión de <i>Xenopus laevis</i>	38

ABREVIATURAS

BCIP:	<i>5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate</i>
BMBR:	<i>Boehrigen Manheim Blocking Reagent</i>
BMP:	Proteína Morfogenética del Hueso
CN:	Crestas Neurales
DEPC:	Dietilpirocarbonato
dnWnt11:	dominante negativo de Wnt11
Dsh:	Dishevelled
Fab-AP:	<i>Fragment antigen binding-Alkaline Phosphatase</i>
FDX:	Fluoresceína-dextrano
FGF:	Fibroblast Growth Factor
Fig.:	Figura
Fz:	Frizzled
MAB:	<i>Maleic Acid Buffer</i>
MBS:	Modified Barth's Solution
NAM:	Normal Amphibian Medium
NBT:	<i>Nitro Blue Tetrazolium</i>
PCP:	<i>Planar Cell Polarity</i> (Polaridad Celular Planar)
PTW:	PBS/Tween-20 (0,1%)
RNAm:	RNA mensajero
SEM:	<i>Scanning Electron Microscope</i> (microscopía electrónica de barrido)
U:	Unidades
U.I.:	Unidades Internacionales
UV:	Ultravioleta
Wnt:	<i>Wingless</i>

RESUMEN

La migración de las crestas neurales es un proceso complejo que involucra la delaminación de estas células desde un tejido epitelial llamado neuroectodermo, y su posterior desplazamiento hacia diferentes partes del embrión de los vertebrados. Este trabajo demuestra, por primera vez, que la falta de señalización no-canónica de Wnt afecta la migración de las crestas neurales del embrión de *Xenopus laevis*. Los efectos observados al expresar diferentes mutantes de la proteína Dishevelled, permitió concluir que la vía de señalización canónica de Wnt participaría principalmente en la inducción de las crestas neurales, mientras que la vía no-canónica de Wnt controlaría su migración. Experimentos de trasplante de crestas neurales, que sobreexpresan distintos mutantes de la proteína Dishevelled, muestran que la falta de señalización de la vía no-canónica de Wnt es esencial para la migración de las crestas neurales. Complementario a estos resultados, mostramos que el RNAm de *Wnt11* se expresa en una región adyacente a las crestas neurales. A su vez, una subpoblación de las crestas neurales expresan el RNAm para el receptor Wnt no-canónico: Frizzled-7. Experimentos de pérdida y ganancia de función de *Wnt11*, sugieren que este ligando es necesario para la migración de las crestas neurales *in vivo*. Además, se demuestra que la sobreexpresión localizada de *Wnt11* es capaz de atraer a las crestas neurales hacia regiones de mayor concentración de este ligando. Por último, estudiando la migración de las crestas neurales *in vitro*, se observó que la vía de señalización no-canónica de Wnt participa en la estabilización y/o formación de los lamelipodios y filopodios en las células de la cresta neural. En conjunto, estos resultados sugieren fuertemente que la vía no-canónica de Wnt participa polarizando a las células de la cresta neural, lo cual les permitiría orientar su migración hacia rutas específicas dentro del embrión.

ABSTRACT

Migration of the neural crest is a complex process that involves delamination of its cells from an epithelial tissue called neuroectoderm, and its subsequent movement to different parts of the vertebrate embryo. This work demonstrates for the first time, that lack of the non-canonical Wnt signaling, affects the migration of neural crest cells of *Xenopus laevis* embryo. The effects observed when expressing different mutants of the protein Dishevelled, led us to conclude that the canonical Wnt pathway is mainly involved in the induction of the neural crest, whereas the non-canonical Wnt pathway control its migration. Grafts of neural crest tissue, overexpressing different non-canonical Dishevelled mutants, show that the lack of signaling through the non-canonical Wnt is essential for neural crest migration. Complementary to these results, we show that Wnt11 mRNA is expressed in a region adjacent to the neural crest. In turn, a subpopulation of neural crest expresses the mRNA for the non-canonical Wnt receptor, Frizzled-7. Experiments of loss- and gain-of-function of Wnt11, suggest that this ligand is required for neural crest migration *in vivo*. Furthermore, we show that localized overexpression of Wnt11 is able to attract neural crest cells to regions of higher concentration of this ligand. Finally, studying the neural crest migration *in vitro*, we observed that the non-canonical Wnt signaling pathway, participate in the stabilization and/or formation of lamellipodia and filopodia in the neural crest cells. Taken together, these results strongly suggest that the non-canonical Wnt signaling pathway is involved in polarizing the neural crest cells, allowing them to guide their migration to specific routes within the embryo.

INTRODUCCIÓN

Las crestas neurales (CN) son una población de células totipotentes, exclusiva del embrión de los vertebrados de la cual se originan diferentes linajes celulares. Su aparición durante la evolución esta estrechamente relacionada con la adquisición de estructuras cefálicas en los vertebrados (Gans & Northcutt 1983; Meulemans & Bronner-Fraser 2004; Northcutt & Gans 1983). Desde su descubrimiento y caracterización, las CN han sido consideradas como la “cuarta capa germinal”, dado el vasto repertorio de tipos celulares que formarán en el individuo adulto; siendo el endodermo, mesodermo y ectodermo las tres capas de tejido embrionario que se forman como consecuencia de la gastrulación (Hall 2008) (fig. 1).

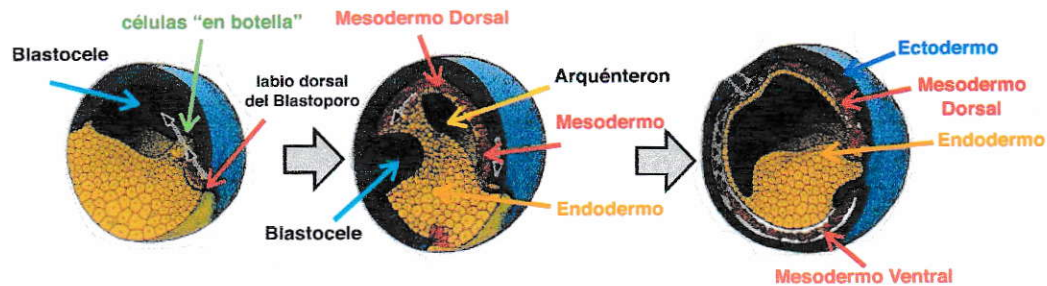


Figura 1

Endodermo, mesodermo y ectodermo: las tres capas germinales del embrión de los vertebrados.

El esquema representa los movimientos celulares que ocurren durante la gastrulación en el embrión de *Xenopus laevis*. Todo comienza por la migración de las células “en botella” hacia el interior del embrión justo en el labio dorsal del blastoporo. Por este mismo lugar, las células precursoras del mesodermo migran por el techo del blastocele por debajo del futuro ectodermo. Estos movimientos celulares, forman el arquenteron o intestino primitivo, lo que al mismo tiempo desplaza la cavidad blastocélica. Hacia el final de la gastrulación, es posible distinguir al menos tres capas de tejido embrionario, las que debido a su ubicación relativa, se denominan: ectodermo (capa externa), mesodermo (capa intermedia), o endodermo (capa interna).

[Adaptado de: Scott F. Gilbert, *Developmental Biology* (2003)]

Las CN se originan tempranamente durante el desarrollo embrionario, específicamente en el borde o cresta del pliegue neural (de ahí el origen de su nombre), exactamente en el límite entre la placa neural y la epidermis (fig. 2A). La interacción entre estos dos tejidos a nivel molecular, además de las señales procedentes del mesodermo, tienen como consecuencia la inducción de los genes maestros que controlan el desarrollo y diferenciación de las CN. Algunas de las moléculas que participan en este proceso inductivo son: la proteína morfogenética del

hueso (BMP), el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), las proteínas Wnt, el ácido retinoico (RA), y las proteínas Dickkopf (Dkk) y Cerberus (Cer), entre otras (fig. 2B). (Aybar & Mayor 2002; Basch y col, 2004; Dorsky y col, 1998; Heeg-Truesdell & LaBonne 2004; Huang & Saint-Jeannet 2004; Knecht & Bronner-Fraser 2002; Mayor & Aybar 2001).

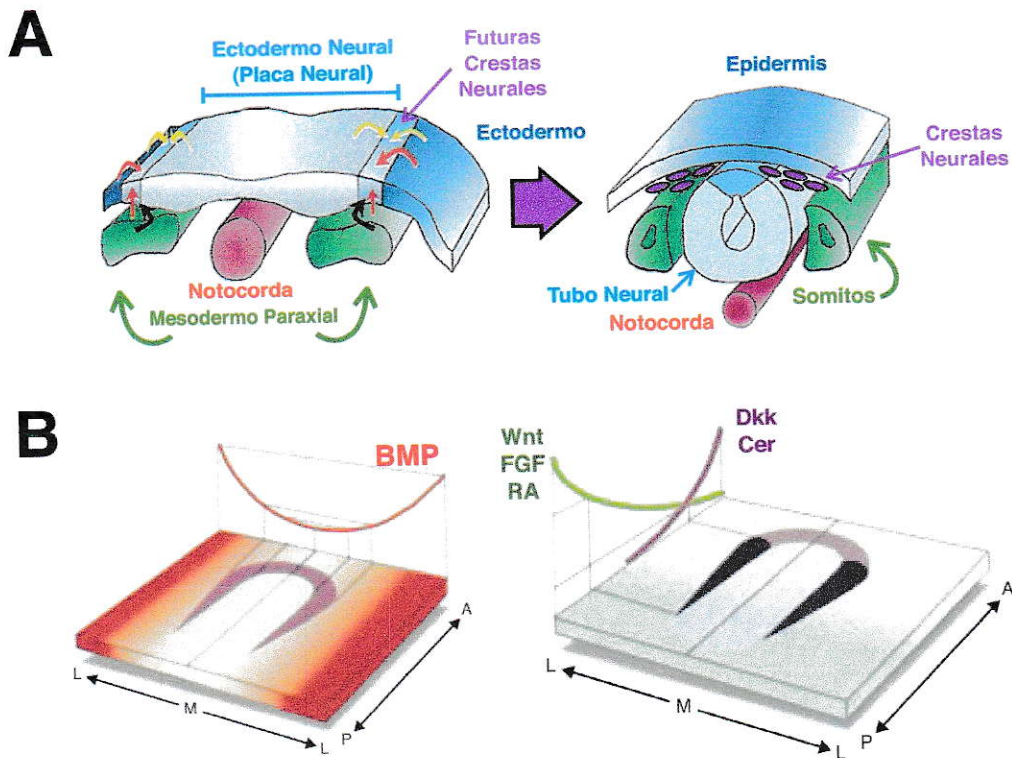


Figura 2

Las crestas neurales se originan como consecuencia de las señales procedentes de la epidermis, de la placa neural, y el mesodermo.

(A) esquema que muestra la formación de las células de la CN en el embrión de *Xenopus laevis*. Las CN son inducidas en el borde de la placa neural gracias a la formación de gradientes de actividad de diferentes morfógenos provenientes de los tejidos adyacentes (flechas de colores). Luego del cierre del tubo neural, las células de la CN se delaminan desde la región más dorsal del tubo neural, bajo el ectodermo, y migran hacia diferentes partes del embrión. [Adaptado de: Heeg-Truesdell y LaBonne, *Birth Defects Research* (2004)]

(B) esquema que muestra algunas de las señales inductivas involucradas en la formación de las CN. Un gradiente **BMP** (en rojo), permitiría la formación de las CN en el eje medio-lateral del embrión. Por otra parte, "señales posteriorizantes", como **Wnt**, **FGF** y **RA**, serían responsables de dar la identidad antero/posterior a las CN. **Dkk** y **Cer**, son dos de los factores involucrados en inhibir la inducción más anterior de las CN. **A**: anterior; **P**: posterior; **L**: lateral; **M**: medio. [Adaptado de: Aybar y Mayor, *Current Opinion in Genetics & Development* (2002)]

Una vez que las CN son inducidas en el borde de la placa neural, sus células se delaminan y migran a lo largo de rutas altamente específicas y conservadas en el embrión de cada vertebrado (figs. 3A y B), alcanzando diferentes sitios donde darán origen a una gran diversidad de tipos celulares, como: melanocitos, células del tejido conectivo del cráneo, neuronas y células de Schwann del sistema nervioso periférico, entre otros (fig. 3C). Algunas de las moléculas que participan en la delaminación y posterior migración de las CN son: caderinas, Rho y Rac-GTPasas y noggin (Borchers y col, 2001; Bronner-Fraser y col, 1992; Henderson y col, 2000; Hoffmann & Balling 1995; Kimura y col, 1995; Liu & Jessell 1998; Nakagawa & Takeichi 1995, 1998; Perris & Perissinotto 2000; Pla y col, 2001; Sela-Donenfeld & Kalcheim 1999, 2000; Takeichi y col, 2000; Vallin y col, 1998). A la fecha, las señales moleculares que controlan la migración de las CN son todavía poco claras. Aún se desconoce cuál o cuales serían los factores solubles que median la comunicación entre el medio ambiente extracelular y el citoesqueleto al interior de las CN.

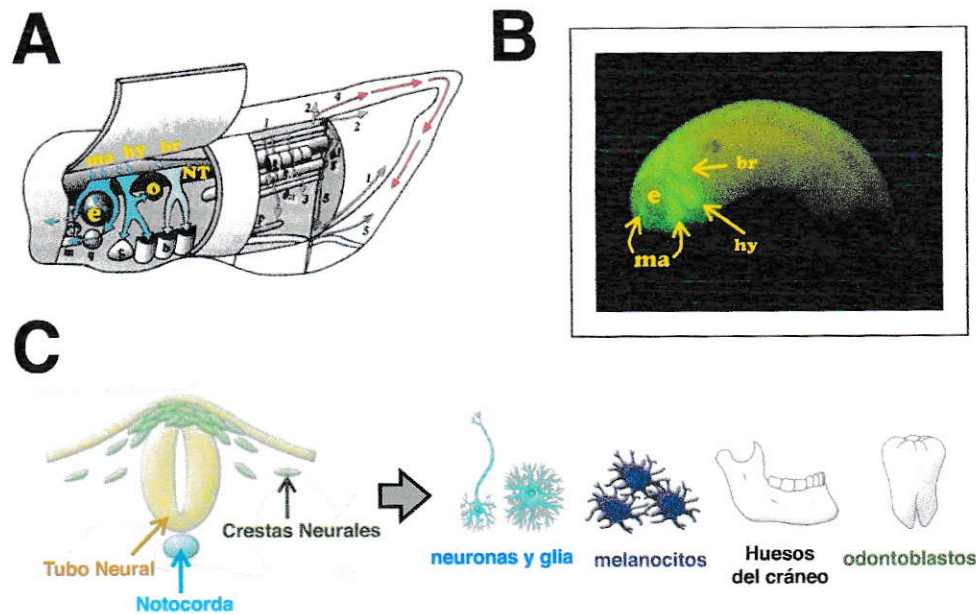


Figura 3

Las células de la cresta neural migran por rutas altamente conservadas en el embrión de *Xenopus laevis*, y dan origen a una gran diversidad de linajes celulares.

(A) esquema resumen de las rutas migratorias de las CN en el embrión de *Xenopus laevis*. Las flechas de color verde representan las tres principales corrientes cefálicas: **mandibular (ma)**, **hyoides (hy)**, y **branquial (br)**. Las flechas de color rojo y púrpura representan las corrientes migratorias del tronco: **1** (ventral); **2** (dorsal); **3** (lateral); **4** (alrededor de la cola); **5** (entérica/aleta ventral). e: ojo; o: vesícula ótica; NT: tubo neural. [Adaptado de: Mayor y col., *Current Topics in Developmental Biology* (1999)]

(B) embrión de *Xenopus laevis* en estadio 25 fotografiado bajo luz ultravioleta. En verde (fluoresceína dextrano), se aprecian las tres corrientes migratorias cefálicas de las CN: **mandibular (ma)**, **hyoides (hy)**, y **branquial (br)**. [Fotografía tomada por Jaime De Calisto]

(C) luego del cierre del tubo neural, las células de la CN delaminan y migran a distintas regiones del embrión de los vertebrados, en donde darán origen a una gran diversidad de tipos celulares. [Adaptado de: Acloque y col., *The Journal of Clinical Investigation* (2009)]

El mesodermo, es otro tejido embrionario que está en constante movimiento durante etapas tempranas del desarrollo. Estudios realizados en el pez cebra y en embriones de *Xenopus laevis*, sugieren que la migración de las células mesodérmicas durante la gastrulación, dependería de factores similares a los que participan en la vía de señalización no-canónica de Wnt o PCP (Polaridad Celular Planar) en *Drosophila melanogaster* (Keller 2002; Mlodzik 2002; Myers y col, 2002; Ueno & Greene 2003; Veeman y col, 2003a; Wallingford y col, 2002). En vertebrados, los movimientos de

extensión convergente del mesodermo también son regulados por la vía de señalización no-canónica de Wnt, llamada también como PCP/Wnt-Ca²⁺. Esta vía, tiene a la proteína Dishevelled (Dsh) como eslabón entre el receptor de Wnt (Frizzled) y otras proteínas del citoplasma. Dsh también participa en la vía canónica de Wnt, controlando en parte la inducción de las CN a través de la activación de factores de transcripción mediados por el complejo β -catenina/Tcf/Lef (Saint-Jeannet y col, 1997) (fig. 4).

A pesar de que Dsh está involucrado en dos procesos distintos durante el desarrollo embrionario, se ha descrito que un dominio específico de esta proteína participaría exclusivamente en la vía no-canónica de Wnt (Axelrod y col, 1998; Boutros & Mlodzik 1999; Heisenberg y col, 2000; Tada & Smith 2000; Wallingford y col, 2000). Alteraciones en la vía de señalización no-canónica de Wnt, afectan a los movimientos de elongación mediolateral del mesodermo, así como la estabilización de las prolongaciones de la membrana plasmática de este tejido durante la gastrulación en *Xenopus laevis* (Wallingford y col, 2002). Además, la interferencia en la señalización no-canónica de Wnt en embriones de pez cebra, de *Xenopus laevis* o de ratón, ya sea genéticamente o mediante el uso de morfolinós, produce defectos en la extensión convergente del mesodermo y fallas en el cierre del tubo neural (Carreira-Barbosa y col, 2003; Curtin y col, 2003; Goto & Keller 2002; Heisenberg y col, 2000; Jessen y col, 2002; Kibar y col, 2001; Kilian y col, 2003; Park & Moon 2002; Rauch y col, 1997; Takeuchi y col, 2003; Veeman y col, 2003b), ambos influenciados por señales extracelulares que controlan el citoesqueleto.

Teniendo en cuenta la participación de la vía no-canónica de Wnt en distintos movimientos celulares que ocurren temprano en el desarrollo de los vertebrados, en este Seminario de Título se decidió estudiar el papel de esta vía de señalización en la migración de las CN, usando como modelo el embrión de *Xenopus laevis*.

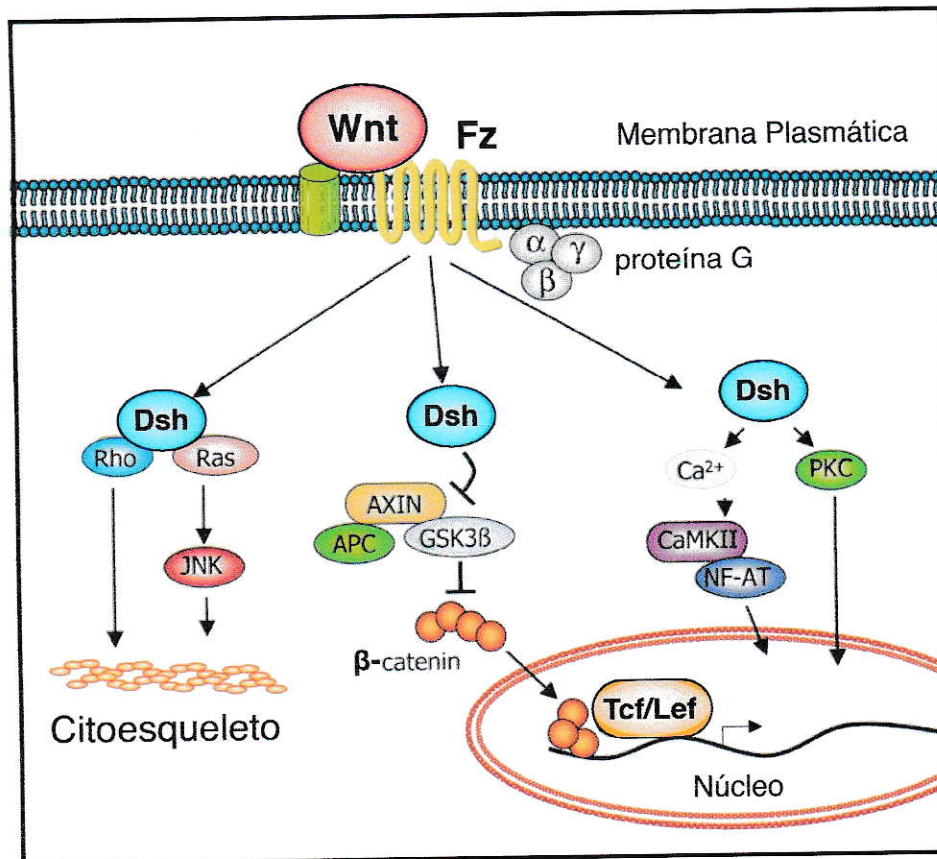


Figura 4

La proteína Dishevelled es el factor común entre la vía canónica y no-canónica de Wnt.

Esquema que representa las diferentes vías de señalización mediada por las proteínas **Wnt**. La activación de la **vía canónica de Wnt** (en el centro de la figura), tiene como consecuencia la translocación hacia el núcleo de **β-catenina**, la cual se une a factores de transcripción pertenecientes a la familia **Tcf/Lef**, permitiendo así la transcripción de un conjunto particular de genes. En ausencia de la señalización **Wnt**, **β-catenina** es degradada por el complejo multiproteico **APC/AXIN**. Por su parte, la activación de la **vía no-canónica de Wnt** (extremos izquierdo y derecho de la figura), mediada por diversas quinasas, incluyendo las proteínas: **Rho y Ras-GTPasas**, **JNK**, **CaMKII**, y **PKC**, tiene como consecuencias un aumento intracelular de **Ca²⁺** y la regulación del citoesqueleto.

Se postula que la interacción entre los diferentes ligandos **Wnt** y sus receptores **Frizzled (Fz)**, permitiría la activación diferencial de la proteína **Dishevelled (Dsh)**, y por ende las diferentes vías descritas.

[Adaptado de: Klipp y Liebermeister. *BMC Neuroscience* (2006)]

HIPÓTESIS

Tomando en cuenta los antecedentes mencionados anteriormente, y considerando que a la fecha no hay estudios que relacionen esta vía de señalización con la migración de las crestas neurales, este Seminario de Título planteó la siguiente hipótesis de trabajo:

“La vía no-canónica de Wnt controla la migración de las crestas neurales en el embrión de *Xenopus laevis*, ya sea afectando la delaminación de sus células o su posterior migración”.

OBJETIVO GENERAL

Estudiar la participación de la vía no-canónica de Wnt durante la migración de las crestas neurales en el embrión de *Xenopus laevis*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Estudiar la participación de la vía no-canónica de Wnt en la inducción y migración de las crestas neurales de *Xenopus laevis*.
2. Determinar el patrón de expresión de los ligandos y receptores de la vía no-canónica de Wnt en el embrión de *Xenopus laevis*.
3. Estudiar la participación de la vía no-canónica de Wnt durante la migración *in vitro* de las crestas neurales, y su rol en la formación de filopodios y lamelipodios.

MATERIALES Y MÉTODOS

Manejo de animales y fecundación de los óvulos de *Xenopus laevis*:

Ejemplares adultos de *Xenopus laevis* se mantuvieron en cautiverio con alimentación trisemanal y ciclos de luz-oscuridad controlados. La ovulación se indujo artificialmente mediante la inyección de 1000U.I. de la hormona gonadotropina coriónica humana en el saco linfático dorsal de las hembras, 15 horas previo al experimento. Los espermatozoides se obtuvieron mediante la disgregación mecánica de los testículos de los machos. La fertilización se realizó en placas de Petri de vidrio por mezcla directa de los ovocitos y espermios. Se utilizó una solución de cisteína al 2% en NAM 1/10 (pH 8,1) para remover la gelatina que protege a los huevos. Los embriones se mantuvieron en cultivo a una temperatura entre 14° y 23°C en NAM 1/10. Para catalogar el estadio embrionario, se usó la tabla de desarrollo de Nieuwkoop y Faber (1967) para *Xenopus laevis*.

Reactivos y soluciones:

Anticuerpos Fab-AP (*Fragment antigen binding-Alkaline Phosphatase*) **anti-digoxigenina** y **anti-fluoresceína** (Roche); **BCIP** (50mg/mL en 100% de dimetilformamida); **BMBR** (*Boehringer Mannheim Blocking Reagent*); **cisteína** (Merck); **MAB** (*Maleic Acid Buffer*) (ácido maleico 100mM, NaCl 150mM, pH 7,5); **ficoll** (Polisacarosa-400, NYCOMED); **H₂O-DEPC** (500μL de DEPC para 1L de H₂O destilada. Dejar reposar un día y luego autoclavar); **hormona gonadotropina coriónica humana** (hCG 5000 U.I., Intervet, Chorulon); **MBS** (NaCl 88mM, KCl 1mM, NaHCO₃ 2,4mM, CaNO₃ 0,3mM, CaCl₂ 0,41mM, MgSO₄ 0,82mM, gentamicina [50μg/mL], hepes 15mM, pH 7,6); **medio de mantención de los testículos: MBSHS 10X** (para 100mL: 5,13g NaCl, 75mg KCl, 2g MgSO₄*7H₂O, 23,8g hepes, una vez mezclado agregar 7mL de CaCl₂ 0,1M y 4mL de NaCl 5M); **MEMFA** (formaldehído 4%, MOPS 0,1M, MgSO₄ 1mM, EGTA 2mM, H₂O-DEPC); **NAM A 10X** (NaCl 110mM, KCl 2mM, CaNO₃ 1mM, MgSO₄ 1mM, EDTA 0,1mM); **NAM B 10X** (Na₂HPO₄*12H₂O 2mM); **NAM C 100X** (para 100mL: 0,8402g de Na₂HCO₃); **NAM 1/10** (para 1L: 10mL de NAM A 10X, 10mL de NAM B 10X, 1mL de NAM C 100X, 1mL de estreptomina [5mg/mL]);

NAM 3/4 (para 1L: 75mL de NAM A 10X, 75mL de NAM B 10X, 1mL de NAM C 100X, 1mL de estreptomycin [5mg/mL]); **NAM 3/8** (para 1L: 37mL de NAM A 10X, 37mL de NAM B 10X, 1mL de NAM C 100X, 1mL de estreptomycin [5mg/mL]); **NBT** (73mg/mL en 70% de dimetilformamida); **soluciones para lavado de sonda: solución 1** (formamida 50%, SSC 2X, 0,1% v/v Tween-20); **solución 2** (formamida 25%, SSC 2X, 0,1% v/v Tween-20); **solución 3** (formamida 12,5%, SSC 2X, 0,1% v/v Tween-20); **solución 4** (SSC 2X, 0,1% v/v Tween-20); **solución 5** (SSC 0,2X, 0,1% v/v Tween-20); **solución blanqueadora** (H₂O₂ 1%, formamida 5%, SSC 0,5X); **tampón AP** (Tris 100mM, MgCl₂ 50mM, NaCl 100mM, 0,1% Tween-20, pH 9,5); **tampón citrato (SSC 20X)** (NaCl 3M, citrato de sodio 0,3M pH 7,4); **tampón Danilchik** (NaCl 53mM, NaHCO₃ 15mM, gluconato de potasio 4,5mM, MgSO₄ 1mM, CaCl₂ 1mM, cocoil isetionato de sodio (CH₂OH*CH*SO₂ONa) 27mM, llevar a pH 8,3 con Na₂CO₃); **tampón de hibridación** (formamida 50%, SSC (5x), ácido ribonucleico tipo VI [1mg/mL], heparina 100µg/mL, Denharts (1x), Tween-20 (0,1%), EDTA (10mM), CHAPS (0,1%), en H₂O-DEPC); **tampón MBS (Modified Barth's Solution)** (NaCl 88mM, KCl 1mM, NaHCO₃ 2,4mM, CaNO₃ 0,3mM, CaCl₂ 0,41mM, MgSO₄ 0,82mM, gentamicina 50µg/ml, hepes 15mM, pH 7,6).

Transcripción *in vitro* y microinyección de RNAm:

Todos los cDNAs se linearizaron y transcribieron de acuerdo al protocolo original descrito por Harland y Weintraub (1985). En breve, la transcripción *in vitro* de los RNAm se realizó mezclando 1µg de plásmido linearizado, 2,5µL de tampón de transcripción 10x, 2,5µL de DTT 0,1M, 2,5µL de mezcla de nucleótidos, 5µL de CAP GTP 2,5µM, 1µL de RNAsin (20U), 1µL de la RNA polimerasa respectiva y H₂O-DEPC hasta completar 25µL. La mezcla se incubó a 37°C por 20 minutos para luego agregar 1µL de GTP 25µM y continuar con la incubación a 37°C. Después de 2 horas, se agregó 1µL de DNasa I y se continuó con la incubación a 37° C durante otros 30 minutos. El RNAm se purificó por columnas (Quick Spin™ Columns) siguiendo las instrucciones del fabricante. Como marcador de linaje, se usó fluoresceína-dextrano (FDX), el cual se co-inyectó junto a los RNAm correspondientes. Para la microinyección se usaron micropipetas de vidrio calibradas para entregar un volumen de 8-12nL/pulso. Las micropipetas se fabricaron a partir de capilares de vidrio, estirados en sus

extremos utilizando un *puller* (*Magnetic Glass Microelectrode Horizontal Puller*; PN-30/Narishige). Las microinyecciones se realizaron en estadíos de 2-16 células en NAM 1/10, de acuerdo a lo descrito en Aybar y col. (2003).

Constructos para microinyección de RNAm:

Constructos donados por Masazumi Tada: **Wnt11**, **dnWnt11**, **Dsh-DEP+**, **Dsh-ΔN** (Tada & Smith 2000); constructos donados por Sergeil Sokol: **dd1** y **dd2** (Sokol 1996).

Hibridación *in situ*:

Se usaron sondas de RNA anti-sentido conjugadas con digoxigenina o con fluoresceína. Las muestras se procesaron según el método descrito por Harland (1991). Brevemente, los embriones se fijaron en MEMFA por una hora a temperatura ambiente y luego fueron deshidratados con metanol 100% (3 veces). Posteriormente, se re-hidrataron con lavados sucesivos de 5 minutos cada uno con metanol 75%, 50%, y 25% v/v en H₂O-DEPC, para luego ser permeabilizados con una solución de PBS/Tween-20 0,1% (PTW). Los embriones se incubaron por 6 horas a 65°C en tampón de hibridación y luego se incubaron toda la noche a 65°C con la sonda de interés (disuelta en tampón de hibridación). La sonda se lavó mediante incubaciones sucesivas de 10 minutos cada una con las soluciones de lavado: 1, 2, 3 y 4 a 65°C. El último lavado se realizó por 30 minutos con la solución de lavado 5. Luego, los embriones se permeabilizaron con PTW y se incubaron con agitación leve a 4°C por 2 horas con la solución de bloqueo (MAB + 2% BMBR), y después toda la noche con el anticuerpo correspondiente (anti-digoxigenina (1/3000) o anti-fluoresceína (1/4000) diluidos en solución de bloqueo). El anticuerpo se lavó seis veces con MAB por 30 minutos cada vez. Luego, los embriones se incubaron dos veces por 5 minutos en tampón AP, y se tiñeron con los reactivos NBT/BCIP (color púrpura), o con BCIP (azul verdoso) a 37°C en oscuridad. Para terminar la reacción, se lavó dos veces con tampón AP y luego se fijó en formaldehído 3,7% por una hora a temperatura ambiente. Finalmente, los embriones se incubaron bajo luz fluorescente en solución blanqueadora por 30 a 60 minutos.

Constructos para sondas de RNAm anti-sentido:

Xslug (Mayor y col, 1995), **Frizzled-7** (Medina y col, 2000), **Xwnt11** (Ku & Melton 1993).

Sondas de RNAm anti-sentido:

Se usaron sondas conjugadas a digoxigenina o fluoresceína (NTP^{mix}: 7,1μL de GTP, CTP y ATP 100mM, 4,6μL de UTP 100mM, 25μL UTP-digoxigenina 10mM ó 25μL UTP-fluoresceína 10mM, 234μL de H₂O-DEPC).

Transplantes de crestas neurales:

Los transplantes de crestas neurales (CN) se realizaron siguiendo el protocolo descrito en Borchers y col. (2001). Brevemente, los embriones se microinyectaron con una mezcla de 1ng del RNAm de Dsh-DEP+ y FDX en el estadio de una célula en NAM 1/10. Luego, la envoltura vitelina de los embriones donantes se removió en los estadios 14-15 (E14-15) en NAM 3/8. Las CN se disecaron con la ayuda de un “cuchillo de ceja” (fabricado con una pipeta Pasteur y una ceja humana, pegada con parafina sólida en uno de sus extremos) y pinzas punta fina (Dupont N°5) en NAM 3/8. La cirugía se realizó en placas de Petri recubiertas con agarosa al 2% para evitar que las CN se adhirieran al fondo. En los embriones receptores, se disecó una superficie similar al tamaño de las CN donantes, dejando intacto el mesodermo. Luego, las CN se injertaron en el embrión receptor y se cubrieron con un cubreobjetos para ayudar a la incorporación del tejido. Los embriones se dejaron por una hora a temperatura ambiente en NAM 3/4, y luego se dejaron desarrollar a 14-21°C hasta estadios migratorios de las CN (E21-23). Se utilizó un microscopio de epifluorescencia para visualizar el progreso del experimento.

Disección de las crestas neurales, cultivos *in vitro*, *time-lapse* y tinción del citoesqueleto:

Los cultivos *in vitro* de las CN, se realizaron según el protocolo descrito por Alfandari y col. (2003) y Borchers y col. (2001). Brevemente, se removió la envoltura vitelina de los embriones en estadios 14-15, y luego, en el estadio 17, se disecaron las CN, tal como se describió previamente. Los explantes de CN se incubaron en tampón de Danilchik

suplementado con 1mg/mL de BSA + 50µg/mL de gentamicina por 30 minutos a temperatura ambiente. Luego, los explantes se transfirieron con una pipeta Pasteur a una placa de Petri que tiene en el fondo varios cubreobjetos redondos recubiertos previamente con fibronectina [20µg/mL]. Los explantes se incubaron a 14-21°C por 10-12 horas, o hasta que las CN migraron. Para registrar la migración celular, se utilizó una cámara Jenoptik/CAM Jena, acoplada a un microscopio Nikon Eclipse E1000. La actividad de la membrana plasmática de cada célula (denominada de aquí en adelante como prolongaciones) se cuantificó según los siguientes parámetros: prolongaciones nuevas; en retirada; o estables, (ambas presentes en el primer y último fotograma de la película). Se realizó tinción con rodamina-faloidina (Sigma-Aldrich) para visualizar los filamentos de actina, y con el anticuerpo anti-tubulina (Sigma-Aldrich) para teñir los microtúbulos. Brevemente, las células se fijaron en formaldehído al 4%, se lavaron tres veces con PBS 1X y luego se permeabilizaron por 5 minutos con PBS/Triton 0,2%. Luego, se lavaron 3 veces con PBS 1X y se bloquearon por 30 minutos con PBS/BSA 5%. Luego, se lavaron 3 veces con PBS 1X, y se incubaron con rodamina-faloidina por 15 a 30 minutos (1/1000 en PBS/BSA 1%), o con anti-tubulina (1/2000 en PBS/BSA 1%) por una hora a temperatura ambiente. Las muestras con anti-tubulina se lavaron 3 veces con PBS y se incubaron con anti-IgG FITC (1/200 en PBS/BSA 1%). Finalmente, las células se lavaron y montaron en portaobjetos, utilizando el medio de montaje FluorSave™ (Calbiochem). Los lamelipodios se denominaron como “grandes” cuando ocuparon más de 1/3 del borde de cada célula, y como “normales” cuando fueron más pequeños que 1/3 del borde de cada célula analizada.

Preparación de los cubreobjetos recubiertos con fibronectina:

La fibronectina (Sigma) se diluyó en PBS 1X a una concentración final de 20µg/mL. Se agregaron 30µL de la solución a cada cubreobjeto y se incubaron a 4°C toda la noche. Los cubreobjetos se lavaron 3 veces con PBS 1X, y se incubaron con PBS/BSA 1% por 2 horas a temperatura ambiente (como mínimo) antes del experimento. El exceso de BSA, se lavó con MBS justo antes del experimento.

Microscopía electrónica de barrido (SEM):

Los explantes de las crestas neurales se fijaron por 1 hora a temperatura ambiente en glutaraldehído al 1,5% en tampón cacodilato (0,1M; pH 7,4). Luego, las muestras se lavaron dos veces con tampón cacodilato, y se incubaron por 1 hora en 1% de tetróxido de osmio/tampón cacodilato en oscuridad a 4°C. Finalmente, las muestras se lavaron dos veces con tampón cacodilato y luego se deshidrataron con una serie creciente de etanol (30, 50, 70, 90 y dos cambios en etanol 100%). Una vez deshidratadas, las muestras se secaron al "punto crítico" del CO₂ líquido, y se recubrieron con oro antes de ser analizadas mediante SEM, tal como se describe en Sadaghiani y Thiebaud (1987).

RESULTADOS

La inducción de las crestas neurales es controlada por la vía canónica de Wnt

Para evaluar la participación de las vías de señalización Wnt en la inducción de las CN, se sobreexpresaron diferentes mutantes de la proteína Dsh -los cuales se sabe afectan específicamente a una de las dos vías- en embriones de *Xenopus laevis*. Los embriones se inyectaron en uno de los blastómeros en estadio de dos células, y luego se fijaron en etapas premigratorias de las CN (E17). Los efectos de la sobreexpresión de las proteínas mutantes sobre la inducción de las CN, se visualizó mediante la técnica de hibridación *in situ* usando como marcador de las CN la expresión del gen *Xslug*. El lado inyectado, se identificó por el color azul verdoso que se obtiene de la inmunotinción contra fluoresceína-dextrano (FDX). La fig. 5A, muestra un esquema de los diferentes constructos de RNAm de Dsh inyectados y sus efectos sobre las vías de señalización Wnt descritos en la literatura (Axelrod y col, 1998; Boutros & Mlodzik 1999; Boutros y col, 1998; Smith y col, 2000; Sokol 1996; Tada & Smith 2000). Los constructos dd1 y dd2, disminuyeron drásticamente la expresión del gen *Xslug* en el lado inyectado (figs. 5B-E; disminución en la tinción de color púrpura). En cambio los constructos Dsh- Δ N y Dsh-DEP+, no afectaron la inducción de las CN (figs. 5F-I); se observa un patrón similar en la tinción de color púrpura tanto en el lado inyectado como en el control). Es importante destacar, que la sobreexpresión del inhibidor específico de la vía no-canónica de Wnt: Dsh-DEP+, no tuvo ningún efecto sobre la inducción de las CN (figs. 5G,I), sugiriendo que la vía no-canónica de Wnt no participaría en la inducción de las CN en el embrión de *Xenopus laevis*.

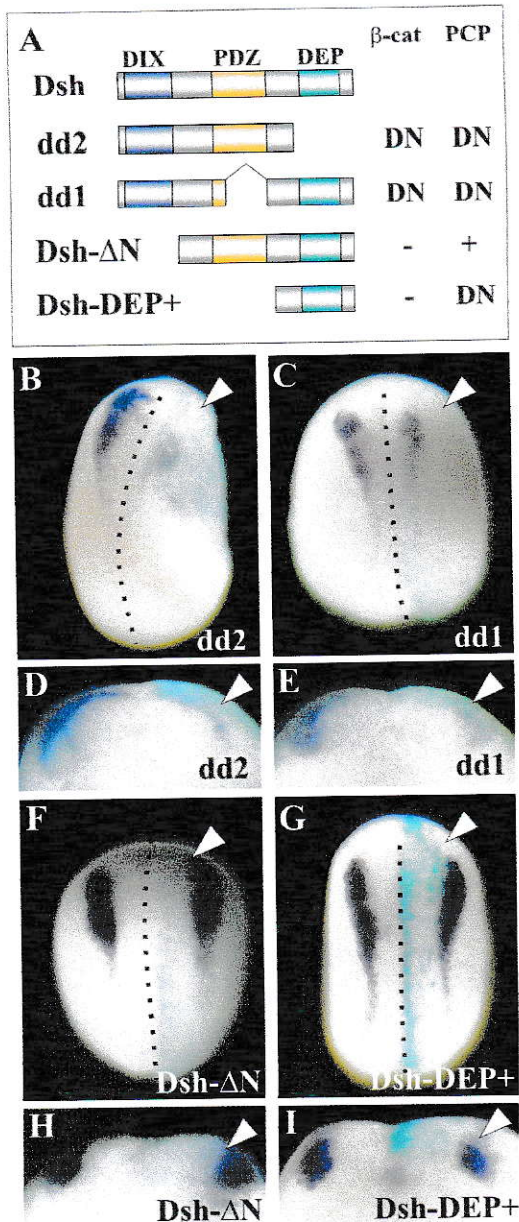


Figura 5

La inducción de las crestas neurales en el embrión de *Xenopus laevis* es dependiente de la vía canónica de Wnt.

(A) esquema de la proteína Dsh y los diferentes constructos usados en este trabajo. Se destacan los dominios proteicos que participan en la vía de señalización Wnt canónica (β -cat), y no-canónica (PCP).

(DN): actúa como dominante negativo
 (-): no hay efecto observado
 (+): funciona como activador

(B-I) el RNAm de cada uno de los constructos indicados en (A) se inyectó en el polo animal (futuro ectodermo) de uno de los blastómeros en el estadio de dos células. Luego, los embriones se cultivaron hasta el estadio 17, donde la expresión del gen marcador de CN *Xslug* se evaluó mediante hibridación *in situ*.

(B, C, F y G) vistas dorsales de los embriones inyectados; (D, E, H, I) cortes transversales.
 cabeza de flecha: lado inyectado.

(B y D) embriones inyectados con 1ng del RNAm dd2, o con 1ng del RNAm dd1 (C, E). Ambos constructos inhibieron la expresión del gen *Xslug* en el lado inyectado (disminución de la tinción púrpura). dd2: 35% ($n=65$); dd1: 37% ($n=85$).

(F y H) embriones inyectados con 1ng del RNAm Dsh- Δ N ($n=50$), o con 1ng del RNAm Dsh-DEP+ ($n=55$) (G, I).

Ninguno de los constructos afectó la expresión del gen *Xslug*. Sin embargo, en un 12% de los embriones microinyectados con Dsh- Δ N ($n=85$), se observó una leve disminución en la tinción para *Xslug*.

La migración de las crestas neurales es controlada por la vía no-canónica de Wnt

Sobre la base de los resultados anteriores, y para no afectar la inducción de las CN, en los siguientes experimentos se decidió utilizar únicamente los constructos Dsh- Δ N y Dsh-DEP+ para el estudio de la migración de estas células. Para esto, los embriones se inyectaron como se describió previamente, pero esta vez se fijaron en estadios cuando las CN ya han comenzado su migración (E23-25). La sobreexpresión de los constructos Dsh- Δ N y Dsh-DEP+ en una mitad del embrión, afectó el patrón característico de migración de las CN cefálicas (figs. 6A y B; cabezas de flecha roja). El lado inyectado del embrión, mostró una distribución difusa en la tinción para el marcador de CN *Xslug* sin evidencia de una migración normal de estas células (figs. 6A y B; cabeza de flecha blanca).

Para descartar cualquier efecto de los mutantes Dsh sobre otras células del embrión que pudieran estar participando en la migración de las CN, y además para inhibir específicamente la vía no-canónica de Wnt en estas células, se realizaron trasplantes de CN provenientes de embriones previamente inyectados con el RNAm de Dsh-DEP+ en embriones control (fig. 6C). De esta manera, la sobreexpresión de la proteína mutante sólo afectaría a las células de la CN transplantada, y no al embrión completo. Al igual que en los experimentos anteriores, se usó FDX como marcador de linaje, pero esta vez, de las células transplantadas. Luego de la cirugía en el estadio de neurula (E14-16), los embriones transplantados con las CN que sobreexpresan Dsh-DEP+ se dejaron desarrollar hasta etapas migratorias de las CN (E26). La posición y migración de las células transplantadas, se evaluó mediante microscopía de epifluorescencia. Los injertos de las CN provenientes de embriones inyectados sólo con FDX (usados como control de la migración de las CN), mostraron la clásica distribución de las principales corrientes de migración de las CN cefálicas (puntas de flecha de color rojo en la figs. 6D y F). En cambio, y similar a los resultados anteriores, los injertos de las células inyectadas previamente con Dsh-DEP+/FDX, mostraron una completa inhibición de la migración de las CN (cabeza de flecha en la figs. 6E y G).

Hasta ahora, nuestros resultados sugieren fuertemente que la vía no-canónica de Wnt estaría involucrada en la migración de las CN, pero no en su inducción.

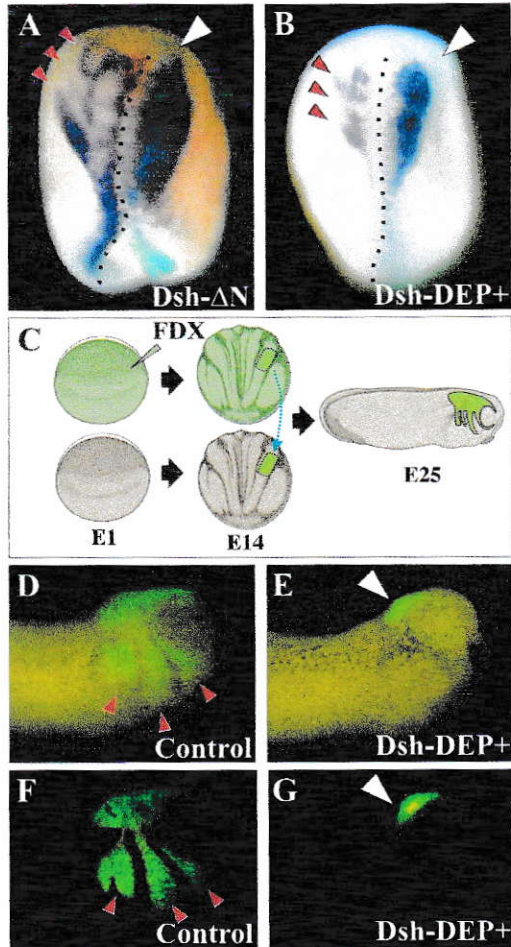


Figura 6

La vía no-canónica de Wnt controla la migración de las crestas neurales en el embrión de *Xenopus laevis*.

(A) embriones inyectados con 1ng del RNAm Dsh-ΔN, o con 1ng del RNAm Dsh-DEP+ (B) en uno de los blastómeros animales en el estadio de ocho células. Los embriones se cultivaron hasta el estadio 24, donde la expresión del marcador de CN *Xslug* se evaluó mediante hibridación *in situ*. El patrón normal de migración de las CN cefálicas se aprecia en el lado no inyectado del embrión (**cabezas de flecha roja**: corrientes mandibular, hioideas y branquial). En cambio, el lado inyectado (**cabeza de flecha blanca**) muestra una clara alteración de la migración de las CN. **Dsh-ΔN**: 40% ($n=60$); **Dsh-DEP+**: 45% ($n=55$)

(C) esquema del trasplante de células de la CN. (D - G) Embriones en el estadio de una célula, fueron inyectados con FDX sin o con 1ng del RNAm Dsh-DEP+. Luego, en el estadio 14, las CN se transplantaron a un embrión receptor no inyectado. La migración de las CN se monitorió *in vivo* hasta el estadio 26 con un microscopio de epifluorescencia.

(D y F) embrión con trasplante de CN control, mostrando el patrón normal de migración de las CN cefálicas (95%, $n=30$).

(E y G) embrión transplantado con células de la CN que sobreexpresan el RNAm Dsh-DEP+. Se aprecia una completa inhibición de la migración de las CN cefálicas (95%, $n=20$).

(D y E) embriones fotografiados bajo luz visible y UV simultáneamente.

(F y G) embriones fotografiados sólo bajo luz UV.

Wnt11* y *Fz7* se expresan en un territorio adyacente a la expresión de *Xslug

Los resultados anteriores, demuestran la participación de la vía no-canónica de Wnt en la migración de las CN, por lo que el paso siguiente fue evaluar el patrón de expresión de los genes involucrados en esta vía. Las proteínas Wnt4, Wnt5a y Wnt11, han sido propuestas como posibles activadores específicos de la vía de señalización no-canónica de Wnt (Kuhl 2002). Sin embargo, los genes *Wnt4* y *Wnt5a* no se expresan en un territorio cercano a las CN durante su migración (hibridaciones *in situ* realizadas por Roberto Mayor y Jaime De Calisto; datos no mostrados). Sugiriendo fuertemente, que estos genes no participarían en la migración de estas células. Por lo tanto, se decidió trabajar sólo en el patrón de expresión de *Wnt11*, y correlacionarlo con el marcador de CN *Xslug* durante diferentes etapas del desarrollo de *Xenopus laevis* (fig. 7). Los resultados de la hibridación *in situ* para *Wnt11*, mostraron que en etapas previas a la migración de las CN (E17), este gen se expresa adyacente a las primeras células de las CN que migran rostralmente hacia el eje ventral del embrión (figs. 7A-C, E-G). Por otra parte, las células que expresan *Xslug* (figs. 7A y E), se ubican justo al lado de una banda continua de expresión de *Wnt11* (figs. 7B y F). Esto se visualizó mejor al realizar una hibridación *in situ* doble para *Xslug* y *Wnt11*, donde se encontró que *Wnt11* se expresa justo en el borde de *Xslug* (figs. 7C y G). Cabe destacar, que la banda de expresión de *Wnt11*, ubicada en la frontera de las CN cefálicas, no es uniforme, sino que hay regiones donde *Wnt11* se expresa con más fuerza (comparar la flecha blanca y la negra en la fig. 7C).

Aunque todavía no se ha identificado el receptor específico para Wnt11, existen evidencias experimentales previas que sugieren como candidato a la proteína Frizzled-7 (Fz7), ya que este receptor participaría en la vía no-canónica de Wnt en vertebrados (Carreira-Barbosa y col, 2003; Djiane y col, 2000; Medina y col, 2000; Sumanas & Ekker 2001; Winklbauer y col, 2001). Por ésta razón, se comparó el patrón de expresión de *Fz7* con el de *Wnt11* y *Xslug*. Los resultados de la hibridación *in situ* en embriones en el estadio 17 mostraron que, *Fz7* se expresa en diferentes regiones del ectodermo neural (Djiane y col, 2000; Wheeler & Hoppler 1999), las que incluirían una parte de las CN premigratorias (figs. 7D y H), y una porción de las CN que han comenzado a migrar (fig. 7L). Al comparar la expresión de *Fz7* y *Xslug*, se observa que

Fz7 se expresa en una subpoblación de las CN situada adyacente a la región que expresa *Wnt11* (cabezas de flecha púrpura en la fig. 7) en el ectodermo (figs. 7E, G y H).

En resumen, durante etapas tempranas de la migración de las CN, *Wnt11* se expresa adyacente a las primeras células de las CN que migran, las que su vez expresan el receptor para *Wnt11*, *Fz7* (fig. 7M). Una vez que el tubo neural se cierra, las primeras células de las CN migrarían por debajo de la zona de expresión de *Wnt11* (fig. 7N).

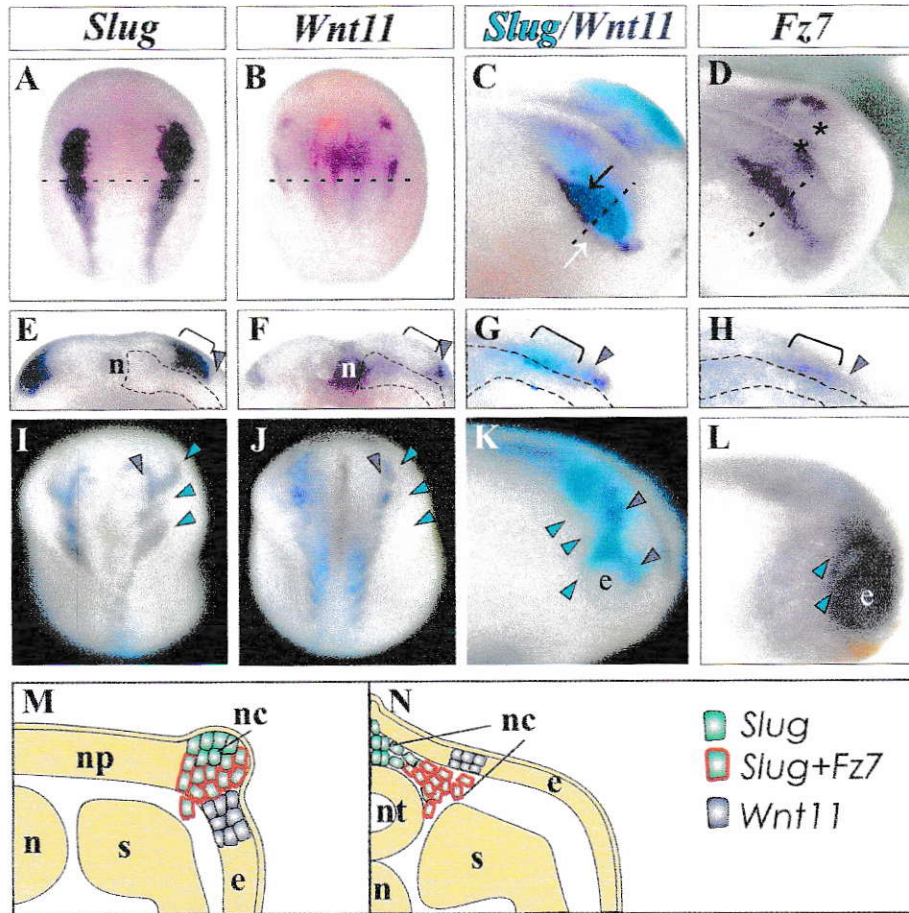


Figura 7

Wnt11 y *Fz7* se expresan en el tiempo y lugar adecuados para desempeñar un rol en la migración de las crestas neurales en el embrión de *Xenopus laevis*.

Para determinar una posible participación de *Wnt11* y *Fz7* durante la migración de las CN de *Xenopus laevis*, se analizó el patrón de expresión de ambos genes y se comparó al del marcador de CN *Xslug*.

(**A, B, I, J**) vistas dorsales; (**C, D, K, L**) vistas laterales.

(**A - H**) embriones en el estadio 17 mostrando el patrón normal de expresión de: *Xslug* (**A** y **E**), *Wnt11* (**B** y **F**), *Xslug/Wnt11* (**C** y **G**) y *Fz7* (**D** y **H**). [flecha negra: expresión intensa de *Wnt11*; flecha blanca: expresión débil de *Wnt11*].

(**E - H**) cortes transversales de los embriones mostrados en (**A - B**).

La línea discontinua en (**A** y **B**) indica el lugar aproximado donde se realizaron los cortes. [n: notocorda; línea discontinua en (**E - H**) demarca el endomesodermo].

(**I - L**) embriones en el estadio 23 mostrando el patrón de expresión de: *Xslug* (**I**), *Wnt11* (**J**), *Xslug/Wnt11* (**K**) y *Fz7* (**L**). [cabeza de flecha púrpura: indica la región de expresión de *Wnt11*; cabeza de flecha verde: indica la ubicación de las corrientes migratorias cefálicas de las CN; e: ojo].

(**M**) esquema de un corte transversal de un embrión en el estadio premigratorio de las CN (E17), y durante la migración de las CN (E23-25). En (**M**), una subpoblación de las CN expresaría *Fz7*, las que se ubicarían adyacente a las células que expresan *Wnt11*. Posteriormente, en estadios migratorios de las CN (**N**), *Wnt11* se expresaría en una región cercana a las CN que han comenzado a migrar. [np: placa neural; nc: crestas neurales; e: ectodermo; s: somito; nt: tubo neural; n: notocorda].

Wnt11 participa en la migración de las crestas neurales

Ya que *Wnt11* y *Fz7* se expresan en el lugar y momento adecuados para desempeñar un rol en la migración de las CN, se estudió si la sobreexpresión o la inhibición de *Wnt11* afectaba a la migración de estas células. Para los experimentos de ganancia y pérdida de función de *Wnt11*, se inyectó el RNAm de *Wnt11* o un constructo que actúa como un dominante negativo de este ligando (dn*Wnt11*), respectivamente (Tada & Smith 2000) (fig. 8A). Los RNAm se inyectaron en dos de los blastómeros dorsales en embriones en el estadio de 8 células, para así restringir la sobreexpresión de los constructos (*Wnt11* o dn*Wnt11*) a las células que darán origen a las CN. Luego, la expresión de *Xslug* se analizó antes o durante la migración de las CN. Las células inyectadas se identificaron por el color azul verdoso que se obtiene de la inmunotinción para FDX. La inyección de cualquiera de los constructos no afectó la inducción de las CN, determinado por la expresión del marcador de CN *Xslug*, incluso en aquellos casos en los que falló la gastrulación o los embriones presentaron problemas en el cierre del blastoporo (figs. 8B y D). Sin embargo, para descartar cualquier efecto en la migración de las CN producto de un cierre inapropiado del blastoporo, únicamente se analizaron embriones que presentaron una gastrulación normal. En este caso, el patrón de expresión de *Xslug* en los embriones inyectados, ya sea con *Wnt11* (fig. 8C) o con dn*Wnt11* (fig. 8E), mostraron un fenotipo similar al obtenido al usar los mutantes que bloquean la vía no-canónica de Wnt (Dsh- Δ N y Dsh-DEP+, ver figs. 6A y B). En conjunto, estos resultados apoyan la idea de que *Wnt11* participaría en el control de la migración de las CN, y no en la inducción de estas células.

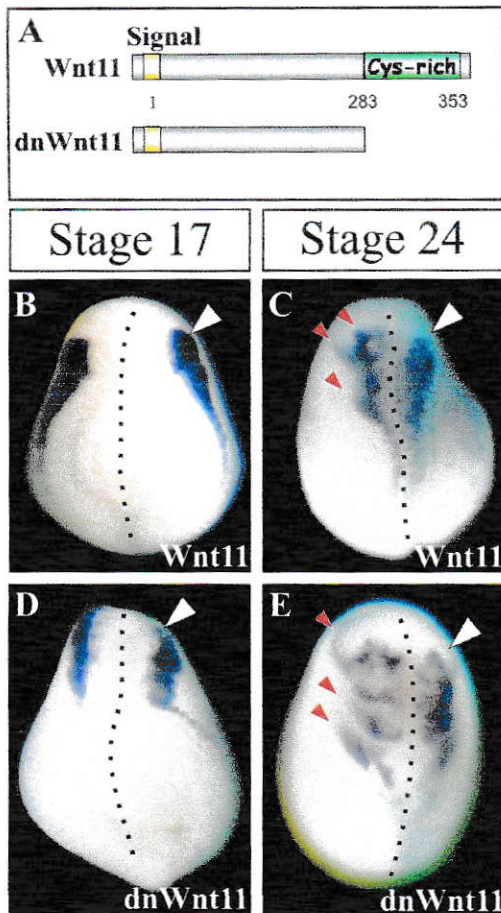


Figura 8

Wnt11 se requiere para la migración de las crestas neurales en el embrión de *Xenopus laevis*.

(A) esquema de los constructos de Wnt11 y el dnWnt11 usados en los experimentos de ganancia o pérdida de función, respectivamente.

(B y D) embriones en el estadio 17, y en el estadio 24 (C y E) mostrando la expresión de *Xslug*. La **cabeza de flecha blanca** marca el lado inyectado. Las **cabezas de flecha roja** indican las corrientes de migración cefálicas de las CN en el lado no inyectado.

(B) embriones inyectados con 1ng del RNAm *Wnt11*, o con 2ng del *dnWnt11* (C) en uno de los blastómeros animales en el estadio de ocho células.

(B y D) la microinyección de cualquiera de los constructos no afectó la inducción de las CN. Incluso, a pesar de que algunos embriones presentaron fallas durante la gastrulación.

(C y E) la sobreexpresión del RNAm de *Wnt11* y del *dnWnt11*, afectó la migración normal de las CN sólo en el lado inyectado del embrión.
Wnt11: 30%, (n= 55); **dnWnt11**: 35%, (n= 65).

Wnt11 tiene la capacidad de atraer a las crestas neurales

Las evidencias experimentales recopiladas en este trabajo, sugieren que Wnt11 es requerido para una correcta migración de las CN en el embrión de *Xenopus laevis*. Además, la expresión de *Wnt11*, adyacente a la de *Xslug*, plantea una nueva hipótesis: *Wnt11 tendría la capacidad de atraer a las células de las CN hacia regiones con altos niveles de expresión de este ligando, funcionando así como una molécula quimioatrayente*. Con el propósito de generar una fuente localizada de Wnt11 y probar esta hipótesis, se implantó un pedazo de ectodermo en la región dorsal del embrión el cual sobreexpresa *Wnt11*. El injerto se ubicó en forma opuesta a la expresión endógena de *Wnt11*, y opuesta también a la dirección normal de migración de las CN (fig. 9A), para así determinar, si la nueva fuente de *Wnt11* en el embrión tendría la capacidad de atraer o alterar el patrón normal de migración de las CN. Los injertos control (inyectados sólo con FDX), no tuvieron efecto sobre la migración de las CN (fig. 9D). Sin embargo, los injertos que sobreexpresan *Wnt11*, afectaron la migración de las CN (línea discontinua en las figs. 9C y E).

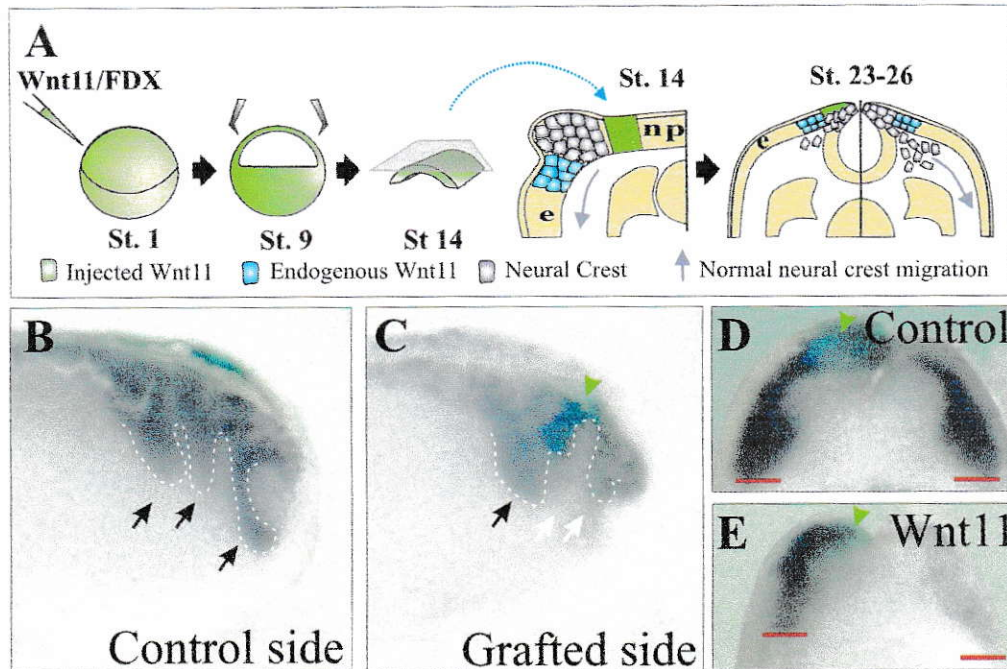


Figura 9

Wnt11 modula la ruta de migración de las crestas neurales.

(A) esquema del experimento de injerto de ectodermo como fuente de Wnt11. El injerto se implantó en el lado opuesto a la ruta de migración normal de las CN. (B - E) Embriones en estadio de una célula se inyectaron con FDX sin o con 1ng del RNAm *Wnt11*. Posteriormente, en el estadio 9 se disecó el ectodermo, el cual se plegó con la ayuda de un cubreobjetos y se cultivó hasta el equivalente al estadio 14, momento en el cual se realizó la cirugía. La migración de las CN se evaluó mediante hibridación *in situ* para el marcador de CN *Xslug*.

(B y D) embrión con injerto control (FDX). La línea punteada blanca demarca el territorio normal de migración de las CN. Las flechas negras indican las corrientes cefálicas de migración de las CN. No se observaron efectos en la migración de las CN.

(C y E) embrión con injerto que expresa *Wnt11*. Note en (C), que las corrientes de migración hoides y mandibular se han acortado con respecto al lado control.

[cabeza de flecha verde: indica la ubicación del injerto; barras rojas: indican el límite ventral de migración de las CN.

Además, cuando se usaron injertos de mayor tamaño, se detectó la expresión de *Xslug* en la base de ellos, con una ligera tendencia a ubicarse en el interior del tejido transplantado (figs. 10C-E).

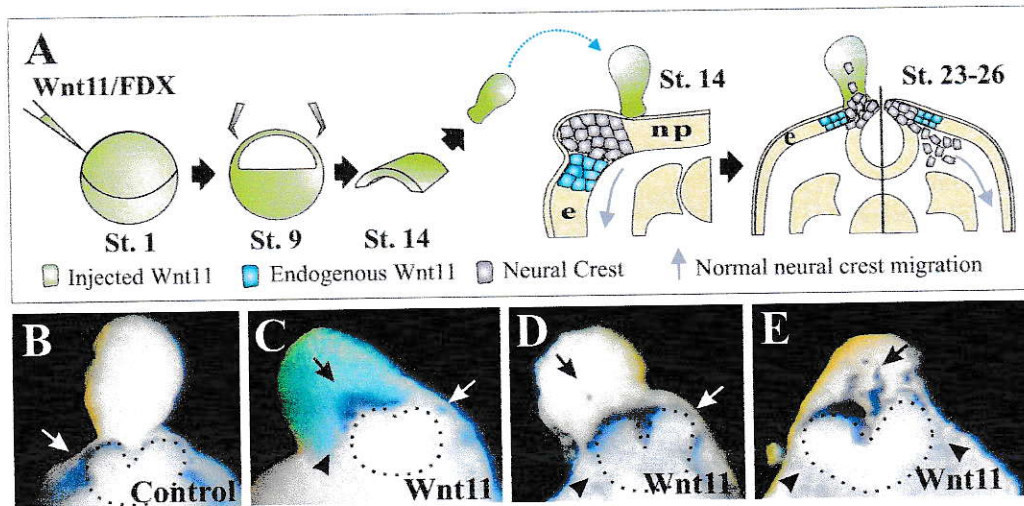


Figura 10

Wnt11 tiene capacidad quimioatrayente sobre las crestas neurales.

(A) esquema del experimento de injerto de ectodermo como fuente de Wnt11. El injerto se colocó opuesto a la ruta de migración de las CN (B - E).

Embriones en el estadio de una célula se inyectaron con FDX sin o con 1ng del RNAm *Wnt11*. Posteriormente, en el estadio 9, se disecó el ectodermo el cual se plegó con la ayuda de un cubreobjetos y se cultivó hasta el equivalente al estadio 14, momento en el cual se realizó la cirugía. La migración de las CN se evaluó mediante hibridación *in situ* para *Xslug*.

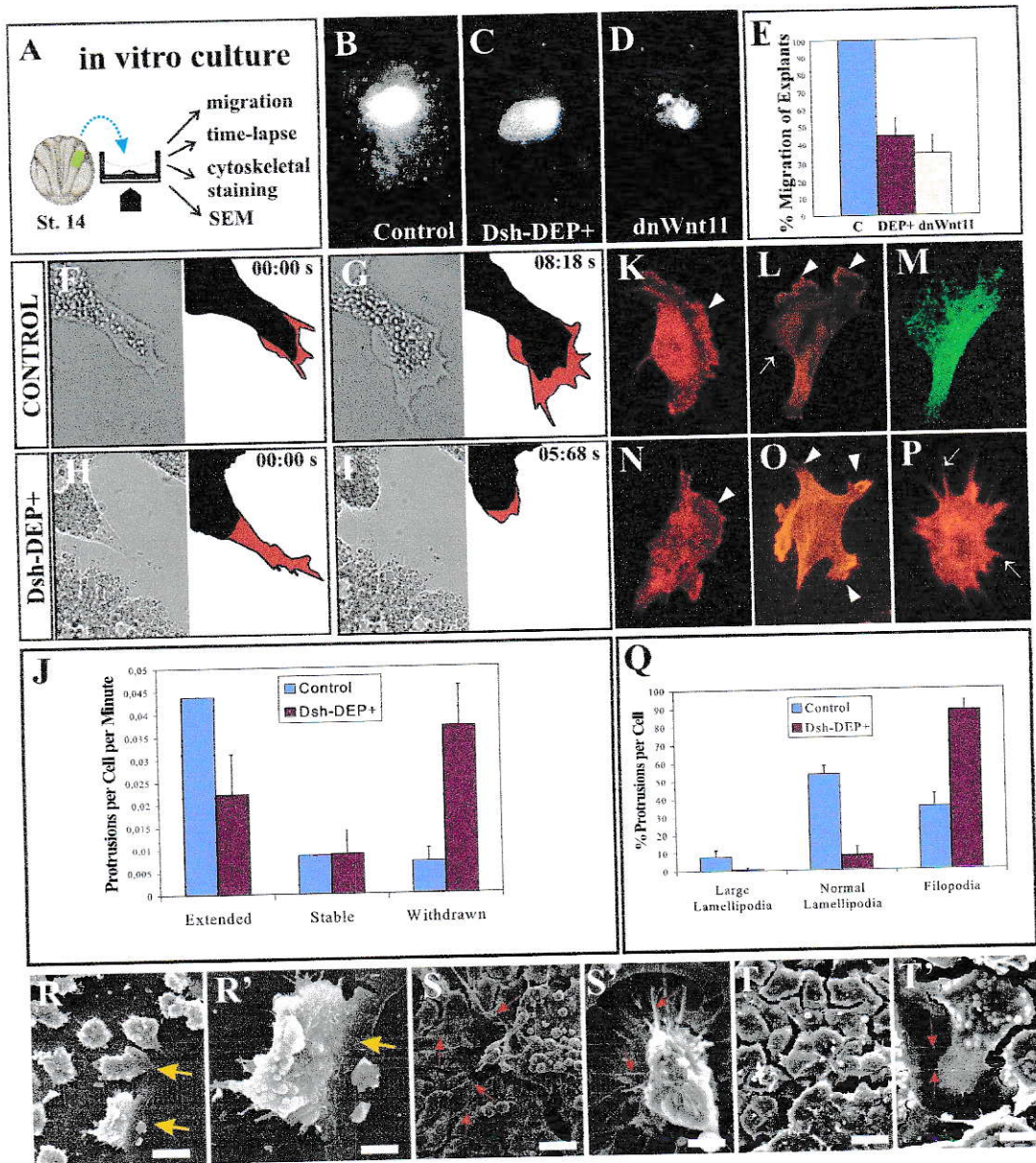
(B) embrión con injerto control (FDX). La **línea punteada** demarca el territorio del tubo neural; la **flecha blanca** indica la expresión de *Xslug* en las CN cefálicas, las cuales migraron normalmente sin mayores indicios de ser atraídas por el injerto.

(C, D y E) embriones con injertos que expresan *Wnt11*. En (C) inmunotinción contra fluoresceína para comprobar que los injertos provenían de embriones inyectados correctamente. La **flecha negra** indica la expresión de *Xslug* en células de la CN que migraron hacia el interior del injerto. La **flecha blanca** indica la migración normal de las CN cefálicas.

La vía no-canónica de Wnt modula el citoesqueleto de las crestas neurales

Durante la gastrulación de vertebrados se ha demostrado que las células del mesodermo que experimentan extensión convergente, orientan sus lamelipodios hacia el frente de avance. Esta actividad celular, estaría controlada por la vía no-canónica de Wnt (Carreira-Barbosa y col, 2003; Wallingford y col, 2000). Hasta ahora, este fenómeno no se ha descrito en la migración de las CN, por lo que se decidió investigar si se repetía este comportamiento en células individuales de las CN, evaluando además, si la vía no-canónica de Wnt participaría en la formación de estas prolongaciones. Para esto, se realizaron cultivos *in vitro* de explantes de las CN (fig. 12A) los que se cultivaron sobre un sustrato de fibronectina, tal como fue descrito previamente por Alfandari y col. (2003). Se comparó entonces, la migración de las células de la CN provenientes de embriones inyectados con Dsh-DEP+ o con el dnWnt11 (figs. 12C-E). Al igual que en los experimentos *in vivo* (figs. 6 y 8), la migración de las CN se vio alterada por la sobreexpresión de cualquiera de los constructos utilizados. Además, para examinar el efecto que tiene la inhibición de la vía no-canónica de Wnt sobre el comportamiento y morfología de las CN, se realizaron experimentos de migración *in vitro* de CN. Para esto, se analizó mediante video-microscopía de "time-lapse", la forma y número de las prolongaciones de la membrana plasmática de las células de la CN (figs. 12F-J). Los resultados mostraron que las células de los explantes de las CN que sobreexpresan Dsh-DEP+, emitieron menos prolongaciones que las células de los explantes control. Además, la frecuencia de retracción de estas prolongaciones fue mayor en las células que sobreexpresaron Dsh-DEP+ que en las CN control (fig. 12J). Para ampliar estas observaciones, se visualizó el citoesqueleto con una tinción para los filamentos de actina (usando faloidina-rodamina), y tubulina (con un anticuerpo anti-tubulina), y luego se analizó el tamaño y la forma de los lamelipodios (figs. 12K-P). En las células de la CN de los explantes control, los lamelipodios presentaron un mayor tamaño y una orientación polarizada hacia la dirección de avance de la célula, en comparación con los explantes que sobreexpresan Dsh-DEP+ (fig. 12Q). También se analizó la morfología de los explantes de las CN por microscopía electrónica de barrido (SEM) (figs. 12R-T). Las células de los explantes control, presentaron grandes lamelipodios en el frente de migración (flechas amarillas en la figs. 12R y R'), mientras que las células de los explantes de las

CN inyectadas con Dsh-DEP+ (figs. 12S y S'), o con el dnWnt11 (figs. 12T y T'), mostraron largos filopodios (flechas rojas).



*leyenda de figura 12 en la página siguiente.

Figura 12

La vía no-canónica de Wnt modula la formación de filopodios y lamelipodios en las crestas neurales del embrión de *Xenopus laevis*.

Para estudiar en detalle los posibles efectos de la vía no-canónica de Wnt sobre la migración de células individuales de la CN, se realizaron experimentos de migración *in vitro* con explantes de CN, analizando la migración y el comportamiento de la membrana plasmática.

(A) esquema de los experimentos de migración *in vitro* realizados.

(B-D) migración *in vitro* de las células de los explantes de CN. Una total ausencia de la migración, se observó en las células de los explantes inyectados con Dsh-DEP+ ($n=30$) (C), o con el dnWnt11 ($n=12$) (D), comparado con las células de los explantes control ($n=60$) (B). (E) estadística de al menos tres experimentos independientes realizados.

(F, G, H, I) fotos representativas del experimento de *time-lapse*, mostrando el comportamiento de la membrana plasmática de los explantes control (F, G), y de los explantes inyectados con Dsh-DEP+ (H, I). (J) cuantificación de la actividad de la membrana plasmática en los experimentos de *time-lapse*. Las células de los explantes inyectados con Dsh-DEP+ retrayeron (*withdrawn* en el gráfico) más veces su membrana plasmática que los explantes control. En cambio, las células de los explantes control fueron "más activas" en extender (*extended* en el gráfico) su membrana plasmática.

(K - P) análisis de los lamelipodios y filopodios presentes en las células de las CN fijadas durante el experimento de migración *in vitro*. (K, L, N - P) tinción con faloidina-rodamina (rojo), o con anti-tubulina (verde) (M) de las células de los explantes de CN control (K - M), o inyectadas con Dsh-DEP+ (N - P). Las cabezas de flecha blanca indican los lamelipodios, y las flechas blancas indican los filopodios. (Q) cuantificación de los lamelipodios y filopodios observados.

(R-T') análisis mediante SEM de los explantes de CN. (R y R') células control, la flecha amarilla indica un lamelipodio "grande" orientado hacia el frente de avance. (S y S') células de la CN provenientes de embriones inyectados con Dsh-DEP+, las flechas rojas indican los filopodios, los cuales están presentes en gran cantidad en comparación al control. (T y T') células de la CN provenientes de embriones inyectados con el dnWnt11, las flechas rojas indican los filopodios. [barra de escala en R-T': 10µm].

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Este trabajo sugiere la participación de la vía de señalización no-canónica de Wnt durante la migración de las CN en el embrión de *Xenopus laevis*. Lo más documentado en la literatura acerca de esta vía, es el papel que juega en la localización/organización de los pelos del ala de la mosca *Drosophila melanogaster*. Alteraciones en esta vía, producen diferentes fenotipos en los que la orientación y localización de los pelos se ven afectadas (Eaton & Cohen 1996; Gubb & Garcia-Bellido 1982; Held y col, 1986; Strutt y col, 1997; Winter y col, 2001; Wong & Adler 1993). Una importante característica del mecanismo por el que operaría la vía PCP, es la distribución asimétrica de sus moléculas dentro de las células. Esto ha sido bien estudiado en el ala de *Drosophila melanogaster*, donde las proteínas: Flamingo, Diego, Frizzled, Dishevelled, Strabismus y Prickle se alinean a lo largo del eje próximo-distal de cada célula (Axelrod 2001; Bastock y col, 2003; Feiguin y col, 2001; Shimada y col, 2001; Tree y col, 2002; Usui y col, 1999). Varios estudios sugieren que Frizzled tiene un papel clave en la vía PCP, en el que este receptor actuaría como un sensor de la información posicional dentro de la célula. Sin embargo, las moléculas que preceden la activación de Wnt siguen siendo un misterio. Se ha propuesto que las proto-caderinas Fat y Dachous, modularían la vía PCP previo a la interacción Frizzled/Dsh, en donde un gradiente de actividad de Fat, establecería la localización asimétrica de estas moléculas (Ma y col, 2003; Rawls y col, 2002; Yang y col, 2001). Sin embargo, el origen del gradiente de actividad de Fat aún se desconoce.

Uno de los más atractivos modelos de información posicional propuestos hasta ahora, se basa en la presencia de un morfógeno que activaría a Frizzled de forma dosis-dependiente (Adler y col, 2000; Fanto y col, 2003). La evidencia experimental, sugiere que esta molécula podría pertenecer a la familia Wnt, ya que son las únicas proteínas conocidas que se unen a los receptores Frizzled. A favor de esta hipótesis, están los resultados de este trabajo, los que muestran una expresión localizada de *Wnt11* justo en el borde de las CN premigratorias (fig. 7). Por otra parte, otros miembros de la familia Wnt que participarían en la vía no-canónica -como *Wnt4* y *Wnt5a*-, no tienen un patrón de expresión que se correlacione bien con una función

durante la migración de las CN (McGrew y col, 1992; Torres y col, 1996). Además, los estudios funcionales utilizando el dnWnt11, también apoyan la idea de que Wnt11 es esencial para la migración de las CN en *Xenopus laevis*.

Los experimentos de sobreexpresión localizada de *Wnt11*, sugieren que esta molécula es esencial para la migración de las CN. En primer lugar, la sobreexpresión de *Wnt11* en toda una mitad del embrión, alteró la migración normal de las CN (fig. 8). En segundo lugar, cuando *Wnt11* se sobreexpresó en forma localizada (detrás de su expresión normal), la migración de las CN también fue alterada (fig. 9). En tercer lugar, cuando *Wnt11* se sobreexpresó en la ruta normal de migración de las CN, las células migraron activamente hacia el lugar de expresión de *Wnt11* (figs. 9 y 10). En conjunto estos resultados sugieren, que la expresión localizada de *Wnt11* es necesaria para activar la vía no-canónica de Wnt y modular la migración de las CN. Aún se desconoce la función molecular de la expresión de *Wnt11* cercana a las CN. Sin embargo, en *Drosophila melanogaster*, se ha sugerido que un gradiente de Wnt11 permitiría la expresión/localización asimétrica de proteínas en la superficie de la membrana plasmática, lo cual orquestaría la direccionalidad de migración de las células.

Además de las pruebas que sugieren que la expresión localizada de *Wnt11* es necesaria para la normal migración de las CN, los experimentos usando los mutantes de Dsh muestran que la pérdida de señalización de la vía no-canónica de Wnt, interfiere con la migración de las CN. Por ejemplo, Dsh-DEP+ es un dominante negativo de Dsh que contiene sólo el dominio DEP de la proteína, y carece de los dominios DIX y PDZ. Este constructo, ha sido un reactivo ampliamente usado para analizar el rol de la vía no-canónica en otros modelos de migración celular, ya que bloquea la vía no-canónica de Wnt sin afectar la señalización de Wnt canónica (Tada & Smith 2000). En este trabajo, al utilizar este mutante se produjo una fuerte inhibición de la migración de las CN tanto *in vivo* (fig. 6) como *in vitro* (fig. 12). La sobreexpresión de Dsh-DEP+ no afectó la expresión del marcador específico de CN *Xslug* (fig. 5), sugiriendo que la falta de señalización no-canónica de Wnt no participa en la inducción de estas células. Otro mutante de Dsh -dd1- también alteró la migración de las CN (datos no mostrados). Sin embargo, este constructo interfiere a la vez con la vía

canónica de Wnt (Tada & Smith 2000), y por ende reduce la inducción de las CN (Bastidas y col, 2004).

La sobreexpresión de Wnt11 afectó la migración normal de las CN. Sin embargo, en algunos casos también afectó su inducción (datos no mostrados). Este efecto, puede explicarse como el resultado de una alteración en el desarrollo del mesodermo, o inhibición de la vía canónica mediada por señales generadas por Wnt no-canónicos (Maye y col, 2004; Prieve & Moon 2003; Torres y col, 1996). Por otra parte, resultados generados por nuestro laboratorio muestran que la inhibición de la vía canónica de Wnt, utilizando un dominante negativo del factor de transcripción Tcf, no inhibe la migración de las CN en el embrión de *Xenopus laevis* (Romero y Mayor, datos no publicados), lo que apoya la idea de que vías distintas participarían en los procesos de inducción y migración de las CN.

A pesar de que el o los receptores específicos para Wnt11 aún son desconocidos, existe evidencia experimental que involucra a Fz7 y Fz2 en la vía de señalización no-canónica de Wnt. Sin embargo, Fz7 es la única molécula que se ha descrito que participa en la gastrulación de vertebrados (Carreira-Barbosa y col, 2003; Djiane y col, 2000; Kuhl y col, 2000; Medina y col, 2000; Sumanas & Ekker 2001; Wang & Malbon 2004; Winklbauer y col, 2001). Además de estos antecedentes, este trabajo muestra que Fz7 se expresa en una población de las CN, justo antes y durante la migración de ellas. Cabe destacar que si se compara la expresión de Fz7 con el marcador de CN *Xslug*, sólo una subpoblación de las CN expresa el receptor para Wnt11 (fig. 7). Las células que expresan Fz7, son las más cercanas a las que expresan Wnt11, y serían las primeras en iniciar la migración. Por lo tanto, el patrón de expresión de Fz7 se correlaciona con el modelo propuesto por este trabajo, en el que Fz7 sería el receptor usado por Wnt11 para regular la migración de las CN. Alternativamente, otro(s) receptor(es) podría(n) estar involucrado(s), ya que se ha descrito que existe un cierto grado de promiscuidad entre los ligandos usados por los receptores Frizzled. En este trabajo, no se investigó si las CN lejanas a la expresión de Wnt11, son capaces de recibir o no esta señal. En relación a este mismo punto, la mayoría de los trabajos en la literatura sugieren que Wnt funcionaría como ligando de corto alcance (Arias 2003; Christian 2000).

La participación de la vía no-canónica de Wnt durante los movimientos celulares que ocurren durante la gastrulación han sido bien caracterizada en vertebrados. Sin embargo, los mecanismos moleculares por los que Wnt controla estos movimientos son todavía un misterio. Para el caso de la migración de las CN, sus células pasan por un dramático cambio conocido como la transición epitelio-mesénquima. Este fenómeno requiere la delaminación de las células de la CN -facilitado por la degradación de la matriz extracelular y la pérdida en la adhesión celular-, y una subsecuente activación de la maquinaria de movilidad de las células -por ejemplo, la expresión de Rho y Rac-GTPasas para la modulación del citoesqueleto-, lo cual es esencial para la migración.

Los resultados de los experimentos utilizando los mutantes de Dsh y Wnt11, muestran que la inhibición de la migración tanto *in vivo* como *in vitro* son compatibles con la idea de que existiría una inhibición ya sea en la delaminación, o en la posterior migración de las CN. Conforme a esta proposición, la expresión localizada de *Wnt11* (usando injertos de tejido que sobreexpresan *Wnt11*; figs. 9-11), muestra un efecto sobre la migración de las CN, que a su vez depende de la posición del injerto, o dicho de otra manera, depende de la ubicación de la fuente de expresión de *Wnt11*. Teniendo en cuenta estos resultados, Wnt11 podría modificar los procesos celulares involucrados en la delaminación y/o migración de las CN, sugiriendo que las células necesitarían de estas señales para una adecuada migración celular. Si la inhibición de la vía no-canónica de Wnt afecta específicamente a la delaminación de las CN previo a la migración, o a éste último proceso, es algo que falta por analizar. Sin embargo, los experimentos *in vitro* de migración usando explantes de las CN, que sobreexpresan Dsh-DEP+ o el dnWnt11 y su posterior análisis mediante SEM, sugieren fuertemente que la capacidad para formar lamelipodios y filopodios se modifica (fig. 12). Este último resultado, podría explicarse por una pérdida en la distribución polarizada de alguna de las moléculas involucradas en procesos de migración celular, tales como Rho, Rac u otras GTPasas.

La posibilidad de que la expresión de *Xslug*, encontrada en la base de los injertos (fig. 10), se deba a una inducción de las CN en el tejido transplantado, y no a una atracción de las CN endógenas, se puede descartar por evidencia experimental

previa (Bastidas y col, 2004; Mancilla & Mayor 1996), ya que la capacidad del ectodermo para responder a las señales inductivas de las CN se ha perdido previo al momento en el que se realizó el trasplante (E12).

El análisis de los filopodios y lamelipodios presentes en las células de las CN durante los ensayos de migración *in vitro*, sugieren fuertemente que la señalización no-canónica de Wnt participa en la formación de estas prolongaciones. La inhibición de esta vía mediante la sobreexpresión de Dsh-DEP+ o del dnWnt11, aumentó el número de células con filopodios “aleatorios” o menos polarizados. Resultados similares, también se han descrito durante la gastrulación de *Xenopus laevis* y en embriones del pez cebra (Ulrich y col, 2003; Wallingford y col, 2000).

Dado los resultados obtenidos en este trabajo, se puede concluir que Wnt11 modularía la adhesión celular y/o el comportamiento del citoesqueleto durante la migración de las CN. Su actividad, permitiría establecer de manera polarizada los filopodios y lamelipodios involucrados durante este último proceso.

AGRADECIMIENTOS ESPECIALES

Quiero agradecer muy especialmente a **Masazumi Tada** por sus comentarios al manuscrito que se generó como fruto de este trabajo (De Calisto y col, 2005), y por los reactivos donados para la ejecución del mismo. Doy las gracias también a **Claudio Stern, Michael Sargent y Claudia Linker** por sus comentarios al manuscrito; **Sergei Sokol, Christian González, Miguel Concha y Herbert Steinbeisser** por los reactivos y equipos prestados; y por supuesto a **Florencio Espinoza y Francisco Bastidas** por su asistencia técnica.

Esta investigación fue apoyada por una beca del Instituto Médico Howard Hughes a Roberto Mayor, y por subvenciones de la MRC, Fondecyt (#1020688), y el Programa Milenio (P99-137F y el ICM P02-050).

REFERENCIAS

- Acloque, H., Adams, M.S., Fishwick, K., Bronner-Fraser, M. y Nieto, M.A. (2009). "Epithelial-mesenchymal transitions: the importance of changing cell state in development and disease." *J Clin Invest* **119**(6): 1438-1449.
- Adler, P.N., Taylor, J. y Charlton, J. (2000). "The domineering non-autonomy of frizzled and van Gogh clones in the *Drosophila* wing is a consequence of a disruption in local signaling." *Mech Dev* **96**(2): 197-207.
- Alfandari, D., Cousin, H., Gaultier, A., Hoffstrom, B.G. y DeSimone, D.W. (2003). "Integrin $\alpha 5 \beta 1$ supports the migration of *Xenopus* cranial neural crest on fibronectin." *Dev Biol* **260**(2): 449-464.
- Arias, A.M. (2003). "Wnts as morphogens? The view from the wing of *Drosophila*." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **4**(4): 321-325.
- Axelrod, J.D. (2001). "Unipolar membrane association of Dishevelled mediates Frizzled planar cell polarity signaling." *Genes Dev* **15**(10): 1182-1187.
- Axelrod, J.D., Miller, J.R., Shulman, J.M., Moon, R.T. y Perrimon, N. (1998). "Differential recruitment of Dishevelled provides signaling specificity in the planar cell polarity and Wingless signaling pathways." *Genes Dev* **12**(16): 2610-2622.
- Aybar, M.J. & Mayor, R. (2002). "Early induction of neural crest cells: lessons learned from frog, fish and chick." *Curr Opin Genet Dev* **12**(4): 452-458.
- Aybar, M.J., Nieto, M.A. y Mayor, R. (2003). "Snail precedes slug in the genetic cascade required for the specification and migration of the *Xenopus* neural crest." *Development* **130**(3): 483-494.
- Basch, M.L., Garcia-Castro, M.I. y Bronner-Fraser, M. (2004). "Molecular mechanisms of neural crest induction." *Birth Defects Res C Embryo Today* **72**(2): 109-123.
- Bastidas, F., De Calisto, J. y Mayor, R. (2004). "Identification of neural crest competence territory: role of Wnt signaling." *Dev Dyn* **229**(1): 109-117.
- Bastock, R., Strutt, H. y Strutt, D. (2003). "Strabismus is asymmetrically localised and binds to Prickle and Dishevelled during *Drosophila* planar polarity patterning." *Development* **130**(13): 3007-3014.
- Borchers, A., David, R. y Wedlich, D. (2001). "*Xenopus* cadherin-11 restrains cranial neural crest migration and influences neural crest specification." *Development* **128**(16): 3049-3060.
- Boutros, M. & Mlodzik, M. (1999). "Dishevelled: at the crossroads of divergent intracellular signaling pathways." *Mech Dev* **83**(1-2): 27-37.
- Boutros, M., Paricio, N., Strutt, D.I. y Mlodzik, M. (1998). "Dishevelled activates JNK and discriminates between JNK pathways in planar polarity and wingless signaling." *Cell* **94**(1): 109-118.
- Bronner-Fraser, M., Wolf, J.J. y Murray, B.A. (1992). "Effects of antibodies against N-cadherin and N-CAM on the cranial neural crest and neural tube." *Dev Biol* **153**(2): 291-301.
- Carreira-Barbosa, F., Concha, M.L., Takeuchi, M., Ueno, N., Wilson, S.W. y Tada, M. (2003). "Prickle 1 regulates cell movements during gastrulation and neuronal migration in zebrafish." *Development* **130**(17): 4037-4046.
- Christian, J.L. (2000). "BMP, Wnt and Hedgehog signals: how far can they go?" *Curr Opin Cell Biol* **12**(2): 244-249.

- Curtin, J.A., Quint, E., Tsipouri, V., Arkeell, R.M., Cattanach, B., Copp, A.J., Henderson, D.J., Spurr, N., Stanier, P., Fisher, E.M., Nolan, P.M., Steel, K.P., Brown, S.D., Gray, I.C. y Murdoch, J.N. (2003). "Mutation of *Celsr1* disrupts planar polarity of inner ear hair cells and causes severe neural tube defects in the mouse." *Curr Biol* **13**(13): 1129-1133.
- De Calisto, J., Araya, C., Marchant, L., Riaz, C.F. y Mayor, R. (2005). "Essential role of non-canonical Wnt signalling in neural crest migration." *Development* **132**(11): 2587-2597.
- Djiane, A., Riou, J., Umbhauer, M., Boucaut, J. y Shi, D. (2000). "Role of frizzled 7 in the regulation of convergent extension movements during gastrulation in *Xenopus laevis*." *Development* **127**(14): 3091-3100.
- Dorsky, R.I., Moon, R.T. y Raible, D.W. (1998). "Control of neural crest cell fate by the Wnt signalling pathway." *Nature* **396**(6709): 370-373.
- Eaton, S. & Cohen, S. (1996). "Wnt signal transduction: more than one way to skin a (beta)-cat?" *Trends Cell Biol* **6**(8): 287-290.
- Fanto, M., Clayton, L., Meredith, J., Hardiman, K., Charroux, B., Kerridge, S. y McNeill, H. (2003). "The tumor-suppressor and cell adhesion molecule Fat controls planar polarity via physical interactions with Atrophin, a transcriptional co-repressor." *Development* **130**(4): 763-774.
- Feiguin, F., Hannus, M., Mlodzik, M. y Eaton, S. (2001). "The ankyrin repeat protein Diego mediates Frizzled-dependent planar polarization." *Dev Cell* **1**(1): 93-101.
- Gans, C. & Northcutt, R.G. (1983). "Neural crest and the origin of vertebrates: a new head." *Science* **220**(4594): 268-273.
- Gilbert, S.F. (2003). *Developmental biology*. Sunderland, Mass., Sinauer Associates.
- Goto, T. & Keller, R. (2002). "The planar cell polarity gene *strabismus* regulates convergence and extension and neural fold closure in *Xenopus*." *Dev Biol* **247**(1): 165-181.
- Gubb, D. & Garcia-Bellido, A. (1982). "A genetic analysis of the determination of cuticular polarity during development in *Drosophila melanogaster*." *J Embryol Exp Morphol* **68**: 37-57.
- Hall, B.K. (2008). "The neural crest and neural crest cells: discovery and significance for theories of embryonic organization." *J Biosci* **33**(5): 781-793.
- Harland, R. & Weintraub, H. (1985). "Translation of mRNA injected into *Xenopus* oocytes is specifically inhibited by antisense RNA." *J Cell Biol* **101**(3): 1094-1099.
- Harland, R.M. (1991). "In situ hybridization: an improved whole-mount method for *Xenopus* embryos." *Methods Cell Biol* **36**: 685-695.
- Heeg-Truesdell, E. & LaBonne, C. (2004). "A slug, a fox, a pair of sox: transcriptional responses to neural crest inducing signals." *Birth Defects Res C Embryo Today* **72**(2): 124-139.
- Heisenberg, C.P., Tada, M., Rauch, G.J., Saude, L., Concha, M.L., Geisler, R., Stemple, D.L., Smith, J.C. y Wilson, S.W. (2000). "Silberblick/Wnt11 mediates convergent extension movements during zebrafish gastrulation." *Nature* **405**(6782): 76-81.
- Held, L.I., Jr., Duarte, C.M. y Derakhshanian, K. (1986). "Extra joints and misoriented bristles on *Drosophila* legs." *Prog Clin Biol Res* **217A**: 293-296.
- Henderson, D.J., Ybot-Gonzalez, P. y Copp, A.J. (2000). "RhoB is expressed in migrating neural crest and endocardial cushions of the developing mouse embryo." *Mech Dev* **95**(1-2): 211-214.

- Hoffmann, I. & Balling, R. (1995). "Cloning and expression analysis of a novel mesodermally expressed cadherin." *Dev Biol* **169**(1): 337-346.
- Huang, X. & Saint-Jeannet, J.P. (2004). "Induction of the neural crest and the opportunities of life on the edge." *Dev Biol* **275**(1): 1-11.
- Jessen, J.R., Topczewski, J., Bingham, S., Sepich, D.S., Marlow, F., Chandrasekhar, A. y Solnica-Krezel, L. (2002). "Zebrafish trilobite identifies new roles for *Strabismus* in gastrulation and neuronal movements." *Nat Cell Biol* **4**(8): 610-615.
- Keller, R. (2002). "Shaping the vertebrate body plan by polarized embryonic cell movements." *Science* **298**(5600): 1950-1954.
- Kibar, Z., Vogan, K.J., Groulx, N., Justice, M.J., Underhill, D.A. y Gros, P. (2001). "*Ltap*, a mammalian homolog of *Drosophila Strabismus/Van Gogh*, is altered in the mouse neural tube mutant *Loop-tail*." *Nat Genet* **28**(3): 251-255.
- Kilian, B., Mansukoski, H., Barbosa, F.C., Ulrich, F., Tada, M. y Heisenberg, C.P. (2003). "The role of *Ppt/Wnt5* in regulating cell shape and movement during zebrafish gastrulation." *Mech Dev* **120**(4): 467-476.
- Kimura, Y., Matsunami, H., Inoue, T., Shimamura, K., Uchida, N., Ueno, T., Miyazaki, T. y Takeichi, M. (1995). "Cadherin-11 expressed in association with mesenchymal morphogenesis in the head, somite, and limb bud of early mouse embryos." *Dev Biol* **169**(1): 347-358.
- Klipp, E. & Liebermeister, W. (2006). "Mathematical modeling of intracellular signaling pathways." *BMC Neurosci* **7 Suppl 1**: S10.
- Knecht, A.K. & Bronner-Fraser, M. (2002). "Induction of the neural crest: a multigene process." *Nat Rev Genet* **3**(6): 453-461.
- Ku, M. & Melton, D.A. (1993). "*Xwnt-11*: a maternally expressed *Xenopus wnt* gene." *Development* **119**(4): 1161-1173.
- Kuhl, M. (2002). "Non-canonical Wnt signaling in *Xenopus*: regulation of axis formation and gastrulation." *Semin Cell Dev Biol* **13**(3): 243-249.
- Kuhl, M., Sheldahl, L.C., Park, M., Miller, J.R. y Moon, R.T. (2000). "The *Wnt/Ca2+* pathway: a new vertebrate Wnt signaling pathway takes shape." *Trends Genet* **16**(7): 279-283.
- Liu, J.P. & Jessell, T.M. (1998). "A role for *rhoB* in the delamination of neural crest cells from the dorsal neural tube." *Development* **125**(24): 5055-5067.
- Ma, D., Yang, C.H., McNeill, H., Simon, M.A. y Axelrod, J.D. (2003). "Fidelity in planar cell polarity signalling." *Nature* **421**(6922): 543-547.
- Mancilla, A. & Mayor, R. (1996). "Neural crest formation in *Xenopus laevis*: mechanisms of *Xslug* induction." *Dev Biol* **177**(2): 580-589.
- Maye, P., Zheng, J., Li, L. y Wu, D. (2004). "Multiple mechanisms for Wnt11-mediated repression of the canonical Wnt signaling pathway." *J Biol Chem* **279**(23): 24659-24665.
- Mayor, R. & Aybar, M.J. (2001). "Induction and development of neural crest in *Xenopus laevis*." *Cell Tissue Res* **305**(2): 203-209.
- Mayor, R., Morgan, R. y Sargent, M.G. (1995). "Induction of the prospective neural crest of *Xenopus*." *Development* **121**(3): 767-777.
- Mayor, R., Young, R. y Vargas, A. (1999). "Development of neural crest in *Xenopus*." *Curr Top Dev Biol* **43**: 85-113.
- McGrew, L.L., Otte, A.P. y Moon, R.T. (1992). "Analysis of *Xwnt-4* in embryos of *Xenopus laevis*: a Wnt family member expressed in the brain and floor plate." *Development* **115**(2): 463-473.

- Medina, A., Reintsch, W. y Steinbeisser, H. (2000). "*Xenopus* frizzled 7 can act in canonical and non-canonical Wnt signaling pathways: implications on early patterning and morphogenesis." *Mech Dev* **92**(2): 227-237.
- Meulemans, D. & Bronner-Fraser, M. (2004). "Gene-regulatory interactions in neural crest evolution and development." *Dev Cell* **7**(3): 291-299.
- Mlodzik, M. (2002). "Planar cell polarization: do the same mechanisms regulate *Drosophila* tissue polarity and vertebrate gastrulation?" *Trends Genet* **18**(11): 564-571.
- Myers, D.C., Sepich, D.S. y Solnica-Krezel, L. (2002). "Convergence and extension in vertebrate gastrulae: cell movements according to or in search of identity?" *Trends Genet* **18**(9): 447-455.
- Nakagawa, S. & Takeichi, M. (1995). "Neural crest cell-cell adhesion controlled by sequential and subpopulation-specific expression of novel cadherins." *Development* **121**(5): 1321-1332.
- Nakagawa, S. & Takeichi, M. (1998). "Neural crest emigration from the neural tube depends on regulated cadherin expression." *Development* **125**(15): 2963-2971.
- Nieuwkoop & Faber (1967). "*Normal Table of Xenopus laevis (Daudin)*". Elsevier-North Holland Publishing Co. Amsterdam.
- Northcutt, R.G. & Gans, C. (1983). "The genesis of neural crest and epidermal placodes: a reinterpretation of vertebrate origins." *Q Rev Biol* **58**(1): 1-28.
- Park, M. & Moon, R.T. (2002). "The planar cell-polarity gene *stbm* regulates cell behaviour and cell fate in vertebrate embryos." *Nat Cell Biol* **4**(1): 20-25.
- Perris, R. & Perissinotto, D. (2000). "Role of the extracellular matrix during neural crest cell migration." *Mech Dev* **95**(1-2): 3-21.
- Pla, P., Moore, R., Morali, O.G., Grille, S., Martinuzzi, S., Delmas, V. y Larue, L. (2001). "Cadherins in neural crest cell development and transformation." *J Cell Physiol* **189**(2): 121-132.
- Prieve, M.G. & Moon, R.T. (2003). "Stromelysin-1 and mesothelin are differentially regulated by *Wnt-5a* and *Wnt-1* in C57mg mouse mammary epithelial cells." *BMC Dev Biol* **3**(1): 2.
- Rauch, G.J., Hammerschmidt, M., Blader, P., Schauerte, H.E., Strahle, U., Ingham, P.W., McMahon, A.P. y Haffter, P. (1997). "*Wnt5* is required for tail formation in the zebrafish embryo." *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **62**: 227-234.
- Rawls, A.S., Guinto, J.B. y Wolff, T. (2002). "The cadherins *fat* and *dachsous* regulate dorsal/ventral signaling in the *Drosophila* eye." *Curr Biol* **12**(12): 1021-1026.
- Sadaghiani, B. & Thiebaud, C.H. (1987). "Neural crest development in the *Xenopus laevis* embryo, studied by interspecific transplantation and scanning electron microscopy." *Dev Biol* **124**(1): 91-110.
- Saint-Jeannet, J.P., He, X., Varmus, H.E. y Dawid, I.B. (1997). "Regulation of dorsal fate in the neuraxis by *Wnt-1* and *Wnt-3a*." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(25): 13713-13718.
- Sela-Donofeld, D. & Kalcheim, C. (1999). "Regulation of the onset of neural crest migration by coordinated activity of *BMP4* and *Noggin* in the dorsal neural tube." *Development* **126**(21): 4749-4762.
- Sela-Donofeld, D. & Kalcheim, C. (2000). "Inhibition of *noggin* expression in the dorsal neural tube by somitogenesis: a mechanism for coordinating the timing of neural crest emigration." *Development* **127**(22): 4845-4854.

- Shimada, Y., Usui, T., Yanagawa, S., Takeichi, M. y Uemura, T. (2001). "Asymmetric colocalization of *Flamingo*, a seven-pass transmembrane cadherin, and *Dishevelled* in planar cell polarization." *Curr Biol* **11**(11): 859-863.
- Smith, J.C., Conlon, F.L., Saka, Y. y Tada, M. (2000). "*Xwnt11* and the regulation of gastrulation in *Xenopus*." *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **355**(1399): 923-930.
- Sokol, S.Y. (1996). "Analysis of *Dishevelled* signalling pathways during *Xenopus* development." *Curr Biol* **6**(11): 1456-1467.
- Strutt, D.I., Weber, U. y Mlodzik, M. (1997). "The role of *RhoA* in tissue polarity and *Frizzled* signalling." *Nature* **387**(6630): 292-295.
- Sumanas, S. & Ekker, S.C. (2001). "*Xenopus frizzled-7* morphant displays defects in dorsoventral patterning and convergent extension movements during gastrulation." *Genesis* **30**(3): 119-122.
- Tada, M. & Smith, J.C. (2000). "*Xwnt11* is a target of *Xenopus Brachyury*: regulation of gastrulation movements via *Dishevelled*, but not through the canonical Wnt pathway." *Development* **127**(10): 2227-2238.
- Takeichi, M., Nakagawa, S., Aono, S., Usui, T. y Uemura, T. (2000). "Patterning of cell assemblies regulated by adhesion receptors of the cadherin superfamily." *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **355**(1399): 885-890.
- Takeuchi, M., Nakabayashi, J., Sakaguchi, T., Yamamoto, T.S., Takahashi, H., Takeda, H. y Ueno, N. (2003). "The *prickle*-related gene in vertebrates is essential for gastrulation cell movements." *Curr Biol* **13**(8): 674-679.
- Torres, M.A., Yang-Snyder, J.A., Purcell, S.M., DeMarais, A.A., McGrew, L.L. y Moon, R.T. (1996). "Activities of the *Wnt-1* class of secreted signaling factors are antagonized by the *Wnt-5A* class and by a dominant negative cadherin in early *Xenopus* development." *J Cell Biol* **133**(5): 1123-1137.
- Tree, D.R., Shulman, J.M., Rousset, R., Scott, M.P., Gubb, D. y Axelrod, J.D. (2002). "*Prickle* mediates feedback amplification to generate asymmetric planar cell polarity signaling." *Cell* **109**(3): 371-381.
- Ueno, N. & Greene, N.D. (2003). "Planar cell polarity genes and neural tube closure." *Birth Defects Res C Embryo Today* **69**(4): 318-324.
- Ulrich, F., Concha, M.L., Heid, P.J., Voss, E., Witzel, S., Roehl, H., Tada, M., Wilson, S.W., Adams, R.J., Soll, D.R. y Heisenberg, C.P. (2003). "*Sib/Wnt11* controls hypoblast cell migration and morphogenesis at the onset of zebrafish gastrulation." *Development* **130**(22): 5375-5384.
- Usui, T., Shima, Y., Shimada, Y., Hirano, S., Burgess, R.W., Schwarz, T.L., Takeichi, M. y Uemura, T. (1999). "*Flamingo*, a seven-pass transmembrane cadherin, regulates planar cell polarity under the control of *Frizzled*." *Cell* **98**(5): 585-595.
- Vallin, J., Girault, J.M., Thiery, J.P. y Broders, F. (1998). "*Xenopus cadherin-11* is expressed in different populations of migrating neural crest cells." *Mech Dev* **75**(1-2): 171-174.
- Veeman, M.T., Axelrod, J.D. y Moon, R.T. (2003a). "A second canon. Functions and mechanisms of beta-catenin-independent Wnt signaling." *Dev Cell* **5**(3): 367-377.
- Veeman, M.T., Slusarski, D.C., Kaykas, A., Louie, S.H. y Moon, R.T. (2003b). "Zebrafish *prickle*, a modulator of noncanonical Wnt/Fz signaling, regulates gastrulation movements." *Curr Biol* **13**(8): 680-685.

- Wallingford, J.B., Fraser, S.E. y Harland, R.M. (2002). "*Convergent extension: the molecular control of polarized cell movement during embryonic development.*" *Dev Cell* **2**(6): 695-706.
- Wallingford, J.B., Rowning, B.A., Vogeli, K.M., Rothbacher, U., Fraser, S.E. y Harland, R.M. (2000). "*Dishevelled controls cell polarity during Xenopus gastrulation.*" *Nature* **405**(6782): 81-85.
- Wang, H.Y. & Malbon, C.C. (2004). "*Wnt-frizzled signaling to G-protein-coupled effectors.*" *Cell Mol Life Sci* **61**(1): 69-75.
- Wheeler, G.N. & Hoppler, S. (1999). "*Two novel Xenopus frizzled genes expressed in developing heart and brain.*" *Mech Dev* **86**(1-2): 203-207.
- Winklbauer, R., Medina, A., Swain, R.K. y Steinbeisser, H. (2001). "*Frizzled-7 signalling controls tissue separation during Xenopus gastrulation.*" *Nature* **413**(6858): 856-860.
- Winter, C.G., Wang, B., Ballew, A., Royou, A., Karess, R., Axelrod, J.D. y Luo, L. (2001). "*Drosophila Rho-associated kinase (Drok) links Frizzled-mediated planar cell polarity signaling to the actin cytoskeleton.*" *Cell* **105**(1): 81-91.
- Wong, L.L. & Adler, P.N. (1993). "*Tissue polarity genes of Drosophila regulate the subcellular location for prehair initiation in pupal wing cells.*" *J Cell Biol* **123**(1): 209-221.
- Yang, W., Lin, Q., Zhao, J., Guan, J.L. y Cerione, R.A. (2001). "*The nonreceptor tyrosine kinase ACK2, a specific target for Cdc42 and a negative regulator of cell growth and focal adhesion complexes.*" *J Biol Chem* **276**(47): 43987-43993.