

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
ESCUELA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Expresión de la proteína vegt en embriones tempranos
de las ranas *Engystomops randi* y *Epipedobates machalilla*
en comparación con *Xenopus laevis*

Disertación previa a la obtención del título de Licenciado
en Ciencias Biológicas

ANDRÉS GARCÉS VÁSCONEZ

2012

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
ESCUELA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Certifico que la disertación de la Licenciatura en Ciencias Biológicas del candidato Andrés Garcés Vásconez ha sido concluida de conformidad con las normas establecidas; por lo tanto, puede ser presentada para la calificación correspondiente.

Dra. Eugenia M. del Pino V.

Directora de la Disertación

Quito, 9 de Noviembre del 2012

A mi familia

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mis padres que siempre han estado ahí en los momentos difíciles para ayudarme a levantar, y que a pesar de mis errores han tenido la paciencia para entenderme y encaminarme. A mi hermano Mateo que aunque se encuentra lejos siempre me ha brindado su apoyo. También a toda mi familia que me dio su afecto y comprensión en todo momento.

Agradezco de una manera especial a la Dra. Eugenia del Pino que me abrió las puertas de su laboratorio, y siempre me ha proporcionado su afecto, dedicación, valiosa y sabia guía en este trabajo.

Agradezco a las becas de investigación otorgadas a la Doctora Eugenia del Pino que me permitieron desarrollar este trabajo. También a la Balsa de los Sapos que donaron los embriones utilizados en este trabajo. Además, al Laboratorio de Biología de Desarrollo y sus miembros por la ayuda prestada para la elaboración de este trabajo. Agradezco de manera especial a Natalia Sáenz primero por su valiosa amistad y por la gran ayuda y paciencia.

También agradezco a mis amigos con los que compartí el estudio de mi carrera universitaria por su apoyo incondicional. De igual forma agradezco a Karina S. que siempre estuvo presente para apoyarme y escucharme cuando las cosas se dificultaban en el desarrollo de este trabajo.

TABLA DE CONTENIDOS

RESUMEN.....	14
ABSTRACT.....	16
INTRODUCCIÓN.....	18
MATERIALES Y MÉTODOS.....	30
4.1. MANTENIMIENTO EN CAUTIVERIO Y OBTENCIÓN DE EMBRIONES.....	30
4.2. OBSERVACIÓN Y MANIPULACIÓN DE EMBRIONES.....	31
4.2.1. SOLUCIONES Y TAMPONES.....	31
4.2.1.1. SOLUCIÓN STEINBERG.....	31
4.2.1.2. PBS (TAMPÓN FOSFATO SALINO).....	31
4.2.1.3. FIJATIVO MEMFA.....	31
4.2.1.4. SOLUCIÓN B DE SMITH.....	32
4.2.2. PROCESAMIENTO Y FIJACIÓN DE EMBRIONES.....	32
4.3. INMUNODETECCIÓN EN MONTAJE ENTERO.....	33
4.3.1. SOLUCIONES, TAMPONES Y ANTICUERPOS.....	33
4.3.1.1. TBS-Tr.....	33
4.3.1.2. TBTM.....	33
4.3.1.3. TAMPÓN DIG.....	33
4.3.1.4. SOLUCIÓN NBT.....	33
4.3.1.5. SOLUCIÓN BCIP.....	34
4.3.1.6. REACTIVO DE COLOR.....	34
4.3.1.7. TAMPÓN 4.....	34

4.3.1.8. ANTICUERPOS.....	34
4.3.1.8.1. ANTICUERPO PRIMARIO.....	34
4.3.1.8.2. ANTICUERPO SECUNDARIO.....	35
4.3.2. INMUNODETECCIÓN.....	35
4.3.3. PERMEABILIZACIÓN DE LOS EMBRIONES.....	35
4.3.4. BLOQUEO DE LA UNIÓN NO ESPECÍFICA.....	36
4.3.5. INCUBACIÓN CON EL ANTICUERPO PRIMARIO.....	36
4.3.6. LAVADOS DEL ANTICUERPO PRIMARIO.....	36
4.3.7. INCUBACIÓN CON EL ANTICUERPO SECUNDARIO.....	37
4.3.8. LAVADOS DEL ANTICUERPO SECUNDARIO.....	37
4.3.9. REACCIÓN DE COLOR.....	37
4.3.10. POSTFIJADO.....	38
4.4. PROCESAMIENTO DE EMBRIONES INMUNOTEÑIDOS.....	38
4.4.1. DESPIGMENTACIÓN DE EMBRIONES.....	38
4.4.2. ACLARAMIENTO DE EMBRIONES.....	38
4.4.3. BISECCIONES.....	39
4.4.4. SECCIONES DE VIBRATOMO.....	39
4.4.5. TINCIÓN FLUORESCENTE PARA NÚCLEOS CON HOECHST.....	40
4.4.6. ANÁLISIS Y FOTOGRAFÍA DE EMBRIONES ENTEROS, BISECCIONES Y SECCIONES.....	40
5. RESULTADOS.....	42
5.1. ESPECIFICIDAD DEL ANTICUERPO POLICLONAL ANTI-vegt.....	42
5.2. EXPRESIÓN DE vegt EN EMBRIONES DE <i>X.laevis</i>	43

5.2.1. EXPRESIÓN DE <i>vegt</i> EN EL ESTADIO DE GÁSTRULA TEMPRANA DE <i>X. laevis</i> (ESTADIO 10.25).....	43
5.3. EXPRESIÓN DE <i>vegt</i> EN EMBRIONES DE <i>E. randi</i>	43
5.3.1. EXPRESIÓN DE <i>vegt</i> EN EL ESTADIO DE 32 CÉLULAS DE <i>E. randi</i> (ESTADIO 6).....	43
5.3.2. EXPRESIÓN DE <i>vegt</i> EN EL ESTADIO DE BLÁSTULA DE <i>E. randi</i> (ESTADIO 8).....	44
5.3.3. EXPRESIÓN DE <i>vegt</i> EN EL ESTADIO DE GÁSTRULA TEMPRANA DE <i>E. randi</i> (ESTADIO 10).....	45
5.4. EXPRESIÓN DE <i>vegt</i> EN EMBRIONES DE <i>E. machalilla</i>	47
5.4.1. EXPRESIÓN DE <i>vegt</i> EN EL ESTADIO DE 32 CÉLULAS DE <i>E. machalilla</i> (ESTADIO 6).....	47
5.4.2. EXPRESIÓN DE <i>vegt</i> EN EL ESTADIO DE BLÁSTULA DE <i>E. machalilla</i> (ESTADIO 8).....	48
5.4.3. EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA <i>vegt</i> EN EL ESTADIO DE GÁSTRULA TEMPRANA DE <i>E. machalilla</i> (ESTADIO 10).....	49
6. DISCUSIÓN.....	50
6.1. EL ANTICUERPO UTILIZADO EN CONTRA DE LA PROTEÍNA <i>vegt</i> RECONOCE LA ISOFORMA MATERNA.....	50
6.1.1. EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA <i>vegt</i> EN EL CLIVAJE TARDÍO Y BLÁSTULA DE LAS ESPECIES ANALIZADAS.....	50
6.1.2. EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA <i>vegt</i> DURANTE LA GASTRULACIÓN EN LAS ESPECIES ANALIZADAS.....	53

6.2. IMPORTANCIA DE LA EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA vegt EN ESTUDIOS COMPARATIVOS.....	54
7. LITERATURA CITADA.....	55
8. FIGURAS.....	62
9. TABLAS.....	84
10. ANEXOS.....	88

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Especificidad del anticuerpo anti-vegt.....	63
Figura 2. Expresión en montaje entero de la proteína veqt en el estadio de gástrula temprana de <i>X. laevis</i> (estadio 10.25).....	64
Figura 3. Expresión interna de la proteína veqt en el estadio de gástrula temprana de <i>X. laevis</i> (estadio 10.25).....	65
Figura 4. Expresión en montaje entero de la proteína veqt en el estadio de 32 células de <i>E. randi</i> (estadio 6).....	66
Figura 5. Expresión interna de la proteína veqt en el estadio de 32 células de <i>E. randi</i> (estadio 6).....	68
Figura 6. Expresión en montaje entero de la proteína veqt en el estadio de blástula de <i>E. randi</i> (estadio 8).....	69
Figura 7. Expresión de la proteína veqt en la región animal y vegetal del estadio de blástula de <i>E. randi</i> (estadio 8).....	70
Figura 8. Expresión interna de la proteína veqt del estadio de blástula <i>E. randi</i> (estadio 8).....	71
Figura 9. Expresión en montaje entero de la proteína veqt en el estadio de gástrula temprana de <i>E. randi</i> (estadio 10).....	73
Figura 10. Expresión interna de la proteína veqt en el estadio de gástrula temprana de <i>E. randi</i> (estadio 10).....	75
Figura 11. Expresión de la proteína veqt en el estadio de 32 células de <i>E. machalilla</i> (estadio 6).....	76

Figura 12. Expresión en montaje entero de la proteína vegt en el estadio de blástula de <i>E. machalilla</i> (estadio 8).....	78
Figura 13. Expresión de la proteína vegt en la región animal del estadio de blástula de <i>E. machalilla</i> (estadio 8).....	79
Figura 14. Expresión de la proteína vegt en la región vegetal del estadio de blástula de <i>E. machalilla</i> (estadio 8).....	80
Figura 15. Expresión interna de la proteína vegt en el estadio de blástula de <i>E. machalilla</i> (estadio 8).....	81
Figura 16. Expresión en montaje entero de la proteína vegt en el estadio de gástrula temprana de <i>E. machalilla</i> (estadio 10).....	82
Figura 17. Expresión interna de la proteína vegt en el estadio de gástrula temprana de <i>E. machalilla</i> (estadio 10).....	83

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Lista de fotografías y créditos.....	85
---	----

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Localización espacial de <i>vegt</i> en <i>X. laevis</i> desde la oogénesis hasta la finalización de la gastrulación.....	89
Anexo 2. Modelo de regulación del <i>vegt</i> zigótico por las señales de <i>Eomesodermin</i> y <i>Nodal</i>	91
Anexo 3. Estructura genómica del locus de <i>vegt</i> en <i>X. tropicalis</i>	92
Anexo 4. Diagrama del sitio de reconocimiento del anticuerpo desarrollado en contra de la proteína <i>vegt</i>	93
Anexo 5. Secuencia de aminoácidos de la proteína <i>vegt</i> de <i>X. laevis</i>	94
Anexo 6. Detección de la proteína <i>vegt</i> por parte del anticuerpo (anti- <i>vegt</i>) por western blotting.....	95
Anexo 7. Características del desarrollo en diferentes ranas.....	96
Anexo 8. Expresión de la proteína <i>vegt</i> en el clivaje tardío, blástula y gástrula temprana de <i>X. laevis</i> (estadios 6, 8 y 10.25).....	97
Anexo 9. Patronamiento de la inducción mesodermal y mapa de destino en <i>E. coqui</i>	98

1. RESUMEN

Se estudió la expresión de la proteína vegt por inmuno-detección en montaje entero, en embriones de *Engystomops randi* (Leiuperidae) y *Epipedobates machalilla* (Dendrobatidae) en los estadios de clivaje tardío, blástula y gástrula en comparación con *Xenopus laevis*. Los objetivos fueron probar si el anticuerpo policlonal en contra de la proteína vegt de *X. laevis* (producido por el Dr. M. Taira y colaboradores, Universidad de Tokio, Japón) da reacción cruzada con embriones de otras especies para identificar a nivel molecular la localización del endodermo y endomesodermo presuntivo en embriones de diferentes ranas.

La expresión de la isoforma materna de vegt se detectó en el estadio de clivaje tardío y blástula, y hubo diferencias entre *E. randi* y *E. machalilla*. En *E. randi* la isoforma materna de vegt se localizó en una amplia zona marginal y región vegetal del clivaje tardío y blástula, mientras que en *E. machalilla* se localizó principalmente en la zona marginal en ambos estadios. Se considera que las regiones positivas para vegt corresponden al endodermo y endomesodermo de *E. randi* y *E. machalilla*. Se sugiere que la diferencia en el patrón de expresión de vegt esta asociada al tamaño del huevo y velocidad de desarrollo.

En la gástrula no se detectó a la isoforma zigótica de la proteína vegt en ninguna de las especies analizadas. Esta isoforma posiblemente tiene diferente estructura tridimensional en relación a la isoforma materna, o el sitio de reconocimiento del antígeno en la proteína podría estar enmascarado, dificultando la detección de la proteína zigótica de vegt. Estos resultados sugieren que la proteína vegt detectada por el anticuerpo corresponde a la isoforma materna de vegt.

Palabras Clave: blástula, *Engystomops randi*, *Epipedobates machalilla*, gástrula, proteína vegt, *Xenopus laevis*.

2. ABSTRACT

This work describes the vegt protein expression in the cleavage, blastula and gastrula of *Engystomops randi* (Leiuperidae) and *Epipedobates machalilla* (Dendrobatidae). In the frog *Xenopus laevis* (Pipidae), the vegt expression was only described at the gastrula stage. The method used to detect the vegt protein was the immuno-detection in whole amount. The aim of this work was to test if the polyclonal antibody against the vegt protein of *X. laevis* (developed by Dr. M. Taira and collaborators, Tokyo University, Japan) shows cross reaction with other species embryos in order to identify at molecular level the prospective endoderm and endomesoderm in different frog's embryos.

The maternal isoform expression of vegt protein was detected at late cleavage and blastula stage, and it showed differences between *E. randi* and *E. machalilla*. The maternal isoform of vegt in *E. randi* was located in a wide marginal zone and vegetal region at late cleavage and blastula stage, while in *E. machalilla* it was located in a wide marginal zone in both stages. Based on these results, it is considered that the positives regions for vegt correspond to the prospective endoderm and endomesoderm of *E. randi* and *E. machalilla*. It also suggested that the difference found in the vegt expression pattern is related to the egg size and the developmental speed.

At the gastrula stage the zygotic isoform of vegt was not detected in any of the analyzed species. This isoform may either have different tridimensional structure as compare with the maternal isoform, or the antigen target region in the protein could be masked. These may difficult the zygotic vegt protein detection. These results suggest that the vegt protein detected by the antibody corresponds to the maternal isoform of vegt.

Key words: blastula, *Engystomops randi*, *Epipedobates machalilla*, gastrula, vegt protein, *Xenopus laevis*.

3. INTRODUCCIÓN

Los embriones de los anfibios han sido los predilectos para realizar experimentos de la embriología debido a la ventaja en el tamaño de los huevos y a su fácil manipulación. Por la gran facilidad en la obtención de embriones de *X. laevis*, los científicos seleccionaron a esta rana acuática como el modelo para estudios en la Biología del Desarrollo (Browder e Iten, 1998).

En este trabajo se describe la expresión de la proteína vegt en embriones de *Xenopus laevis* (Pipidae), *Engystomops randi* (Leiuperidae) y *Epipedobates machalilla* (Dendrobatidae). Estas ranas presentan diferencias en su modo de reproducción y velocidad del desarrollo (del Pino *et al.*, 2007; Romero-Carvajal *et al.*, 2009). A continuación se detallan las características reproductivas, tamaño del huevo y velocidad del desarrollo de las especies a analizarse. *X. laevis* tiene hábito acuático durante todo su desarrollo y la etapa adulta, características que la diferencian de la mayoría de los anfibios (Duellman y Trueb, 1986). Las posturas de *X. laevis* contienen cientos de huevos que son depositados en el agua. Los huevos miden 1.2 mm de diámetro, aproximadamente. La rana *E. randi* se caracteriza por construir nidos de espuma que protegen a los embriones contra depredadores y desecamiento (IUCN, 2011). *E. randi* deposita en promedio 110 huevos. Los embriones dentro del nido se desarrollan hasta la eclosión de los renacuajos. Los huevos son de coloración blanca y miden 1.1 mm de diámetro (Romero-Carvajal *et al.*, 2009). La rana *E. machalilla* tiene nidos terrestres. El cuidado parental asume el macho después que las hembras abandonan el nido (Coloma, 1995). *E. machalilla* deposita 15 embriones en promedio por postura. Los huevos miden 1.6 mm de diámetro y son de color oscuro debido a la presencia de pigmento en el polo animal del huevo (del Pino *et al.*, 2004).

En el Laboratorio de Biología del Desarrollo de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador se inició el estudio de ranas ecuatorianas analizando el desarrollo temprano de la rana *Gastrotheca riobambae* (Hemiphractidae) (IUCN, 2004). En esta rana se observó que el tiempo requerido para finalizar la gastrulación a partir de la fecundación del huevo es de 14 días (del Pino *et al.*, 2007). A esta rana se la considera de desarrollo temprano lento porque su tiempo requerido para finalizar la gastrulación es más largo que el presentado por *X. laevis*, cuyo desarrollo temprano se considera rápido ya que el tiempo que se demora en terminar la gastrulación es de 14 horas (Niewkoop y Faber, 1994). Además, en *G. riobambae* se observó que las células que involucionan por el labio del blastoporo provocan que este se engrose debido a que las células permanecen en este sitio durante la gastrulación. Esta acumulación de células forma un gran collar circumblastoporal que al momento del cerramiento del blastoporo constituirá el disco embriónico. El disco embriónico se desarrolla alrededor del cerramiento del blastoporo, y a partir de este se derivará el cuerpo del embrión (Elinson y del Pino, 2012). La presencia de este disco embriónico se asemeja a lo que ocurre en el desarrollo del pollo aunque no son estructuras homólogas ya que los embriones de *G. riobambae* tienen clivaje holoblástico, presentan involución de células en el labio dorsal y forman un blastoporo (Elinson y del Pino, 2012).

Estos resultados dieron lugar a estudios comparativos con otras especies de ranas ecuatorianas. Se analizó el desarrollo temprano de la rana *E. machalilla*. En esta rana se observó que el tiempo de gastrulación a partir de la fecundación del huevo es de 4 días. A esta rana se la considera de desarrollo temprano lento, en comparación con *X. laevis* (del Pino *et al.*, 2004). En *E. machalilla* se observó que durante la gastrulación acumula células en el collar circumblastoporal como *G. riobambae*, pero no se produce la formación de un disco embriónico

(Elinson y del Pino, 2012). También se estudió el desarrollo temprano de la rana *E. randi*. Se determinó que en esta rana el tiempo requerido para finalizar la gastrulación a partir de la fecundación del huevo es de 24 horas, ligeramente más lento que *X. laevis*. Por tal motivo, a *E. randi* se la considera como rana de desarrollo rápido.

En las ranas *E. randi*, *E. machalilla* y *G. riobambae* se realizaron estudios moleculares para determinar variaciones en los modos de gastrulación entre estas tres ranas. Mediante la expresión de las proteínas Brachyury y Lhx1 (conocido previamente como Lim1) se demostró que en la gástrula media de *E. randi*, el alargamiento del arquenterón, el notocordio y la convergencia y extensión dorsales coinciden con la involución en el labio dorsal del blastoporo, como sucede en embriones de *X. laevis* (Venegas-Ferrín *et al.*, 2010). En embriones de *E. machalilla*, la involución y limitado alargamiento del arquenterón ocurren simultáneamente durante la gastrulación; mientras que el alargamiento del notocordio y, por lo tanto, la convergencia y extensión dorsales, están retrasados hasta después de la gastrulación, es decir después del cierre del blastoporo (Benítez y del Pino, 2002; Elinson y del Pino, 2012). En cambio, en los embriones de *G. riobambae* solamente la involución ocurre durante la gastrulación. Los procesos de alargamiento del arquenterón, extensión del notocordio y la convergencia y extensión dorsal son eventos post-gastrulación, similar a *E. machalilla* (del Pino, 1996; Elinson y del Pino, 2012).

La diferencia temporal del organizador es otro ejemplo de divergencia en el modo de gastrulación en ranas que difieren en la velocidad de desarrollo. El organizador se desarrolla del labio dorsal del blastoporo y está dividido en cabeza, tronco y cola. El organizador de la cabeza y tronco están representados por la placa precordial y el notocordio, respectivamente. La expresión de Lhx1 reveló la presencia simultánea de ambos organizadores durante la gastrulación en las

ranas de desarrollo rápido, *X. laevis* y *E. randi* (Venegas-Ferrín *et al.*, 2010). En cambio, en la rana de desarrollo lento, *E. machalilla*, se observó que el organizador del tronco está separado temporalmente del organizador de la cabeza, ya que el organizador del tronco en esta rana fue detectado después del cerramiento del blastoporo. En embriones de la rana de desarrollo lento *Gastrotheca riobambae* la placa precordial no pudo ser claramente detectada. Mientras que la expresión de la proteína Lhx1 en el notocordio fue detectada después del cierre del blastoporo al igual que en *E. machalilla* (Venegas-Ferrín *et al.*, 2010).

Los estudios realizados en *E. randi*, *E. machalilla* y *G. riobambae* demostraron que existen variaciones en los modos de gastrulación entre estas ranas, y que estas diferencias están asociadas a la velocidad de desarrollo. Los trabajos realizados en estas ranas brindan la base para el análisis comparativo de la localización del endodermo y mesodermo presuntivo mediante la detección de la proteína vegt en embriones tempranos de *E. randi* y *E. machalilla* (Elinson y del Pino, 2012). En embriones de la rana *G. riobambae* no se realizó la detección de la proteína vegt porque no hubo reproducción de estas ranas, por lo tanto, no hubo disponibilidad de embriones.

La formación de las capas germinales es uno de los eventos embriónicos más tempranos para subdividir embriones multicelulares en pocos compartimientos (Yasuo y Lemaire, 2001). En vertebrados, durante la gastrulación, se especifican las tres capas germinales primarias: ectodermo, mesodermo y endodermo (Wolpert *et al.*, 2007). En *X. laevis* las capas germinales se especifican en respuesta a señales provenientes de factores maternos (Wolpert *et al.*, 2007). En *X. laevis*, el dominio espacial de las tres capas germinales primarias se separan a lo largo del eje animal-vegetal antes del proceso de gastrulación. El ectodermo se ubica en el polo animal, el mesodermo en la zona marginal por inducción proveniente de la región vegetal y el endodermo en el polo vegetal. El ectodermo ventral formará la epidermis y el ectodermo dorsal el sistema

nervioso. En la zona marginal, alrededor de la zona marginal, se formará el mesodermo el cual se subdivide a lo largo del eje dorso-ventral. El mesodermo más dorsal dará origen al notocordio, el mesodermo ventral formará sangre y riñones y el mesodermo ubicado entre ellos dará lugar a los somitas y al corazón. La región vegetal de la blástula formará el endodermo el cual dará origen al intestino (Wolpert *et al.*, 2007; Yasuo y Lemaire, 2001).

La especificación del mesodermo involucra a la inducción embrionaria (Wolpert *et al.*, 2007). En la inducción embriónica, un tejido denominado inductor gatilla la diferenciación de otro tejido adyacente o cercano denominado inducido (Smith, 1989). Inducción embrionaria instructiva es la influencia de un grupo de células o tejidos sobre otros para que estos últimos adquieran una diferenciación distinta de la que tendrían en ausencia de inducción o en presencia de otro tipo de inductor. La inducción del mesodermo en *X. laevis* es el mejor ejemplo de inducción instructiva (revisado por Gurdon, 1987; Wolpert *et al.*, 2007).

Las señales inductoras se pueden transmitir entre células mediante tres vías principales. Primero, la señal puede trasladarse a través del espacio extracelular, usualmente por medio de una molécula difusible secretada. Segundo, las células pueden interactuar directamente entre ellas por medio de moléculas localizadas en su superficie. En ambos casos, la señal generalmente se recibe por medio de receptores proteicos ubicados en la membrana celular y subsecuentemente se transmite a través de sistemas intracelulares de señalización para producir la respuesta celular. Tercero, la señal puede pasar de célula a célula directamente por canales presentes entre las células (revisado por Papin *et al.*; 2005; Wolpert *et al.*, 2007). En células animales esta comunicación directa ocurre a través uniones formadas por proteínas especializadas que se encuentran ubicadas en la membrana plasmática. Estas proteínas proveen canales directos de comunicación entre los citoplasmas de células adyacentes, permitiendo de

esta manera el paso de pequeñas moléculas (revisado por Jordan *et al.*; 2000; Wolpert *et al.*, 2007). En el caso de la señalización por una molécula difusible, o por contacto directo, la señal se recibe en la membrana celular. Si la señal es para alterar la expresión génica en el núcleo, ésta tiene que ser transmitida desde la membrana hacia el interior de la célula. Este proceso se conoce como transducción de señales (Wolpert *et al.*, 2007).

Los genes que participan en el desarrollo embrionario codifican para proteínas involucradas en la regulación de receptores, factores de crecimiento y proteínas de señalización intracelular (Wolpert *et al.*, 2007). Para producir una proteína particular su gen debe ser activado, transcrito a RNA mensajero (mRNA) y traducido a proteína. Las proteínas también pueden ser codificadas por el procesamiento de RNA. El transcrito inicial de RNA de muchos genes, en eucariotes, puede perder sus intrones de diferentes maneras y dar lugar a dos o más diferentes mRNAs por empalme alternativo; de esta forma, un gen puede ser capaz de producir un número de diferentes proteínas con diferentes propiedades (Gilbert, 2003; Wolpert *et al.*, 2007).

La expresión génica en el desarrollo está bajo el manejo de complejas regiones de control, las cuales se encuentran ubicadas adyacentes a la mayoría de los genes que actúan en el desarrollo. Estas regiones de control están compuestas por uno o más módulos de regulación conocidas como módulos de regulación *cis* (*cis* se refiere al hecho de que el módulo de regulación está en la misma cadena de la molécula de DNA que el gen) (Wolpert *et al.*, 2007). Las regiones de control están reguladas por la acción de proteínas reguladoras o por factores de transcripción que se encargan de activar o desactivar la transcripción (Gilbert, 2003; Howard y Davidson, 2004). Algunos de estos genes reguladores de proteínas actúan ligados directamente a las regiones de control, mientras que otros interactúan con los factores de transcripción ya unidos al DNA (Wolpert *et al.*, 2007). Los genes que actúan en el desarrollo son altamente regulados

con el fin de asegurar que sean activados solamente en el momento y lugares precisos del desarrollo. Cada molécula de DNA tiene múltiples sitios de ligamiento para diferentes factores de transcripción, y la combinación de los factores que se ligan determinan si el gen se activa o no (Howard y Davidson, 2004; Wolpert *et al.*, 2007).

Los estadios tempranos del desarrollo de *X. laevis* y del pez cebra están bajo el control de factores maternos presentes en el oocito (Wolpert *et al.*, 2007). Los factores maternos son de genes expresados durante la ovogénesis son depositados en el citoplasma del oocito como mRNA y las proteínas maternas mientras se está formando en el cuerpo de la hembra (Wolpert *et al.*, 2007; Yasuo y Lemaire, 2001). Se ha encontrado que el huevo de *X. laevis* contiene gran cantidad de mRNAs y proteínas almacenadas. Hay un número de mRNAs maternas que codifican proteínas que tienen funciones específicas en el desarrollo. Estas proteínas están diferencialmente localizadas a lo largo del eje animal-vegetal del huevo antes del clivaje (Yasuo y Lemaire, 2001). La expresión de la mayoría de los mRNAs maternas en el huevo se traduce después de la fertilización (Wolpert *et al.*, 2007; Kofron *et al.*, 1999). Las señales que producen la inducción del mesodermo provienen de genes zigóticos regulados por factores de crecimiento maternos, los cuales participan en este proceso solo después de la transcripción zigótica (revisado por Kofron *et al.*, 1999 y Zhang *et al.*, 1998).

En *X. laevis*, existen tres vías de señalización molecular que explican la manera en que el mesodermo se especifica y adquiere su patrón dorso-ventral (Gilbert, 2003). La vía de inducción mesodermal primaria proviene de la región vegetal-ventral de la blástula induce la formación del mesodermo ventral. Esta vía utiliza las señales *vegt*, *Nodal* (*Xenopus* Nodal-related proteins), *Derriere* y *Activin*, entre otros miembros de la superfamilia TGF- β (revisado por Gilbert, 2003; Ghaskadbi, 1996). La segunda vía proviene del centro de Nieuwkoop, en la región vegetal-dorsal

de la blástula, y se encarga de inducir al mesodermo dorsal o futuro organizador de Spemann-Mangold en la región dorsal (revisado por Wolpert *et al.*, 2007; Smith, 1989; Ghaskadbi, 1996). Este grupo de señales actúan mediante la vía canónica de señalización de Wnt (revisado por Heasman, 2006). Las dos primeras señales ocurren en la blástula temprana (revisado por Ghaskadbi, 1996). La tercera señal ocurre probablemente durante la gastrulación y proviene del organizador de Spemann. Esta señal resulta en la formación de músculo, pronefros y sangre en el mesodermo ventral. Las proteínas secretadas por el organizador de Spemann son *Noggin*, *Chordin*, *Follistatin*, *Frizbee*, *Cerberus* entre otras (revisado por Wolpert *et al.*, 2007; Smith, 1989; Ghaskadbi, 1996).

El gen *vegt*, cuya expresión es objeto de este estudio, pertenece a la familia T-box. Los miembros de la familia T-box son factores de transcripción que contienen el dominio T. Dicho dominio es un motivo proteico que presenta similitud entre sus regiones amino-terminales, y contiene una única secuencia específica de ligamiento al DNA (Wilson y Conlon, 2002). Los miembros de la familia T-box juegan un papel esencial en el control de muchos aspectos de la embriogénesis en varios organismos. Los genes pertenecientes a esta familia exhiben diversos patrones de expresión espacial y temporal en el desarrollo del embrión. Mediante estudios genéticos y moleculares se ha demostrado su importancia en el desarrollo embrionario ya que participan en la especificación de las capas germinales primarias y en la especificación de la identidad celular durante la organogénesis (revisado por Showell *et al.*, 2004). Los genes que se expresan zigóticamente en el mesodermo, pertenecientes a dicha familia, en *X. laevis* son *brachyury* (*Xbra*), *eomesodermin* (*x-Eomes*), *Tbx6* y *vegt* (Fukuda *et al.*, 2010).

En *X. laevis* la proteína *vegt/antipodean* se encuentra en dos diferentes isoformas con distintos dominios N-terminal resultantes del empalme alternativo de la terminación 5' de los

transcritos de un único gen *vegt/apod* (Stennard *et al.*, 1999; Wilson y Conlon, 2002). Una isoforma de esta proteína se la refiere como *vegt* maternal y la otra isoforma, de menor peso molecular, se la refiere como *vegt* zigótico (Stennard *et al.*, 1999).

En *X. laevis* la traducción de *vegt* materno se inicia después de la fecundación y la proteína se encuentra en el endodermo presuntivo desde el huevo fecundado hasta la etapa final del clivaje; la traducción de *vegt* no ocurre durante la oogénesis (Stennard *et al.*, 1999; Wilson y Conlon, 2002). La proteína *vegt* maternal participa en la iniciación y mantenimiento de la expresión de factores de transcripción zigóticos endodermales (*Sox7*, *Sox17*, *Bix4*, y *Endodermin*) requeridos para la especificación del endodermo. Estos factores de transcripción zigóticos se expresan en la región vegetal de la blástula tardía y la gástrula temprana (Xanthos *et al.*, 2001; Fukuda *et al.*, 2010).

La localización de los transcritos de *vegt* en el oocito de *X. laevis* se encuentran distribuidos uniformemente por todo el embrión (Anexo 1A y B). En el oocito de *E. machalilla*, se ha encontrado variación de la localización de los transcritos de *vegt*, en comparación con *X. laevis*. En esta rana los transcritos de *vegt* se encuentran solo en la región vegetal (Pérez, 2008; Prado, 2011). Sin embargo, en el estadio de una célula se observó que los transcritos de *vegt* se encuentran en la región animal (Pérez, 2008). En la rana de desarrollo directo *E. coqui* también se ha encontrado variación en la localización de los transcritos de *vegt* a nivel de oocito con respecto a *X. laevis*. En esta rana *vegt* se localiza en la región animal del oocito (Beckham *et al.*, 2003), similar a *E. machalilla*. En *E. coqui* la diferente localización de *vegt* en el oocito esta asociado al tamaño del huevo y a la diferente ubicación de la actividad molecular que induce el mesodermo (Ninomiya *et al.*, 2001). Además, en esta rana se hipotetiza que el endodermo

nutritivo ocupa una amplia zona de la región vegetal, lo que estaría relacionado al tamaño de su huevo (Elinson y del Pino, 2012).

En *X. laevis*, la proteína *vegt* maternal participa en la especificación del endodermo y se localiza en la región vegetal de la blástula, en el endodermo presuntivo (Stennard *et al.*, 1999). En la blástula, la proteína *vegt* maternal en cooperación con la β catenina inducen directamente la expresión zigótica de *Xnrs* (*Xenopus* Nodal-related genes). Los *Xnrs* codifican moléculas de señalización del factor de crecimiento β (TGF- β), los cuales tienen papeles esenciales en la inducción del mesodermo (Fukuda *et al.*, 2010).

Para definir el papel del gen *vegt* en el endodermo, J. Zhang y colaboradores eliminaron el RNA de *vegt* maternal de oocitos de *X. laevis* usando la técnica de oligonucleótidos anti-sentido. Esta alteración resultó en varias anormalidades fenotípicas como defectos en el desarrollo de la cabeza e intestino, y reducción de la expresión génica del endodermo y mesodermo. La ausencia de *vegt* maternal afectó la correcta expresión de marcadores endodermales y mesodermales. Los marcadores endodermales *endodermin*, *Xsox17a*, *Xlhox8*, *insulin* y *IFABP* presentaron reducción o ausencia de su expresión en el estadio de yema de la cola. En cambio, los marcadores mesodermales *chordin*, *XMyoD*, *Xwnt 8* y *Mix1* presentaron retraso en su expresión, en relación a los controles. Esta reducción de la expresión génica está asociada a cambios drásticos en el arreglo espacial de las capas germinales primarias. Por ejemplo, la región vegetal, la cual forma normalmente el endodermo, dio origen a mesodermo. Además, la mayoría de células vegetales se internalizaron y sufrieron movimientos de convergencia y extensión dorsales, característicos del mesodermo (revisado por Showell *et al.*, 2004 y Zhang *et al.*, 1998).

En *Xenopus tropicalis* la proteína *vegt* maternal participa en el inicio del proceso de la formación del mesodermo paraxial. La proteína *vegt* maternal, en el estadio 9, regula la expresión de las señalizaciones *Nodal*, las cuales a su vez inducen la expresión del gen *Eomesodermin* (*Eomes*) (Fukuda *et al.*, 2010). En el estadio 9.5 las señales *Nodal* y la expresión de *Eomes*, en conjunto y simultáneamente, activan la expresión zigótica de *vegt* la cual es requerida para la especificación subsecuente y el patronamiento del mesodermo (Anexo 2) (Fukuda *et al.*, 2010).

El transcrito zigótico de *vegt* tiene una secuencia de nucleótidos idéntica a la del transcrito materno de *vegt*. La única diferencia se encuentra en la secuencia terminal del extremo 5'. Esta diferencia se debe al empalme alternativo del transcrito primario del único locus del gen *vegt* (Anexo 3) (Fukuda *et al.*, 2010). Los transcritos zigóticos de *vegt* se localizan en el mesodermo presuntivo, inicialmente en el lado dorsal de la zona marginal al inicio de la gastrulación (Fukuda *et al.*, 2010). Después, en la gástrula media, se expresa uniformemente dentro de la zona marginal que formará el mesodermo prospectivo, y en la gástrula tardía la expresión de los transcritos zigóticos *vegt* se excluyen de la región donde se forma el notocordio (Anexo 1D – H) (Fukuda *et al.*, 2010). Luego de la gastrulación, los niveles de dichos transcritos se reducen rápidamente quedando confinados a un pequeño subconjunto de neuronas en el sistema nervioso central hasta las primeras etapas de la fase de renacuajo (revisado por Showell *et al.*, 2004).

Se conoce la secuencia parcial de *vegt* en *Eleutherodactylus coqui*, *E. machalilla*, *G. riobambae*, *Pipa pipa* y *Rana pipiens* (Revisado por Pérez *et al.*, 2007). Al comparar los ortólogos de *vegt* en estas especies se observa que *E. coqui*, *E. machalilla* y *R. pipiens* tienen una secuencia conservada de 57 aminoácidos en la región C- terminal. La secuencia extremadamente

conservada es MSDWSQ que corresponde a 17 nucleótidos cerca a la terminación 3' (Pérez *et al.*, 2007).

En este trabajo se describe la expresión de la proteína vegt en embriones de *X. laevis*, *E. randi* y *E. machalilla*. Se pretende demostrar que el anticuerpo policlonal en contra de la región conservada entre las isoformas materna y zigótica de la proteína vegt (Sudou *et al.*, 2012) (Anexo 4 y 5) funciona en inmuno-detecciones en montaje entero. Sudou *et al.*, 2012 demostraron que el anticuerpo funciona en inmuno-blots y detecta la isoforma zigótica pero no demostraron si el anticuerpo funciona en inmunodetecciones en montaje entero en *X. laevis* (Sudou *et al.*, 2012). Además, se desea demostrar que el anticuerpo anti-vegt da reacción cruzada con los embriones de las especies de ranas analizadas en este trabajo, y así identificar al endodermo y endomesodermo presuntivo. Se estudiará si existen diferencias en el patrón de expresión de la proteína vegt entre ranas ecuatorianas de diferente tamaño de huevo y velocidad de desarrollo. La descripción del patrón de expresión de la proteína vegt en estadios tempranos (clivaje tardío, blástula y gástrula) de *X. laevis*, *E. randi* y *E. machalilla* se realizará dentro de un marco comparativo y aportará a un mejor conocimiento de las estrategias del desarrollo de ranas ecuatorianas. Se realizará la comparación con *X. laevis* debido a que esta rana es el organismo modelo del desarrollo temprano. Los análisis comparativos proveen importantes herramientas para obtener puntos de vista de la función génica durante el desarrollo temprano de las ranas.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. MANTENIMIENTO EN CAUTIVERIO Y OBTENCIÓN DE EMBRIONES

Para la elaboración de este trabajo se utilizaron embriones de *X. laevis*, *E. randi* y *E. machalilla*.

Los embriones de *X. laevis* fueron donados por el Dr. Masanori Taira (Universidad de Tokyo) y los embriones de *E. randi* por el Laboratorio de Herpetología de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador. La rana dendrobátida *E. machalilla* se mantiene en cautiverio en el laboratorio de biología del desarrollo de la PUCE. Estas ranas se mantienen en terrarios con tierra, plantas y agua. Además, los terrarios tienen recipientes de plástico para que las ranas los utilicen como sitios apropiados para depositar sus huevos. Estas ranas se las alimenta, en colaboración con todos los miembros del laboratorio, tres veces a la semana con moscas de la fruta y/o grillos pequeños (recién eclosionados). Los grillos fueron donados por el Departamento de Herpetología de la PUCE. Para verificar si había posturas de *E. machalilla*, los terrarios se revisaron periódicamente con la ayuda de los miembros del laboratorio. Los embriones fueron cultivados en cámaras húmedas y se los rotuló con la fecha, la hora a la que se encontró los embriones, el terrario al que pertenecen, y el número de embriones de cada postura.

Los sitios de colección de los individuos adultos de *E. randi* y *E. machalilla* se detallan a continuación. Los especímenes de *E. randi* fueron colectados en el bosque protector Puyango, Provincia de El Oro y en Cerro Blanco, provincia del Guayas. Los individuos de *E. machalilla* provienen de las localidades de Pedernales y Machalilla, ubicadas en la provincia de Manabí, en la costa ecuatoriana.

4.2. OBSERVACIÓN Y MANIPULACIÓN DE EMBRIONES

4.2.1. SOLUCIONES Y TAMPONES

4.2.1.1. SOLUCIÓN DE STEINBERG (Rugh, 1962)

- 58 mM NaCl
- 0.65 mM KCl
- 0.85 mM MgSO₄
- 5 mM Tris, pH 8
- 0.34 mM Ca (NO₃)₂
- Agua destilada

4.2.1.2. PBS (TAMPÓN FOSFATO SALINO)

- 1.5 mM KH₂PO₄
- 7 mM Na₂HPO₄
- 137.7 mM NaCl

4.2.1.3. FIJATIVO DE MEMFA

- 0.1 M MOPS pH 7.4
- 2 mM EDTA
- 1 mM MgSO₄
- Formaldehído 37%

4.2.1.4. SOLUCIÓN B DE SMITH

- 200ml de formalina (formaldehído 37%)
- 50 ml Ácido Acético
- 750 ml agua destilada

4.2.2. PROCESAMIENTO Y FIJACIÓN DE EMBRIONES

Los embriones obtenidos directamente desde la postura de la rana se los transfirió a cajas Petri donde fueron manipulados en la solución salina de Steinberg 1x (4.2.1.1.). Embriones de todos los estadios del desarrollo requeridos para el estudio se fijaron para su futura observación, manipulación y documentación. Previo a la fijación se retiró con pinzas de relojero las capas de gelatina. Los embriones sin gelatina fueron fijados por una hora y media en la solución de MEMFA (4.2.1.3). Luego de sacar la membrana vitelina. Embriones sin membrana vitelina se incubaron en dicho fijativo por una hora a temperatura ambiente. Finalmente los embriones fueron almacenados en metanol 100% a -20 °C en tubos Eppendorf con un número de registro, la fecha y hora de fijación, estadio, y cantidad de embriones fijados. Se utilizó estereomicroscopios WILD (Heerbrugg) e iluminación con lámparas de fibra óptica KL 1500 (Zeiss). Para posteriores observaciones los embriones se transfirieron a PBS (4.2.1.2.).

4.3. INMUNODETECCIÓN EN MONTAJE ENTERO

4.3.1. SOLUCIONES, TAMPONES Y ANTICUERPOS

4.3.1.1. TBS-Tr

- 10 mM Tris pH 8
- 140 mM NaCl
- 0.1% Triton-X

4.3.1.2. TBTM

- TBS-Tr
- 2 mg/ml de albúmina de suero bovino (BSA)
- 5 % de leche en polvo descremada

4.3.1.3. TAMPÓN DIG

- 100 mM TRIS/HCL, pH 9.5
- 100 mM NaCl
- 50 mM MgCl₂

4.3.1.4. SOLUCIÓN NBT

- 50 mg/ml NBT (Nitro Blue Tetrazolium)
- 70 % Dimetilformamida

4.3.1.5. SOLUCIÓN BCIP

- 50 mg/ml BCIP (bromochloroindolylphosphato)
- 100 % dimetilformamida

4.3.1.6. REACTIVO DE COLOR

- 33 μ l solución NBT
- 16.5 μ l solución BCIP
- 5 ml tampón DIG

4.3.1.7. TAMPÓN 4

- 10 mM Tris pH 8
- 1mM EDTA

4.3.1.8. ANTICUERPOS

4.3.1.8.1. ANTICUERPO PRIMARIO (ANTI-vegt)

- Anti-vegt: Anticuerpo policlonal desarrollado en conejo purificado por afinidad (Sudou *et al.*, 2012). Reconoce la secuencia conservada de la proteína vegt ubicada a lado de la región T-box hacia el extremo 3' en *X. laevis*. Este anticuerpo reconoce la secuencia comprendida entre 237 a 363 de la proteína vegt en esta rana (Número de Acceso NP_001081665) (Anexo 4 y 5). Este anticuerpo se probó en western blots. El reconocimiento positivo de la proteína vegt se observa en el anexo 6. El anticuerpo fue producido y donado por el

Departamento de Ciencias Biológicas de la Universidad de Tokio, en colaboración con el Dr. Masanori Taira (Sudou *et al.*, 2012).

4.3.1.8.2. ANTICUERPO SECUNDARIO

- Anti rabbit-IgG acoplado a la enzima fosfatasa alcalina. Anticuerpo provisto por Boehringer Mannheim GmbH (Mannheim, Alemania).

4.3.2. INMUNODETECCIÓN

Se utilizó el procedimiento para inmuno-detecciones establecido en el Laboratorio de Biología del Desarrollo de la PUCE. Este procedimiento se basó en el protocolo para inmunodetecciones de (Kispert y Herrmair, 1994) e incorpora modificaciones de acuerdo a (Kuratani y Horigome, 2000).

4.3.3. PERMEABILIZACIÓN DE LOS EMBRIONES

Para la detección de la proteína vegt se utilizaron embriones previamente fijados con la solución MEMFA (4.2.1.3.). Los embriones fueron transferidos e incubados 24 horas a 4 °C en tubos Eppendorf de 2 ml que contenían una solución 1:1 de Metanol y DMSO (Dimetil Sulfóxido). Finalizado el tiempo de incubación, se retiraron 3/4 partes de la solución DMSO/Metanol, se añadió 0.5 ml. de Tritón al 10 % y se incubó por 10 minutos. Tritón-X, es un detergente que permeabiliza las membranas y permite la entrada del anticuerpo a las células.

Luego, se reemplazó la solución anterior con TBS-Tr (4.3.1.1.) y se realizaron de 5 lavados de 10 minutos cada uno con esta solución.

4.3.4. BLOQUEO DE LA UNIÓN NO ESPECÍFICA

Para realizar el bloqueo de la unión no específica del anticuerpo se incubaron los embriones durante 15 minutos en TBTM (4.3.1.2.) a temperatura ambiente, y después con TBTM con 20% de suero de cabra durante una hora a temperatura ambiente.

4.3.5. INCUBACIÓN CON EL ANTICUERPO PRIMARIO

La solución TBTM + 20 % de suero de cabra fue reemplazada por una solución de TBTM (4.3.1.2.) + 10 % de suero de cabra + dilución (1:70) del anticuerpo primario (anti-vegt 4.3.1.8.1) y se incubó por aproximadamente 72 horas a 4 °C. Los anticuerpos se conservan disueltos en partes iguales (1:1) con glicerina, por lo tanto, se hicieron los cálculos para obtener la dilución 1:70.

4.3.6. LAVADOS DEL ANTICUERPO PRIMARIO

Finalizado el tiempo de incubación con el anticuerpo primario, se procedió a realizar 8 lavados con TBS-Tr (4.3.1.1.). El tiempo de cada lavado varía. Se realizaron cinco lavados de 5 minutos cada uno, dos lavados de 30 minutos cada uno a temperatura ambiente y un lavado por 24 horas a 4 °C.

4.3.7. INCUBACIÓN CON EL ANTICUERPO SECUNDARIO

Finalizado el último lavado se procedió a incubar en una solución de TBTM (4.3.1.2.) + 10 % de suero de cabra + dilución del anticuerpo secundario. La dilución utilizada fue de 1:700. El anticuerpo fue desarrollado en conejo (antiRabbit-IgG; 4.3.1.8.2.). Los embriones fueron incubados en la solución del anticuerpo secundario por 24 horas a 4 °C.

4.3.8. LAVADOS DEL ANTICUERPO SECUNDARIO

Finalizado el tiempo de incubación con el anticuerpo secundario se procedió a realizar lavados con TBS-Tr (4.3.1.1.). Se lavó cinco veces por un periodo de 5 minutos cada uno. Luego, se realizaron dos lavados de 30 minutos cada uno y un lavado de 24 horas a 4 °C.

4.3.9. REACCIÓN DE COLOR

Se realizaron 2 lavados de 10 minutos con TBS-Tr (4.3.1.1.). Después los embriones se transfirieron a pocillos con el tampón DIG (4.3.1.3.) y se realizaron dos lavados de 10 minutos cada uno. Luego, se realizaron 2 lavados más de 10 minutos cada uno con una solución de 5 mM de Levamisole (Boehringer-Mannheim) en tampón DIG (4.3.1.3.). Para finalizar, los embriones fueron transferidos a pocillos con el reactivo de color (4.3.1.6.). Éstos fueron incubados en la oscuridad, a temperatura ambiente, hasta obtener una reacción visible. Para detener la reacción los embriones fueron transferidos a pocillos con Tampón 4 (4.3.1.7.) y se realizaron varios lavados con esta solución.

4.3.10. POSTFIJADO

Luego de los lavados con Tampón 4, se procedió a re-fijar los embriones en solución B de Smith (4.2.1.4.) por 24 horas, a 4° C. Finalizado este periodo, se procedió realizar varios lavados con PBS 1X (4.2.1.2.) por varias ocasiones. Por último, los embriones fueron conservados en pocillos con glicerina a -20°C, hasta su posterior uso y análisis.

4.4. PROCESAMIENTO DE EMBRIONES INMUNOTEÑIDOS

4.4.1. DESPIGMENTACIÓN DE EMBRIONES

Los embriones de la rana dendrobátida *E. machalilla* poseen pigmento que dificulta la observación de la reacción positiva en embriones inmunoteñidos, por lo que fue necesario realizar la despigmentación de los mismos. Se colocó a los embriones en una solución de H₂O₂ al 30% y 70% de metanol en un frasco de vidrio. El frasco con los embriones se colocó sobre papel aluminio para aumentar la exposición a la luz solar. Los embriones se mantuvieron expuestos al sol por una hora aproximadamente.

4.4.2. ACLARAMIENTO DE EMBRIONES

Los embriones enteros, las bisecciones y secciones fueron aclarados en la solución Benzilbenzoato (alcohol benzílico en proporción 2:1, BB/BA). Esta solución permite que la yema se vea transparente ya que tiene el mismo índice de refracción que ésta. Las secciones

fueron primeramente lavadas en concentraciones graduales de metanol por 5 minutos en cada dilución hasta llegar a 100% metanol. Posteriormente, los embriones fueron transferidos a un porta objetos de depresión con la solución BB/BA y se observó su transparentación. Finalmente, se realizaron las respectivas fotografías bajo el microscopio.

4.4.3. BISECCIONES

Se realizaron bisecciones sagitales con bisturí para observar la expresión interna de la proteína vegt. Embriones en los estadios deseados, previamente inmunoteñidos y fijados en solución de MEMFA (4.2.1.3.), fueron incubados a 45 °C en una solución al 7 % de gelatina durante cuatro horas hasta que la gelatina se infiltre. Cada una de las mitades fue conservada en una mezcla 2:3 de formaldehído 10% y PBS 1X (4.2.1.2.) a 4° C hasta ser requeridas.

4.4.4. SECCIONES DE VIBRATOMO

Las bisecciones de los embriones inmunoteñidos se embebieron en una solución de agarosa al 6 % en PBS 1X (4.2.1.2.) hasta que esta se solidifique. Luego de la solidificación se cortó la porción de agarosa que contenía al embrión. Ésta fue adherida a una base para su posterior seccionamiento en el vibratomo. Las secciones, de 100 y 50 µm de grosor, fueron realizadas en un vibratomo marca Oxford con una cuchilla, a 25° de inclinación, amplitud de 6 y una velocidad de 2.5 (velocidad baja). El recipiente del vibratomo fue llenado con agua destilada hasta el borde superior para recoger las secciones depositadas en el agua con una espátula y un

palito con un pelo en su extremo. Las secciones fueron depositadas en pequeñas caja petri con solución 1X PBS (4.2.1.2.) a 4 °C hasta su estudio y fotografía.

4.4.5. TINCIÓN FLUORESCENTE PARA NÚCLEOS CON HOECHST 33258

Las secciones fueron teñidas con el tinte fluorescente Hoechst 33258 el cual se adhiere al ADN de los núcleos celulares. Para su observación se utilizó iluminación fluorescente con filtro ultravioleta. Las secciones fueron trasladadas a una caja de pocillos con un 1 ml de PBS 1x (4.2.1.2) en cada pocillo. Se realizaron dos lavados de 5 minutos con PBS 1x (4.2.1.2). Luego las secciones fueron incubadas en una dilución de 1µl de Hoechst 33258 en 1 ml de PBS 1x (4.2.1.2) durante 20 minutos. Posteriormente se realizaron 5 lavados de 10 minutos cada uno con PBS 1x (4.2.1.2). Finalmente las secciones fueron montadas en placas con glicerina y almacenadas a -20 °C.

4.4.6. ANÁLISIS Y FOTOGRAFÍA DE EMBRIONES ENTEROS, BISECCIONES Y SECCIONES

Embriones enteros, bisecciones y secciones fueron observados y fotografiados utilizando un estéreo-microscopio Carl Zeiss Stemi SV6 al cual se le adaptó una cámara digital Sony DSC F-707. Los embriones fueron fotografiados utilizando el estereomicroscopio Stemi SV6 y el microscopio AxioObserver. Z1 (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemania) con una cámara digital incorporada AxioCam y el programa de adquisición de imágenes Axiovision versión 4.6.3. de Carl Zeiss (Zeiss, Oberkochen, Alemania). Las fotos fueron editadas en el programa Adobe

Photoshop 7.0. Las barras en las fotos fueron calculadas automáticamente por el programa Axiovision de Carl Zeiss (Zeiss, Oberkochen, Alemania) de acuerdo a la calibración previa de cada lente utilizado.

5. RESULTADOS

Se detectó el patrón de expresión de la proteína vegt en el desarrollo temprano de las ranas *X. laevis*, *E. randi*, y *E. machalilla*. Para un mejor análisis de la distribución de la proteína vegt se añadió imágenes de embriones control (no inmunoteñidos), a lado de cada embrión inmunoteñido correspondiente al mismo estadio. Los embriones no inmunoteñidos muestran el pigmento propio de los embriones. Además, para la mejor visualización de la expresión de vegt se agregó esquemas a la izquierda de cada imagen según corresponda.

5.1. ESPECIFICIDAD DEL ANTICUERPO POLICLONAL ANTI-vegt

Embriones durante el desarrollo temprano (clivaje tardío – gástrula) fueron inmunoteñidos con anti-vegt para detectar la localización de esta proteína en los tejidos embrionarios. Después de realizar la inmunotinción en un embrión de *E. machalilla*, en el estadio de blástula tardía, se procedió a hacer secciones sagitales y la tinción para DNA con el tinte fluorescente Hoechst 33258. Se observó que los núcleos de las células de la zona marginal fueron positivos para vegt (Fig. 1A y B). La iluminación ultravioleta permitió detectar la fluorescencia nuclear, el pigmento púrpura de la inmuno-tinción produjo que los núcleos presenten un color oscuro debido al quenching sobre la fluorescencia de Hoechst 33258. En contraste, los núcleos de células que no contenían la proteína vegt presentaron una brillante fluorescencia azul (Fig. 1C). Este experimento demostró que el anticuerpo utilizado es específico para los núcleos celulares que contengan la proteína vegt.

5.2. EXPRESIÓN DE vegt EN EMBRIONES DE *X. laevis*

La detección y análisis de la proteína vegt se realizó exclusivamente en la gástrula de *X. laevis*, por cuanto no hubo disponibilidad de embriones en estadios de clivaje y blástula.

5.2.1. EXPRESIÓN DE vegt EN EL ESTADIO DE GÁSTRULA TEMPRANA DE *X. laevis* (ESTADIO 10.25)

En la gástrula temprana de *X. laevis* no se detectó la expresión de la proteína vegt en las células externas de la zona marginal, hemisferio animal ni vegetal. (Fig. 2A – C). Para determinar si la expresión de la proteína vegt se presentó en las células internas, se realizaron secciones sagitales a través del labio dorsal del blastoporo. No se detectó la expresión de la proteína vegt en las células internas (Fig. 3A y B).

5.3. EXPRESIÓN DE vegt EN EMBRIONES DE *E. randi*

5.3.1. EXPRESIÓN DE vegt EN EL ESTADIO DE 32 CÉLULAS DE *E. randi* (ESTADIO 6)

En embriones de *E. randi*, en su fase de clivaje tardío (estadio 6), se detectó la expresión de la proteína vegt en las células superficiales e internas (Figs. 4A – F; 5A – B). La expresión externa de vegt en la zona marginal, región animal y vegetal se esquematizaron (Fig. 4A – C). La expresión externa de la proteína vegt se localizó en una amplia zona marginal (Fig. 4D). En la

región animal no se observaron núcleos positivos para vegt (Fig. 4E). En los núcleos celulares de la región vegetal también se observó expresión de la proteína vegt (Fig. 4F). Se analizaron las vistas externas de las zonas: marginal, animal y vegetal de un embrión que no fue inmunoteñido (Fig. 4G – I) con el objeto de diferenciar la pigmentación propia del embrión con respecto al color morado oscuro de la inmunotinción. Se observó que la pigmentación propia del embrión es de color café y tenue, y se localiza en el hemisferio animal y parte de la zona marginal (Fig. 4G y H). En la región vegetal se observó que no hubo pigmentación (Fig. 4I). Esta comparación demuestra que la coloración de la inmuno-detección difiere significativamente del pigmento del embrión.

Se analizó y se diagramó la distribución interna de la expresión de la proteína vegt (Fig. 5A). Se observó que la proteína vegt se detectó en los núcleos celulares localizados en una amplia zona marginal y región vegetal (Fig. 5B).

5.3.2. EXPRESIÓN DE vegt EN EL ESTADIO DE BLÁSTULA DE *E. randi* (ESTADIO 8)

En *E. randi*, durante el estadio de blástula, se detectaron núcleos positivos para vegt en células externas e internas (Figs. 6A – C; 7A – D; 8A – D). La expresión externa de vegt en la zona marginal se esquematizó (Fig. 6A). La expresión externa de la proteína vegt se encontró distribuida en una amplia zona marginal (Fig. 6B y C). En las imágenes del embrión no inmunoteñido se observó que las células de la zona marginal son pigmentadas. (Fig. 6D y E). El pigmento propio del embrión difiere en su coloración café con respecto a los núcleos positivos para vegt que son de color morado. Se esquematizó la expresión de vegt en la región animal y

vegetal (Fig. 7A y B). En la vista del hemisferio animal no se detectó expresión de la proteína vegt (Fig. 7C). En la región vegetal se observó que la expresión de vegt se distribuyó en toda esta zona (Fig. 7D). En la vista animal del embrión no inmunoteñido se observó que hubo presencia de pigmento en toda esta región (Fig. 7E), mientras que en la región vegetal se observó que hubo poco pigmento (Fig. 7F). La coloración café del pigmento en estas regiones mostró la diferencia que éste tiene en relación al color morado de los núcleos positivos para vegt, lo que permitió un análisis más preciso del patrón de expresión de vegt.

Los cortes sagitales permitieron analizar la expresión interna de la proteína vegt. El esquema muestra la distribución de vegt en el interior del embrión (Fig. 8A). En la bisección sagital transparentada (Fig. 8B), sección sagital (Fig. 8C) y sección sagital transparentada (Fig. 8D) se observó que la expresión de vegt se localizó en las células internas de la zona marginal y región vegetal. En la vista interna de un embrión no inmunoteñido se observó que hay presencia de pigmento en las células internas (Fig. 8E y F). El pigmento alrededor de los núcleos en las células externas e internas tuvo coloración café clara, a diferencia de los núcleos positivos para vegt que fueron de color morado intenso. Los resultados mostraron que la expresión de vegt en esta rana mantuvo su localización en una amplia zona marginal y hemisferio vegetal, en relación a lo observado en la fase de clivaje tardío (estadio 6).

5.3.3. EXPRESIÓN DE vegt EN EL ESTADIO DE GÁSTRULA TEMPRANA DE *E. randi* (ESTADIO 10)

En la gástrula temprana (estadio 10) de *E. randi* no se detectó la expresión de la proteína vegt en los núcleos de las células externas de la zona marginal (Fig. 9A), región animal (Fig. 9B)

y vegetal (Fig. 9C). En el embrión no inmunoteñido se observó que hubo presencia de pigmento en las células externas. En la zona marginal el pigmento propio del embrión se localizó debajo el labio dorsal del blastoporo (Fig. 9D). En el hemisferio animal y vegetal se observaron células pigmentadas ampliamente distribuidas en estas regiones (Fig. 9E y F). Las células pigmentadas observadas en el embrión no inmunoteñido tiene similar localización y coloración que los núcleos oscuros observados en el embrión inmunoteñido para *vegt*. Por lo tanto, se asume que estos núcleos oscuros corresponden a pigmento.

Se realizaron cortes sagitales para determinar si la expresión de *vegt* se presenta en las células internas. En la bisección y sección sagital a través del labio dorsal del blastoporo permitió observar que no se detectó la expresión de *vegt* en las células internas (Fig. 10A y B). En el embrión no inmunoteñido se observó que hay presencia de pigmento en las células. El pigmento es de color café y se localiza en el hemisferio vegetal (Fig. 10C y D). La similar localización y forma del pigmento en las células permitió determinar que los núcleos oscuros presentes embrión inmunoteñido para *vegt* corresponden a pigmento. La coloración más intensa del pigmento en el embrión inmunoteñido se debe al reactivo de color al que fue sometido el embrión en el proceso de inmunotinción.

5.4. EXPRESIÓN DE vegt EN EMBRIONES DE *E. machalilla*

5.4.1. EXPRESIÓN DE vegt EN EL ESTADIO DE 32 CÉLULAS DE *E. machalilla* (ESTADIO 6)

En la fase de clivaje tardío (estadio 6), se solo se observó la expresión de la proteína vegt en las células internas. Se esquematizó la expresión de vegt observada en este estadio (Fig. 11A y B). La expresión de vegt en las células externa no pudo ser observada posiblemente por el gran tamaño y grosor de las células (Fig. 11C).

Se realizó una bisección sagital de dicho embrión para observar si la distribución de la proteína vegt se presenta en las células internas. Se encontró que los núcleos de las células más externas de la zona marginal tuvieron marcación positiva para la proteína vegt (Fig. 11D y E). No se detectó la proteína vegt en las células más internas de la zona marginal posiblemente porque el anticuerpo no penetró. En la región vegetal se observó que solo un núcleo fue positivo para vegt. No se observó expresión de la proteína vegt en las células internas del hemisferio animal (Fig. 11D y E). En la imagen del embrión control (no inmunoteñido) se observó que la región pigmentada se limita a las células que se localizan en el techo del embrión (Fig. 11F). En el embrión bisectado se observó que no hay pigmento en las células internas (Fig. 11G y H). El embrión no inmunoteñido permitió determinar que los núcleos oscuros observados en las imágenes 11D y E corresponden a núcleos positivos para vegt.

5.4.2. EXPRESIÓN DE *vegt* EN EL ESTADIO DE BLÁSTULA DE *E. machalilla* (ESTADIO 8)

La expresión de la proteína *vegt* en la blástula se detectó en las células superficiales e internas del embrión (Figs. 12A – C; 13A – C; 14A – C; 15A y B). El diagrama mostró la localización de la expresión de *vegt* en este estadio (Fig. 12A). La expresión externa de la proteína *vegt* se encontró distribuida principalmente en la zona marginal del embrión (Fig. 12B y C). En la zona marginal del embrión no inmunoteñido se observó que el pigmento propio del embrión se localiza en esta región (Fig. 12D y E). Para el análisis de la región animal se esquematizó la expresión de *vegt* (Fig. 13A). En la vista de la región animal no se detectó la proteína *vegt* (Fig. 13A y C). En el embrión sin inmunotinción se observó que el pigmento está ampliamente distribuido en esta región (Fig. 13D y E). En la región vegetal solo se observó pocos núcleos positivos para la proteína *vegt*, y que estos estuvieron localizados cerca al límite con la zona marginal. En la región más vegetal no se detectó la proteína *vegt* (Fig. 14A – C). El embrión no inmunoteñido se observó que hubo poco pigmento en la región vegetal (Fig. 14D y E). La gran diferencia entre el color del pigmento (café) y los núcleos positivos para *vegt* (morado) permitió establecer de manera adecuada el patrón de la expresión de *vegt* en este estadio.

Se realizaron cortes sagitales para determinar la expresión de la proteína *vegt* en las células internas. El diagrama mostró el patrón de expresión de *vegt* en el interior del embrión (Fig. 15A). En la sección sagital se observó que existe marcación positiva en los núcleos de las células internas. La expresión de *vegt* se distribuyó principalmente en la zona marginal (Fig. 15B). En la vista interna del embrión no inmunoteñido se observó que el pigmento se encuentra

principalmente en el hemisferio animal (Fig. 15C). La no presencia de pigmento en las células internas de la zona marginal permitió determinar que los núcleos morados observados en dicha región corresponden a núcleos positivos para vegt. Los resultados mostraron que la expresión de vegt en esta rana mantuvo su localización en la zona marginal, en relación a lo observado en la fase de clivaje tardío (estadio 6).

5.4.3. EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA vegt EN EL ESTADIO DE GÁSTRULA TEMPRANA DE *E. machalilla* (ESTADIO 10)

En la rana gástrula temprana de *E. machalilla* la proteína vegt no se detectó en ninguna región del embrión. El embrión inmunoteñido y despigmentado mostró que en las células externas de la zona marginal, región animal y vegetal no se detectó vegt (Fig. 16A – C). Para determinar si la expresión de vegt ocurre en las células internas se realizaron cortes sagitales. En la bisección y sección sagital no se detectaron núcleos positivos para la proteína vegt (Fig. 17A y B). En la bisección y sección sagital del embrión no inmunoteñido se observó la presencia de pigmento en las células internas localizadas en la zona marginal (Fig. 17C y D). La forma y coloración café del pigmento es similar a los núcleos oscuros observados en las células internas de la zona marginal del embrión inmunoteñido; por lo tanto, estos núcleos oscuros internos corresponden a pigmento.

6. DISCUSIÓN

El análisis de la proteína *vegt* se realizó en embriones tempranos de *X. laevis*, *E. randi* y *E. machalilla*. Los estadios considerados fueron clivaje tardío (estadio 6), blástula (estadio 8) y gástrula (estadios 10-12). Estas ranas se eligieron porque presentan variación en su tamaño de huevo y velocidad de desarrollo. De acuerdo al diámetro del huevo y al tiempo que estas ranas se demoran en finalizar la gastrulación a partir de la fecundación del huevo se ha clasificado a *X. laevis* y *E. randi* como ranas de huevos pequeños y desarrollo rápido y a *E. machalilla* como rana de huevos grandes y desarrollo lento (Anexo 7) (del Pino *et al.*, 2007).

6.1. EL ANTICUERPO UTILIZADO EN CONTRA DE LA PROTEÍNA *vegt* RECONOCE LA ISOFORMA MATERNA DE *vegt*

6.1.1. EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA *vegt* EN EL CLIVAJE TARDÍO Y BLÁSTULA DE LAS ESPECIES ANALIZADAS

El anticuerpo en contra de la proteína *vegt* dio reacción cruzada en los estadios de clivaje tardío y blástula de *E. randi* y *E. machalilla*. En *X. laevis* no se realizó la inmuno-detección en estos estadios por la no disponibilidad de embriones. Sin embargo, si fue posible comparar la expresión de la proteína *vegt* de estos estadios de *X. laevis* de acuerdo a la inmuno-detección de otros autores (Stennard *et al.*, 1999).

En el clivaje tardío de *X. laevis* se observó que la proteína *vegt* se encuentra en el hemisferio vegetal (Anexo 8A) (Stennard *et al.*, 1999). La localización vegetal de la proteína

vegt en *X. laevis* coincide con la localización vegetal detectada en *E. randi*. En contraste, en embriones en estadio de clivaje tardío de *E. machalilla*, la expresión de vegt se localizó en la zona marginal.

En el estadio de blástula de *X. laevis* se encontró que la proteína vegt se distribuye en la zona marginal y una parte de la región vegetal ya que se excluye de las células más vegetales del embrión (Anexo 8B) (Stennard *et al.*, 1999). La localización de la proteína vegt en las blástulas de *X. laevis*, y *E. machalilla* son similares. El área libre de vegt de la región vegetal de *E. machalilla* es posiblemente mayor a la observada en *X. laevis*. En la blástula de *E. randi*, no se detectó que exista un área libre de vegt en la región vegetal.

La variabilidad de la expresión de vegt en la región vegetal entre las especies analizadas podría estar asociada al tamaño del huevo. Se ha observado que en *Eleutherodactylus coqui*, cuyo tamaño de huevo es considerado grande (3.5 mm), la actividad inductora del mesodermo se restringe a la periferia de la zona marginal; por lo tanto, la región de endodermo que carece de capacidad inductora ocupa gran parte de la región vegetal, esta región solamente representa una reserva de nutrientes para el embrión y ha sido denominada como endodermo nutritivo (Anexo 9) (revisado por Elinson y del Pino, 2012). Se desconoce si hay endodermo nutritivo en otras especies de ranas. En la blástula de *X. tropicalis* se determinó que la proteína vegt localizada desde el polo vegetal participa en la actividad inductora para el proceso de formación del mesodermo (Anexo 2) (Fukuda *et al.*, 2010). Se desconoce la actividad inductora del mesodermo en las ranas en estudio. En estas ranas, el área de la región vegetal donde no se detectó la proteína vegt podría corresponder al endodermo nutritivo. La correlación encontrada fue que entre mayor tamaño de huevo, mayor área de posible endodermo nutritivo. Por lo tanto, de

acuerdo al patrón de expresión de *vegt* y al tamaño de huevo se propone que la blástula de *E. machalilla* tendría mayor cantidad de endodermo nutritivo que *X. laevis* y *E. randi*.

La diferencia encontrada en el patrón de expresión de la proteína *vegt* en la región vegetal entre *X. laevis*, *E. randi* y *E. machalilla* también podría estar relacionada a la velocidad de desarrollo. Si la región vegetal sin detección de *vegt* corresponde a endodermo nutritivo, se podría proponer que los embriones de las ranas de desarrollo rápido no necesitan gran cantidad de yema para alimentarse durante su desarrollo porque su periodo embrionario es corto. En contraste, los embriones de las ranas de desarrollo lento si necesitarían mayor cantidad de yema para alimentarse porque pasan más tiempo en fase embrionaria.

Sin embargo, para sustentar la hipótesis de que la región vegetal sin expresión de *vegt* carece de actividad inductora de mesodermo y corresponde a endodermo nutritivo se requiere realizar estudios sobre la localización de la actividad inductora de mesodermo en *E. randi* y *E. machalilla*. Además, se necesitan realizar más análisis sobre el patrón de expresión de *vegt* en otras ranas que presenten divergencia en sus modos de reproducción para determinar si realmente el tamaño del huevo y la velocidad de desarrollo influyen en la distribución de *vegt* en el embrión.

En las ranas analizadas la expresión de la proteína *vegt* en el estadio de clivaje tardío y blástula sugiere que *vegt* se localiza en el endodermo y endomesodermo presuntivo. Además, se sugiere que en el clivaje tardío y blástula de *E. randi* y *E. machalilla* el endodermo y endomesodermo presuntivo se encuentran en el hemisferio vegetal y zona marginal respectivamente, similar a lo descrito para *X.laevis* (Stennard *et al.*, 1999).

6.1.2. EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA *vegt* DURANTE LA GASTRULACIÓN EN LAS ESPECIES ANALIZADAS

En la gástrula de *X. laevis*, el mRNA y proteína de la isoforma zigótica del gen *vegt* se encuentra distribuida en las células que forman el endodermo y mesodermo presuntivo (Anexo 8C y D) (Fukuda *et al.*, 2010; Stennard *et al.*, 1999). Los resultados de este trabajo no permitieron determinar la localización de la isoforma zigótica de *vegt* durante la gastrulación de las ranas estudiadas. Sobre la base de los resultados, se sugiere que el anticuerpo (anti-*vegt*) no reconoce a la isoforma zigótica y solamente reconoce a la isoforma materna.

Se esperaba que anti-*vegt* reconozca también la isoforma zigótica, ya que el anticuerpo fue producido en contra de la secuencia conservada de las isoformas materna y zigótica de la proteína *vegt* de *X. laevis*. (Anexo 4 y 5) (Sudou *et al.*, 2012). La diferencia entre las dos isoformas se encuentra en el dominio N-terminal resultante del splicing alternativo de la terminación 5' del único gen *vegt* (Anexo 3) (Fukuda *et al.*, 2010).

La falta de detección de la isoforma zigótica de la proteína *vegt* por parte del anticuerpo anti-*vegt* en la gástrula puede deberse al enmascaramiento del antígeno. Se conoce que durante la fijación de los tejidos con fijativos que contienen formaldehído se pueden formar puentes de metileno que enmascaran al antígeno (Abcam, 2012). Es posible también que existan diferencias en la estructura tridimensional de la isoforma zigótica, *zvegt*, o que la isoforma zigótica forme complejos con otros polipéptidos y de esta manera se enmascaren los sitios antigénicos. Para detectar la isoforma zigótica de la proteína *vegt* se propone realizar experimentos que permitan desnaturalizar la proteína y eliminar potenciales moléculas que puedan enmascarar los sitios antigénicos.

6.2. IMPORTANCIA DE LA EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA *vegt* EN ESTUDIOS COMPARATIVOS

En este trabajo se detectó la expresión de la proteína *vegt* con el objetivo de conocer si su patrón de expresión es equivalente en ranas ecuatorianas de diferente tamaño de huevo y velocidad de desarrollo, y compararla con *X. laevis*. En relación a su parentesco filogenético se esperaba encontrar que en las ranas *E. randi* y *E. machalilla* la localización de la expresión de la proteína *vegt* sea similar ya que pertenecen a un clado de ranas más avanzadas (Neobatrachia). La rana *X. laevis*, al pertenecer a un clado más basal (Mesobatrachia), debería presentar diferencia en el patrón de expresión de *vegt* porque mostraría la condición más ancestral de la proteína (Frost *et al.*, 2006). Sin embargo, los resultados mostraron que en *X. laevis*, *E. randi* y *E. machalilla* *vegt* se encontró distribuida en la zona marginal y en diferente proporción en la región vegetal del clivaje tardío y blástula. Este trabajo muestra la gran variabilidad que existe en el desarrollo temprano entre especies de ranas, y que están asociadas a los modos de reproducción. Además, este trabajo contribuye al conocimiento de la expresión de proteínas maternas que participan en el desarrollo embrionario temprano de *E. randi* y *E. machalilla*.

7. LITERATURA CITADA

Abcam. 2012. Protocols book. [an Online reference].
<http://www.abcam.com/index.html?pageconfig=popular_protocols> [Consulta: 29 Octubre, 2012].

Beckham, Y. M., Nath, K. y Elinson, R. P. 2003. Localization of RNAs in oocytes of *Eleutherodactylus coqui*, a direct developing frog, differs from *Xenopus laevis*. *Evolution and Development* 5 (6): 562–571.

Benitez, M.S. y del Pino, M.E. 2002. Expression of Brachyury during development of the dendrobatid frog *Colostethus machalilla*. *Developmental Dynamics* 225: 592–596.

Browder, L. e Iten, L. 1998. *Xenopus* as a Model System in Developmental Biology. [an Online reference]. (March 4, 1998) Dynamic development.
<<http://www.acs.ucalgary.ca/~browder/frogsrus.html>> [Consulta: 5 Marzo, 2012].

Coloma, L.A. 1995. Ecuadorian frogs of the genus *Colostethus* (Anura: Dendrobatidae). University of Kansas Natural History Museum Miscellaneous Publication: 1-72.

Coloma, L.A. y Ron, S.R. 2010. *Engystomops randi*. En: IUCN 2011. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2011.2. <www.iucnredlist.org>. Downloaded on 21 September 2012.

Coloma, L.A., S.R. y Jungfer, K-H. 2004. *Gastrotheca riobambae*. En: IUCN 2011. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2011.2. <www.iucnredlist.org>. Downloaded on 27 September 2012.

del Pino, E. M. 1996. The expression of *Brachyury* (T) during gastrulation in the marsupial frog *Gastrotheca riobambae*. *Developmental Biology* 177: 64-72.

del Pino, E.M, Avila, M.-E., Pérez, O. D., Benitez, M.-S., Alarcón, I., Noboa, V., y Moya, I. M. 2004. Development of the dendrobatid frog *Colostethus machalilla*. *The International Journal of Developmental Biology* 48: 663-70.

del Pino, E.M., Venegas-Ferrín, M., Romero-Carvajal, A., Montenegro-Larrea, P., Sáenz-Ponce, N., Moya, I.M., Alarcón, I., Sudou, N., Yamamoto, S. y Taira, M. 2007. A comparative analysis of frog early development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104: 11882–11888.

Duellman, W.E. y Trueb, L. 1986. *Biology of amphibians*. Mc-Graw-Hill Book Co. New York, USA.

Elinson, R. P. y del Pino, E. M. 2012. Developmental diversity of amphibians. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology* 1: 345–369.

Frost, D. R., Grant, T., Faivovich, N., Bain, R. H., Haas, A., Haddad, F. B., O. De Sá, R.; Channing, A., Wilkinson, M., Donnellan, S., Raxworthy, C., Campbell, J., Blotto, B., Moler, P., Drewes, R., Nussbaum, R., Lynch, J., Green, D. y Wheeler, W. 2006. The amphibian tree of life. 297-370.

Fukuda, M., Takahashi, S., Haramoto, Y., Onuma, Y., Kim, Y.-J., Yeo, C.-Y., Ishiura, S. y Asashima, M. 2010. Zygotic *VegT* is required for *Xenopus* paraxial mesoderm formation and is regulated by Nodal signaling and Eomesodermin. The International Journal of Developmental Biology 54: 81-92.

Ghaskadbi, S. 1996. Mesoderm induction in amphibians and chick. Journal of biosciences, 21: 353-368.

Gilbert, S. 2003. Developmental Biology. Séptima Edición. Sinauer Associates, Inc. U.S.A.

Gurdon, J. B. 1987. Embryonic induction - molecular prospects. Development 306: 285-306.

Heasman, J. 2006. Patterning the early *Xenopus* embryo. Development 133: 1205-1217.

Howard, M.L. y Davidson, E. H. 2004. cis-Regulatory control circuits in development. Developmental Biology 271: 109-118.

Jordan, J.D., Landau, E. M. y Lyengar, R. 2000. Signaling networks: the origins of cellular multitasking. *Cell* 103: 193-200.

Kispert, A. y Herrmann, B. G. 1994. Immunohistochemical analysis of the Brachyury protein in wild type and mutant mouse embryos. *Developmental Biology* 161: 179-193.

Kloc, M., Dallaire, P., Reunov, A. y Major, F. 2011. Structural messenger RNA contains cytokeratin polymerization and depolymerization signals. *Cell Tissue Res.* 346 (2): 209-222

Kofron, M., Demel, T., Xanthos, J., Lohr, J., Sun, B., Sive, H., Osada, S., Wright, C., Wylie, C. y Heasman, J. 1999. Mesoderm induction in *Xenopus* is a zygotic event regulated by maternal VegT via TGFbeta growth factors. *Development* 126 (24): 5759–5770.

Kuratani, S. y Horigome, N. 2000. Developmental morphology of branchiomic nerves in a cat shark *Scyliorhinus torazame* with special referent to rhombomeres, cephalic mesoderm and distribution patterns of cephalic crest cells. *Zoological Science* 17: 893-909.

Ninomiya, H., Zhang, Q. y Elinson, R. P. 2001. Mesoderm formation in *Eleutherodactylus coqui*: body patterning in a frog with a large egg. *Developmental Biology* 236: 109–123.

Nieuwkoop, P. y Faber, J. 1994. Normal table of *Xenopus laevis* (Daudin). Garland Publishing, New York.

Papin, J. A., Hunter, T., Palsson, B. O. y Subramanian, S. 2005. Reconstruction of cellular signalling networks and analysis of their properties. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 6: 99-111.

Pérez, O. 2008. El factor de transcripción “VegT” en el desarrollo temprano de las ranas ecuatorianas *Gastrotheca riobambae* y *Epipedobates machalilla*. Tesis de Doctorado, Pontificia Universidad Católica del Ecuador.

Pérez, O., Benítez, M.-S., Nath, K., Heasman, J., del Pino, E. M. y Elinson, R. P. 2007. Comparative analysis of *Xenopus VegT*, the meso-endodermal determinant, identifies an unusual conserved sequence. *Differentiation* 75: 559-65.

Prado, J. 2011. Análisis espacial del ARN mensajero *Vegt* en oocitos de *Gastrotheca riobambae* y otras especies de anuros. Tesis de Licenciatura, Pontificia Universidad Católica del Ecuador.

Romero-Carvajal, A., Sáenz-Ponce, N., Venegas-Ferrín, M., Almeida-Reinoso, D., Lee, C., Bond, J., Ryan, M. J., Wallingford, J.B. y del Pino, E.M. 2009. Embryogenesis and laboratory maintenance of the foam-nesting túngara frogs, genus *Engystomops* (= *Physalaemus*). *Developmental Dynamics* 238: 1444-1454.

Sáenz-Ponce, N., Santillana-Ortiz, J.D. y del Pino, E. M. 2012. The gastrocoel roof plate in embryos of different frogs. *Differentiation* 83: S62-S66.

Showell, C., Binder, O. y Conlon, F. L. 2004. T-box genes in early embryogenesis. *Developmental Dynamics* 229: 201-18.

Smith, J. C. 1989. Mesoderm induction and mesoderm-inducing factors in early amphibian development. *Development* 677: 665-677.

Stennard, F., Zorn, M., Ryan, K., Garrett, N. y Gurdon, J. B. 1999. Differential expression of VegT and Antipodean protein isoforms in *Xenopus*. *Mechanisms of Development* 86: 87-98.

Sudou, N., Yamamoto, S., Ogino, H. y Taira, M. 2012. Dynamic in vivo binding of transcription factors to cis-regulatory modules of *cer* and *gsc* in the stepwise formation of the Spemann-Mangold organizer. *Development* 139: 1651–1661.

Venegas-Ferrín, M., Sudou, N., Taira, M. y del Pino, E. M. 2010. Comparison of Lim1 expression in embryos of frogs with different modes of reproduction. *The International Journal of Developmental Biology* 54: 195-202.

Wilson, V. y Conlon, F. L. 2002. The T-box family. *Genome Biology* 3: 6.

Wolpert, L., Jessel, T., Lawrence, P., Meyerowitz, E., Robertson, E. y Smith, J. 2007. *Principles of Development*. 3- edición. Oxford University Press, USA.

Xanthos, J. B., Kofron, M., Wylie, C. y Heasman, J. 2001. Maternal *VegT* is the initiator of a molecular network specifying endoderm in *Xenopus laevis*. *Development* 128: 167-80.

Yasuo, H. y Lemaire, P. 2001. Generation of the germ layers along the animal-vegetal axis in *Xenopus laevis*. *International Journal of Developmental* 235: 229-235.

Zhang, J., Houston, D. W., King, M. L., Payne, C., Wylie, C. y Heasman, J. 1998. The role of maternal *VegT* in establishing the primary germ layers in *Xenopus* embryos. *Cell* 94: 515-24.

Zhang, J. y King, M. L. 1996. *Xenopus VegT* RNA is localized to the vegetal cortex during oogenesis and encodes a novel T-box transcription factor involved in mesodermal patterning. *Development* 122 (12): 4119–4129.

8. FIGURAS

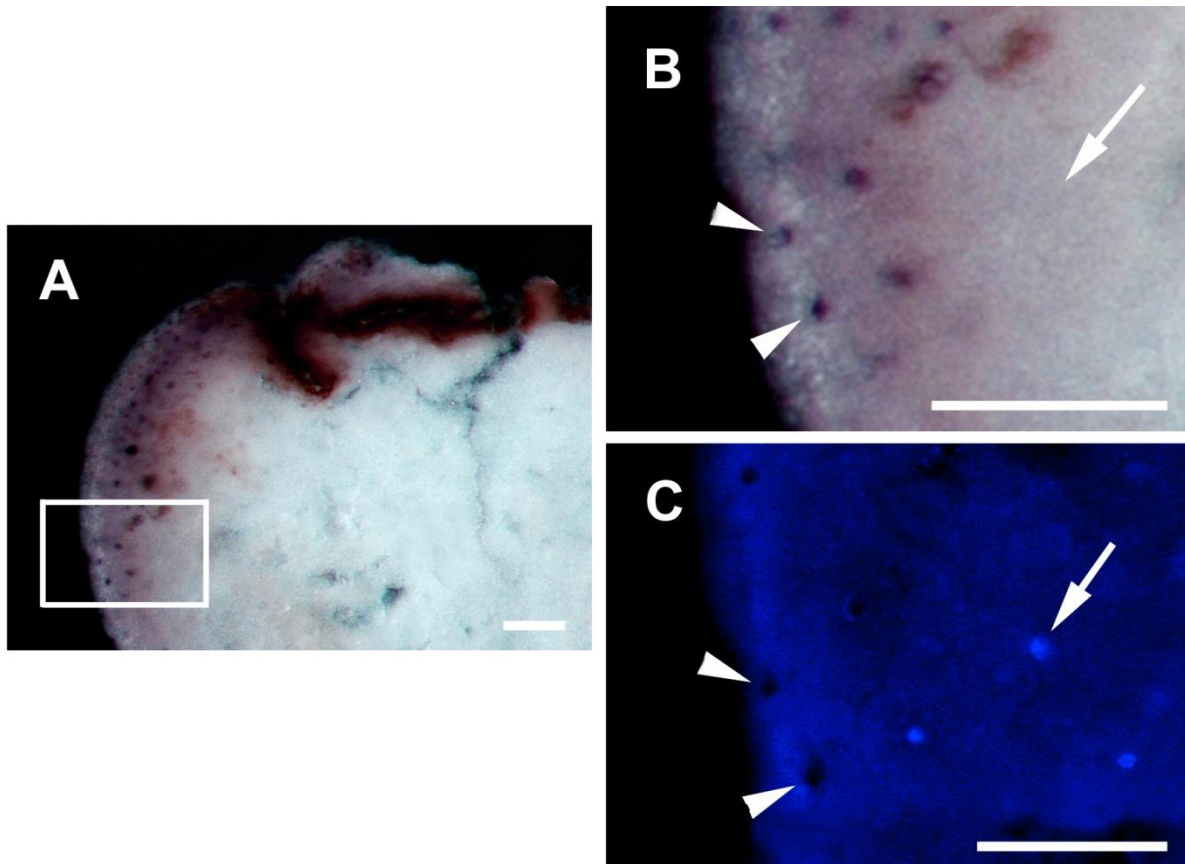


Figura 1. Especificidad del anticuerpo anti-vegt. En esta y en todas las figuras las imágenes se encuentran orientadas con el polo animal hacia arriba, y el labio dorsal del blastoporo a la derecha en las imágenes que corresponda. Todas las imágenes en esta figura pertenecen a un mismo embrión de la rana *E. machalilla* en el estadio de blástula tardía. (A) Borde de una sección sagital de un embrión inmunoteñido. Se observa núcleos positivos de la proteína de vegt en las células de la zona marginal. (B) Magnificación de las células inmunoteñidas con anti-vegt observadas en A. (C) Tinción fluorescente para núcleos con Hoechst 33258 de la imagen mostrada en B. Se observa quenching de fluorescencia en los núcleos positivos de vegt. En B y C las dos puntas de flecha muestran núcleos positivos para vegt y la flecha muestra un núcleo negativo para vegt. Las barras corresponden a 100 μm en A y B y a 50 μm en C.

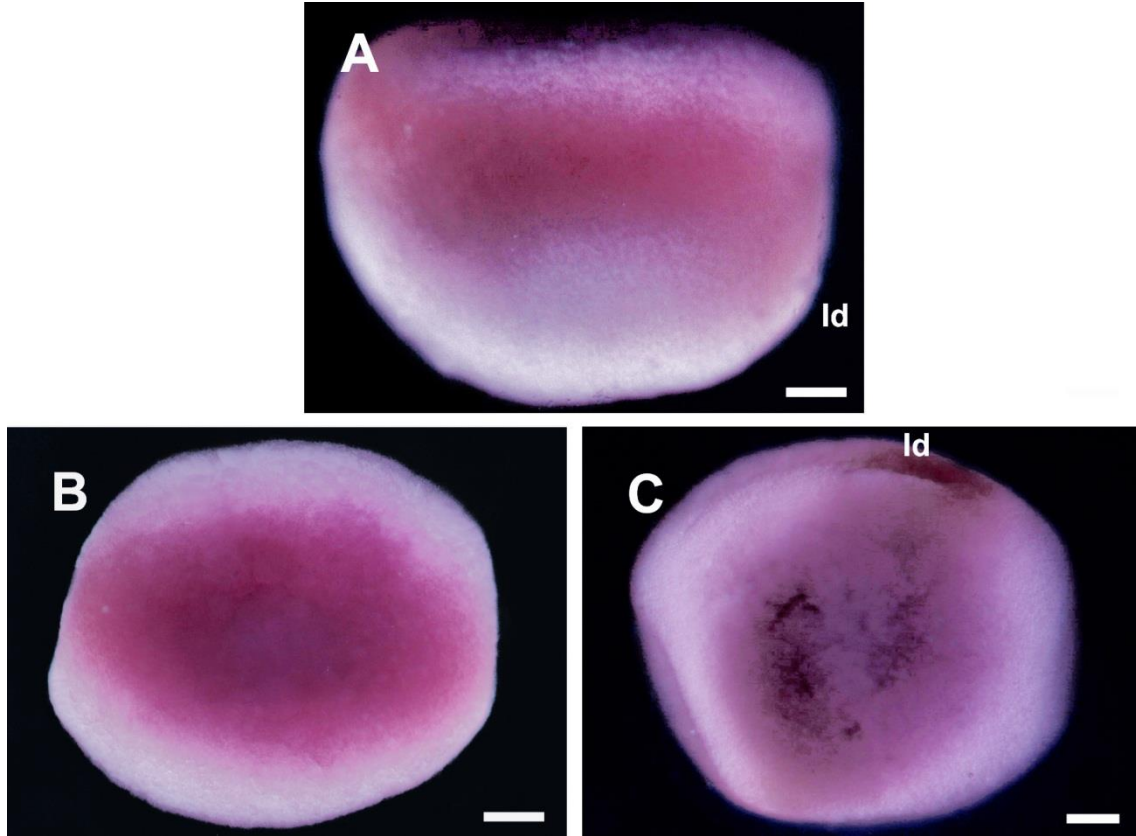


Figura 2. Expresión en montaje entero de la proteína vegt en el estadio de gástrula temprana de *X. laevis*, (estadio 10.25). Las imágenes corresponden a un embrión albino inmunoteñido para vegt. (A) Vista lateral. (B) Vista del hemisferio animal. (C) Vista de la región vegetal. En todas las imágenes no se observa marcación de núcleos positivos para la proteína vegt. Las barras corresponden a 200 μm en todas las imágenes. Abreviaturas: ld, labio dorsal del blastoporo.

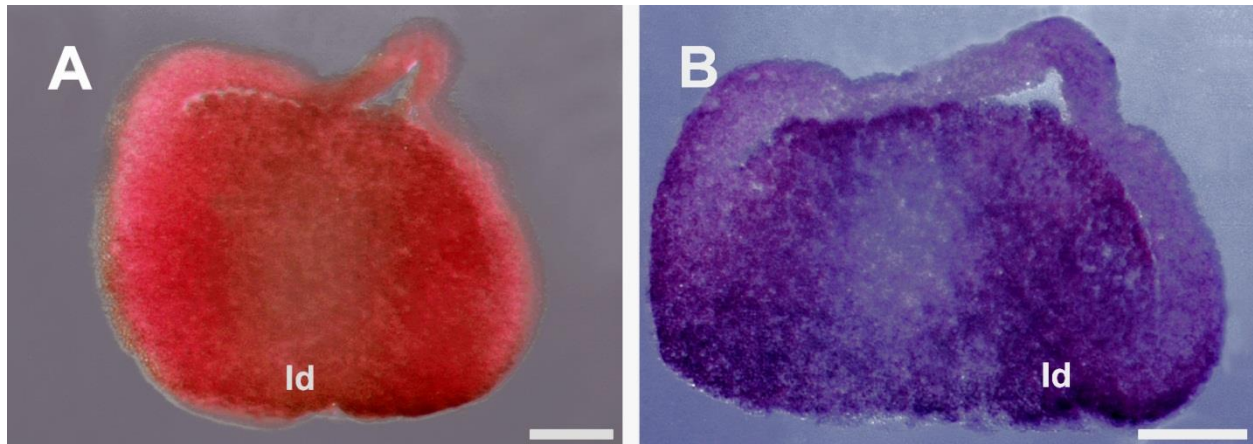


Figura 3. Expresión interna de la proteína vegt en el estadio de gástrula temprana de *X. laevis* (estadio 10.25). (A) y (B) Secciones sagitales de embriones inmunoteñidos. Las imágenes son de diferentes embriones. No se observa expresión interna de la proteína vegt. Las barras corresponde a 200 μ m. Abreviaturas: ld, labio dorsal del blastoporo.

Figura 4

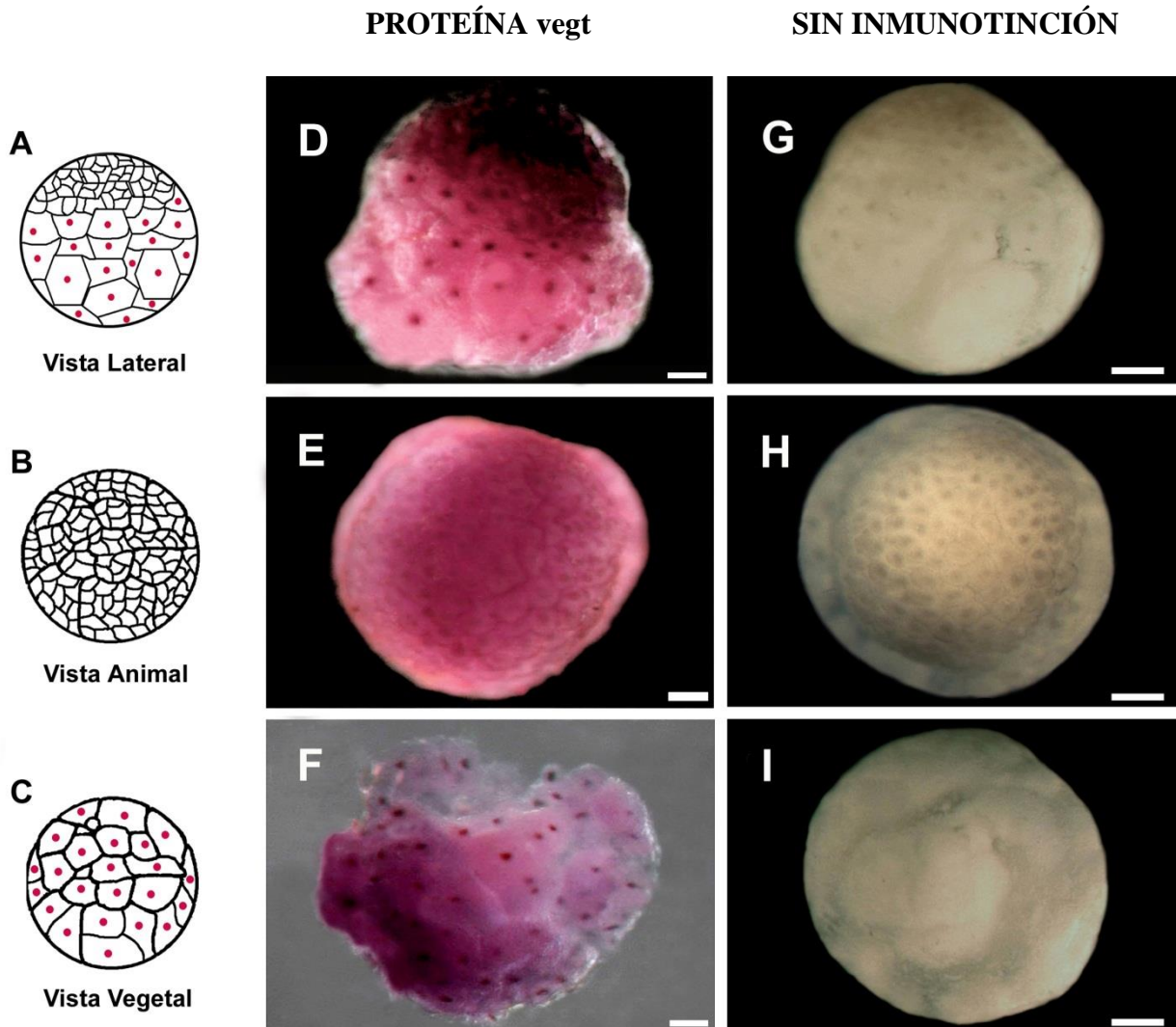


Figura 4. Expresión en montaje entero de la proteína vegt en el estadio de 32 células de *E. randi* (estadio 6). Diagramas A, B y C muestran el esquema de la expresión de vegt. Las imágenes de la columna izquierda (D, E y F) son de un embrión inmunoteñido para vegt. (D) Vista lateral. Se observa expresión de vegt distribuida en una amplia zona marginal. (E) Vista de la región animal. No se observa expresión de vegt. (F) Vista del polo vegetal. Se observa células con núcleos positivos distribuidas por toda esta región. Las imágenes de la columna derecha (G, H y I) son controles del mismo embrión de las imágenes inmunoteñidas. Las fotografías fueron tomadas antes de realizar la inmuno-detección. (G) Vista lateral. Se observa pigmento en la zona marginal. (H) Vista de la región animal. Se muestra la presencia de células con pigmentado. (I) Vista de la región vegetal. No se observa pigmento en esta región. Las barras corresponden a 100 μm en D, E y F y a 200 μm en G, H y I.

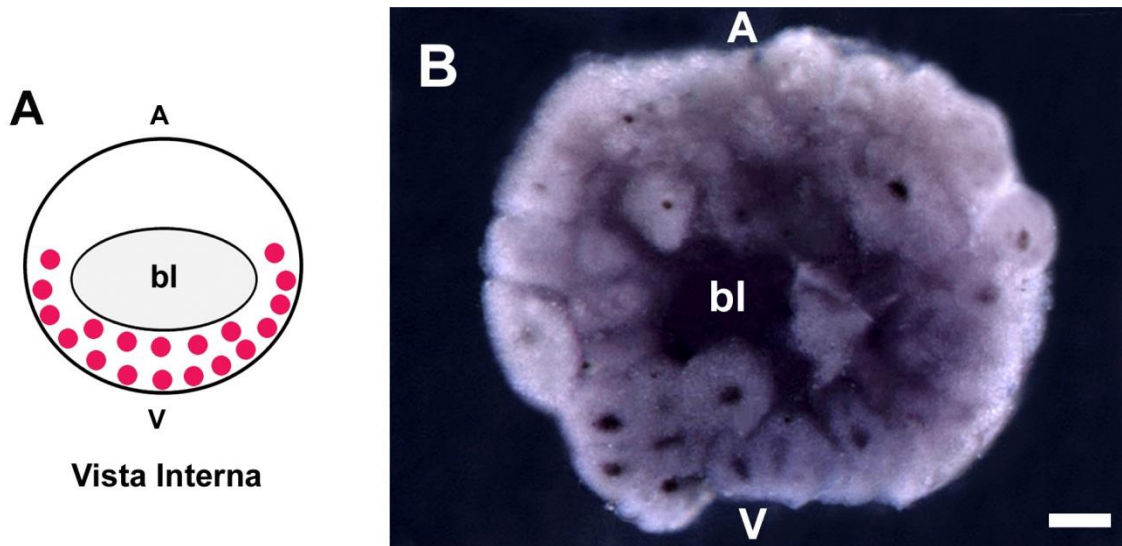


Figura 5. Expresión interna de la proteína vegt en el estadio de 32 células de *E. randi* (estadio 6). Diagrama A muestra el esquema de la expresión de vegt. (B) Bisección sagital del mismo embrión inmunoteñido de la figura 4. Se observa expresión interna de vegt principalmente en las células del hemisferio vegetal y algunas células de la zona marginal. La barra corresponde a 100 μ m. Abreviaturas: bl, blastocele; A, animal; V, vegetal.

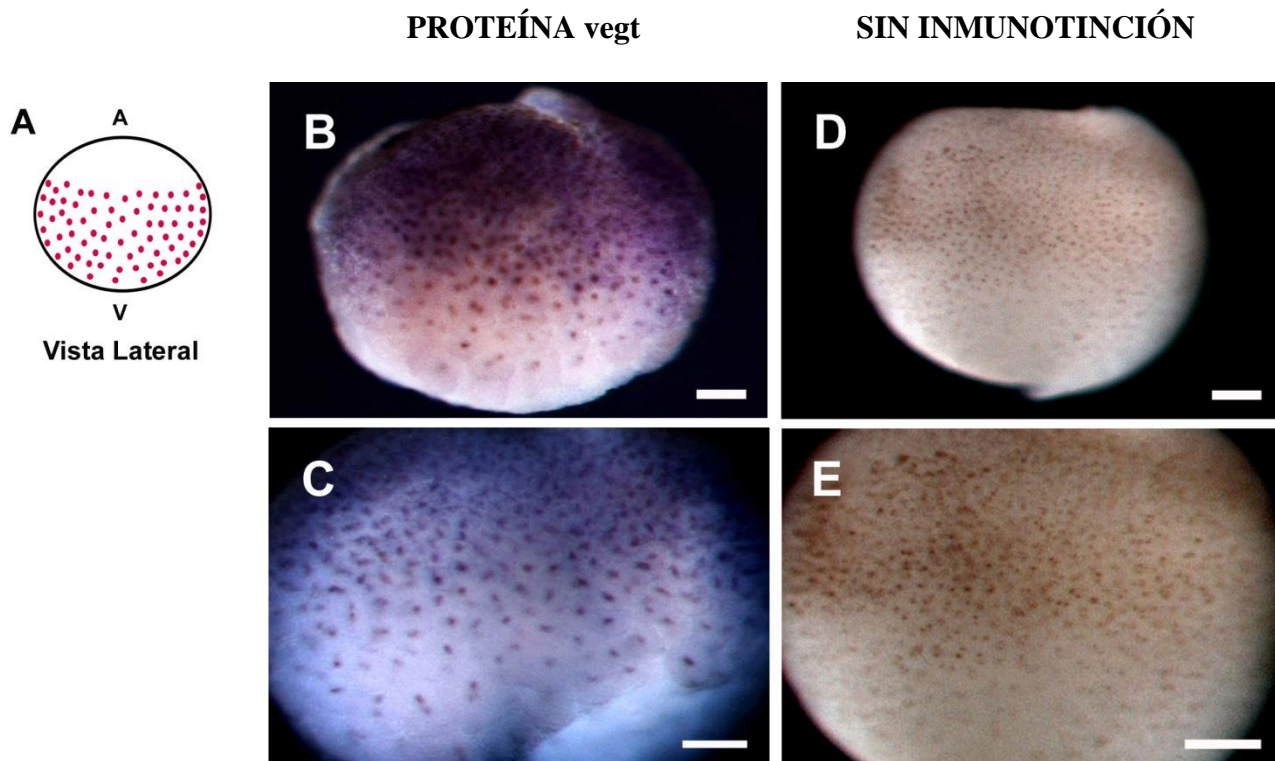


Figura 6. Expresión en montaje entero de la proteína vegt en el estadio de blástula de *E. randi* (estadio 8). Diagrama A muestra el esquema de la expresión de vegt. Las imágenes de la columna izquierda (B y C) pertenecen a un embrión inmunoteñido para vegt. (B) Vista lateral. Se muestra marcación positiva de vegt en una amplia zona marginal. (C) Vista lateral transparentada del mismo embrión que B. Las imágenes de la columna derecha (D y E) corresponden a un embrión que no fue inmunoteñido. (D) Vista lateral que muestra presencia de pigmento en la zona marginal. (E) Magnificación de la zona marginal de la imagen D. Las barras corresponden a 100 μm en todas las imágenes. Abreviaturas: A, animal; V, vegetal.

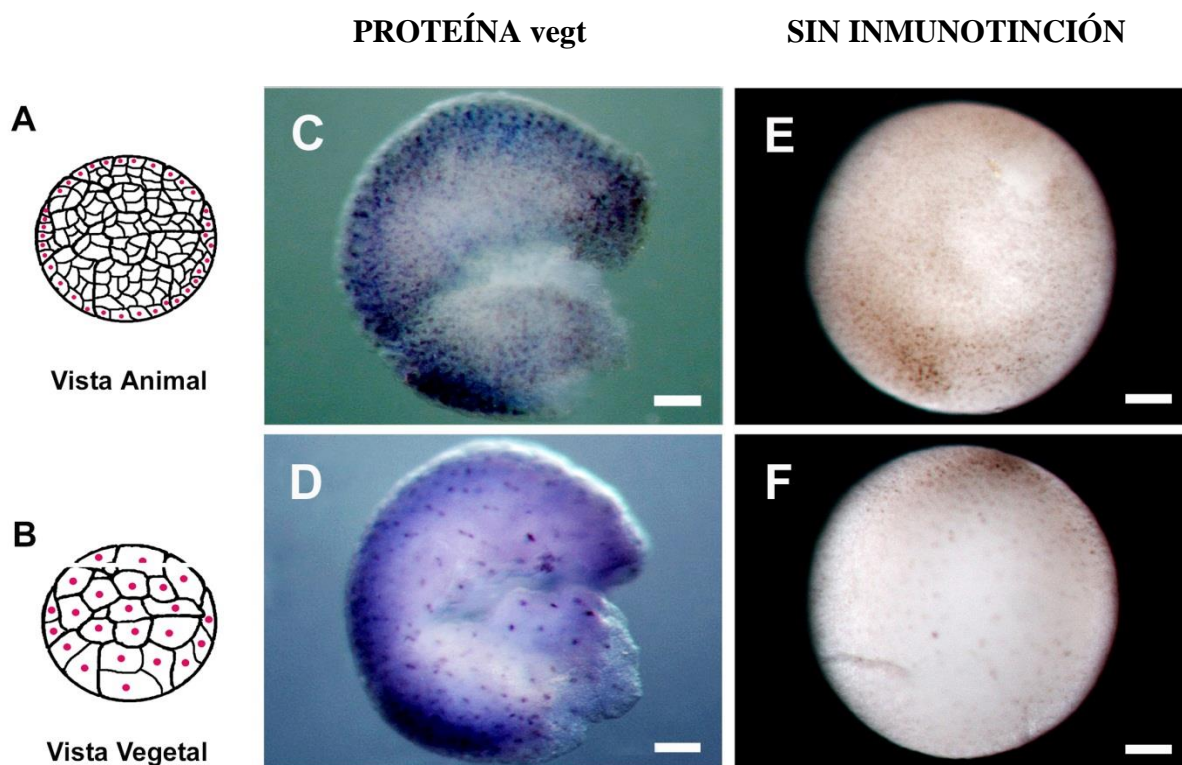


Figura 7. Expresión de la proteína vegt en la región animal y vegetal del estadio de blástula de *E. randi* (estadio 8). Diagramas A y B muestran el esquema de la expresión de vegt. Las imágenes de la columna izquierda (C y D) son de un embrión inmunoteñido para vegt. (C) Vista de la región animal transparentada. Se observa células con núcleos positivos para vegt en el límite con la zona marginal. (D) Vista del hemisferio vegetal transparentado. Se observa que las células con marcación positiva para vegt se encuentran distribuidas por toda esta región. Las imágenes de la columna derecha (E y F) corresponden al mismo embrión no inmunoteñido de la figura 6. (E) Vista de la región animal. Se observa células pigmentadas. (F) Vista de la región vegetal. Se observa pocas células pigmentadas. Las barras corresponden a 100 μ m en todas las imágenes.

Figura 8

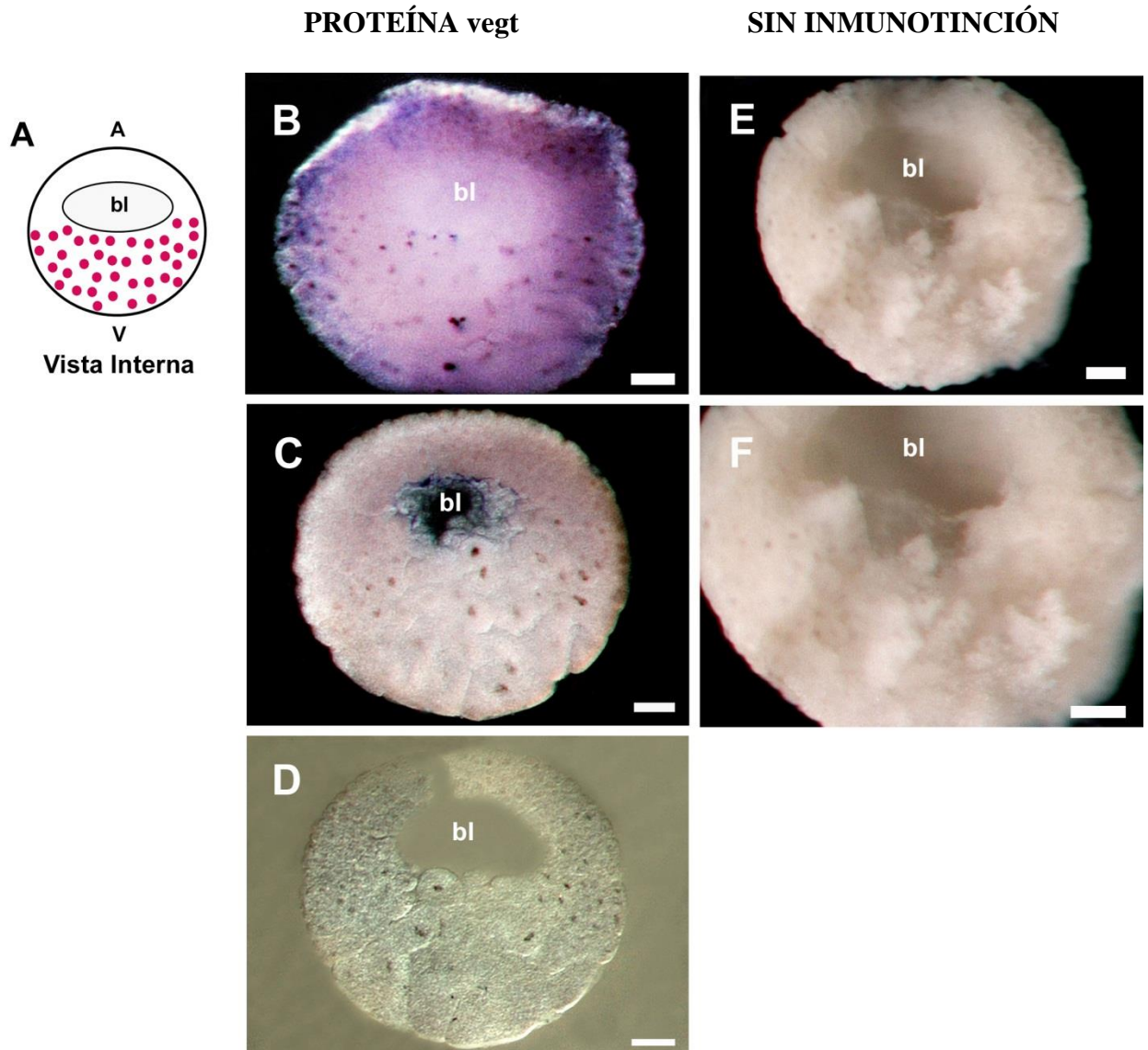


Figura 8. Expresión interna de la proteína vegt del estadio de blástula de *E. randi* (estadio 8). Diagrama A muestra el esquema de la expresión de vegt. Las imágenes de la columna izquierda (B, C y D) son de embriones inmunoteñidos para vegt. (B) Bisección sagital. (C) Sección sagital. (D) Sección sagital transparentada. En las tres imágenes se observa la expresión interna de vegt en el hemisferio vegetal. Las imágenes de la columna derecha (E y F) son de un embrión control que no fue inmunoteñido. (E) Bisección sagital. (F) Magnificación de E. En las dos imágenes se observa tenue pigmento alrededor de los núcleos de las células internas ubicadas en el hemisferio vegetal y animal. Las barras corresponden a 100 μm en todas las imágenes. Abreviaturas: bl, blastocele; A, polo animal; V, polo vegetal.

Figura 9

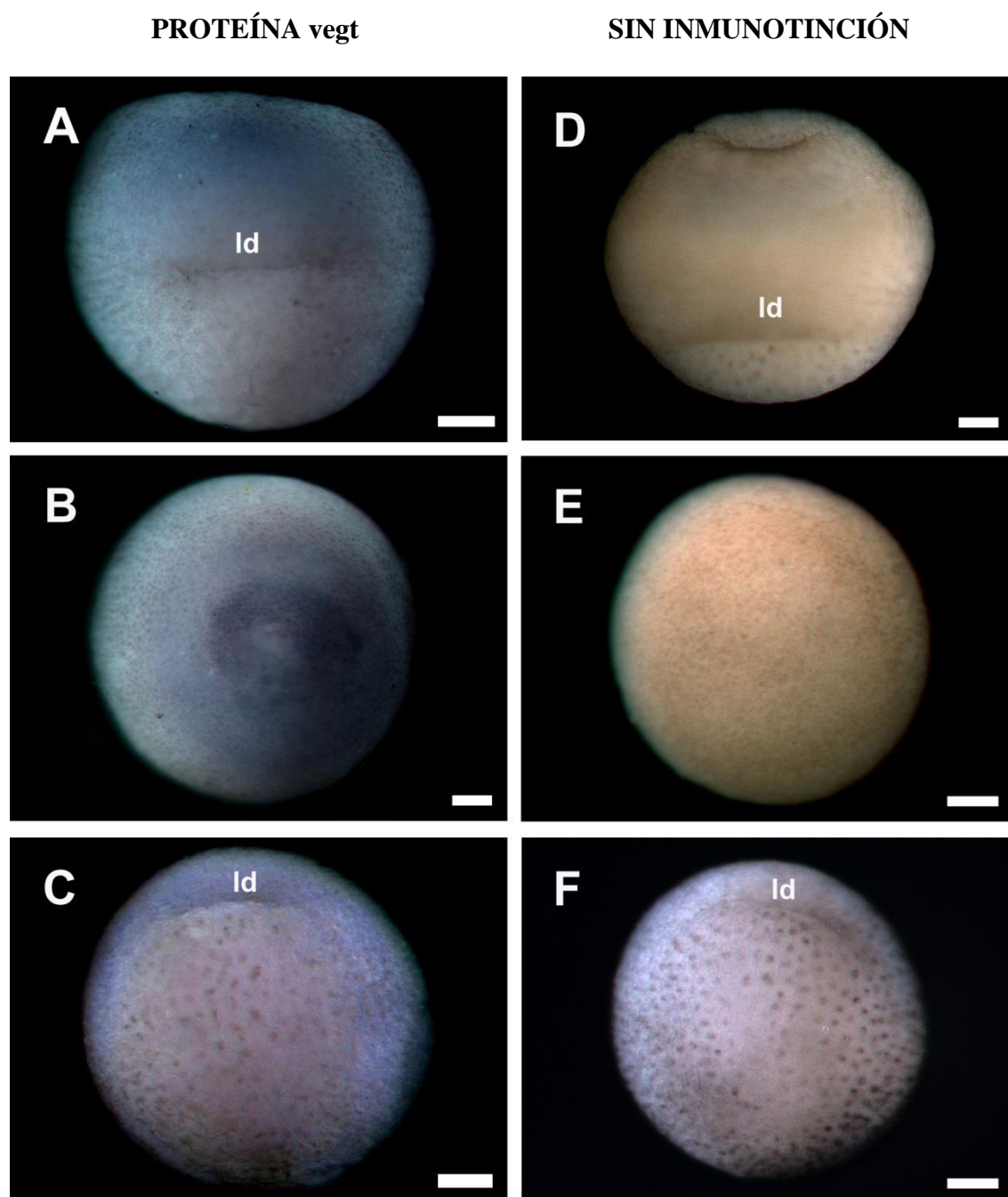


Figura 9. Expresión en montaje entero de la proteína vegt en el estadio de gástrula temprana de *E. randi* (estadio 10). Las imágenes de la columna izquierda (A, B y C) son de un embrión inmunoteñido para vegt. (A) Vista lateral. (B) Vista del hemisferio animal. (C) Vista del hemisferio vegetal. En A, B y C no se observa marcación de núcleos positivos para vegt. En las tres imágenes los núcleos celulares oscuros corresponden a pigmento. Las imágenes de la columna derecha (D, E y F) son de un embrión control que no fue inmunoteñido. (D) Vista lateral. Se observa presencia de pigmento en el lado más vegetal, bajo el labio del blastoporo. (E) Vista del hemisferio animal. Se observa pigmento distribuido en toda esta región. (F) Vista de la región vegetal. Se observa presencia de células pigmentadas. Las barras corresponden a 200 μm en todas las imágenes. Abreviaturas: ld, labio dorsal del blastoporo.

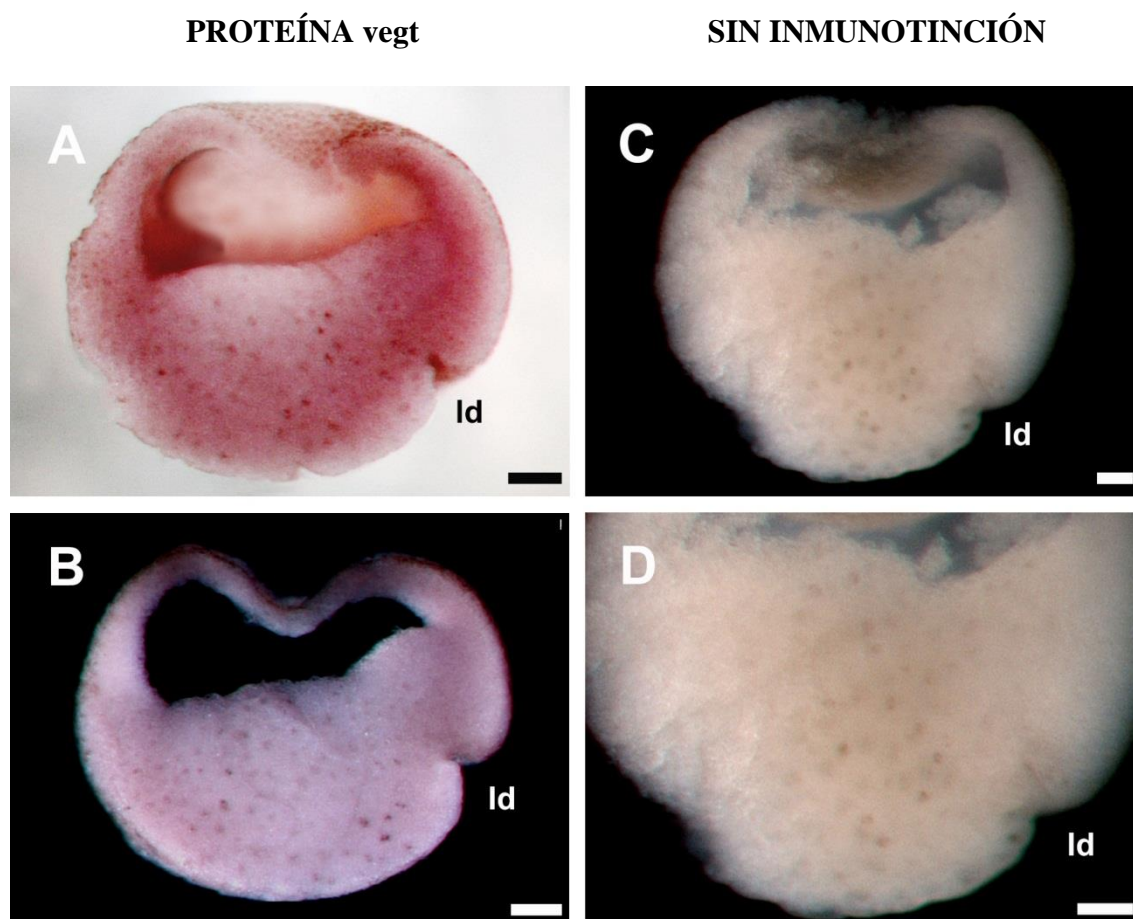


Figura 10. Expresión interna de la proteína vegt en el estadio de gástrula temprana de *E. randi* (estadio 10). Las imágenes de la columna izquierda (A y B) son de un embrión inmunoteñido para vegt. (A) Bisección sagital. No se observa células internas con marcación positiva para vegt. (B) Sección sagital. En A y B los núcleos celulares oscuros corresponden a pigmento. Las imágenes de la columna derecha (C y D) son de un embrión control que no fue inmunoteñido. (C) Bisección sagital. (D) Magnificación de C. En ambas imágenes se observa células internas pigmentadas. Las barras corresponden a 100 μ m en todas las imágenes. Abreviaturas: ld, labio dorsal del blastoporo.

Figura 11

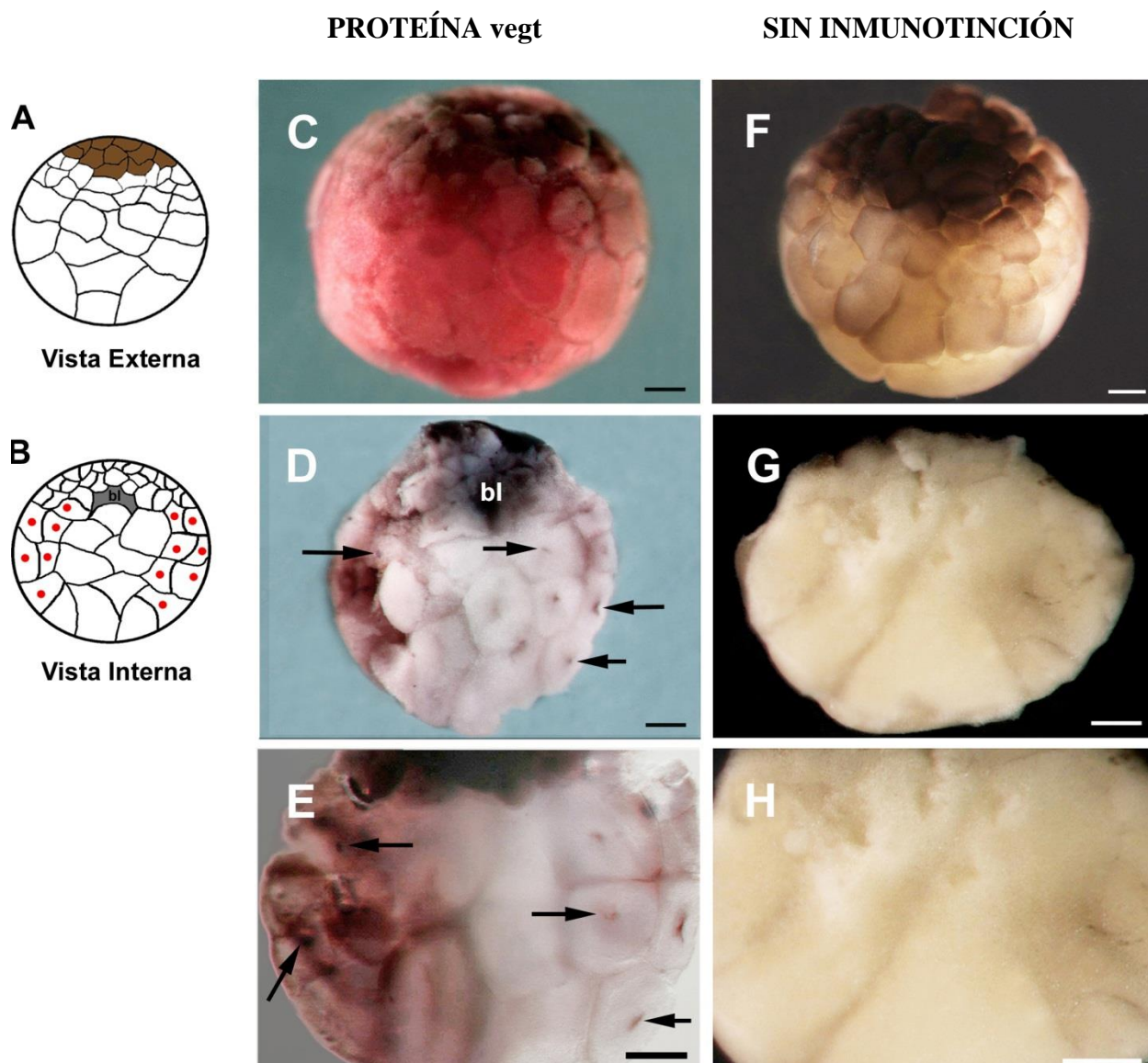


Figura 11. Expresión de la proteína vegt en el estadio de 32 células de *E. machalilla* (estadio 6). Diagrama A muestra las células pigmentadas coloreadas de café en la región animal. Diagrama B muestra el esquema de la expresión interna de la proteína de vegt y el pequeño blastocele. Las imágenes de la columna izquierda (C, D y E) corresponden a un mismo embrión inmunoteñido para vegt. (C) Vista lateral. No se observa núcleos positivos para vegt. Se muestra una zona pequeña de pigmento en la región animal. (D) Bisección sagital. (E) Magnificación de la zona marginal de la bisección sagital mostrada en D. En esta imagen el embrión fue transparentado. Se observa presencia de células marcadas positivamente para vegt en las células más externas de la zona marginal. También se observa un núcleo positivo en la región vegetal. En D y E cada flecha indica la localización de un núcleo positivo para vegt. Las imágenes de la columna derecha (F, G y H) son de un embrión control que no fue inmunoteñido. (F) Vista lateral de un embrión ligeramente menos avanzado que C. Se observa células con pigmento en la región animal. (G) Bisección sagital. No se observa pigmento alrededor de los núcleos celulares internos del embrión. (H) Magnificación de la zona marginal de G. La imagen permite confirmar la no presencia pigmento. Las barras corresponden a 200 μm en todas las imágenes. Abreviaturas: bl, blastocele.

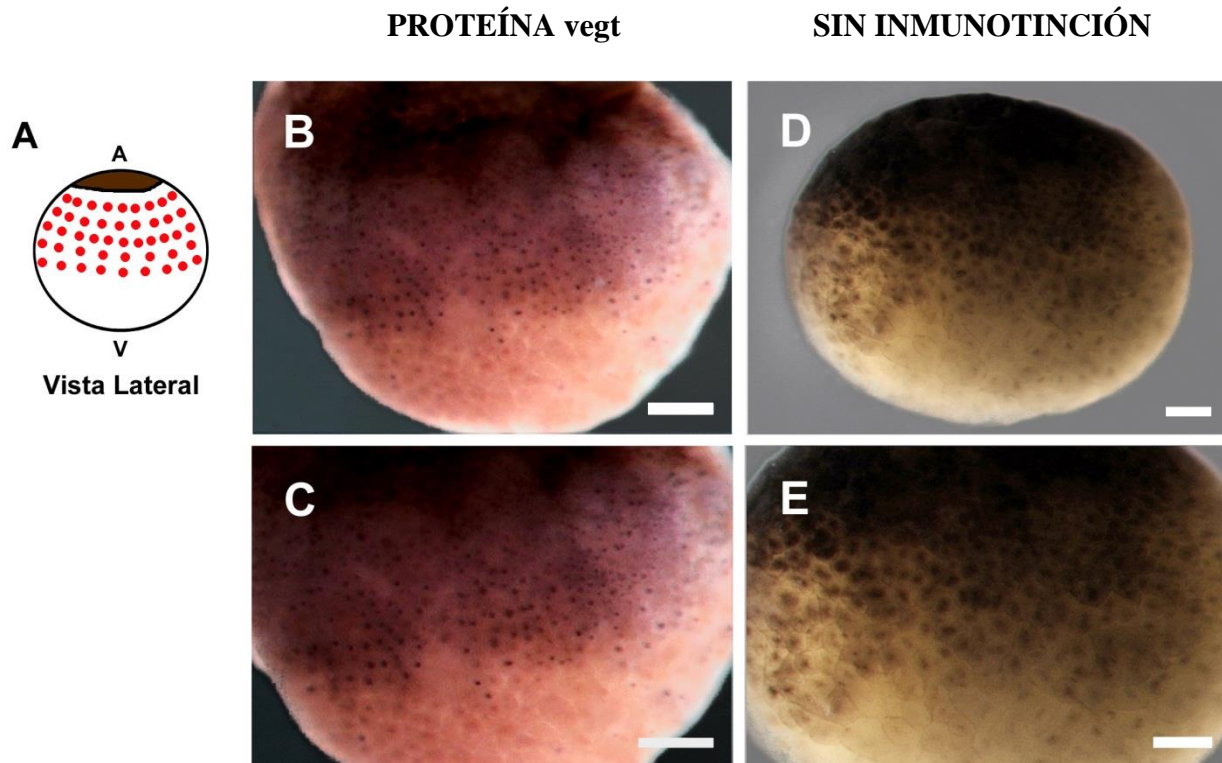


Figura 12. Expresión en montaje entero de la proteína vegt en el estadio de blástula de *E. machalilla* (estadio 8). Diagrama A muestra el esquema de la expresión de vegt. Las imágenes de la columna izquierda (B y C) pertenecen a un embrión inmunoteñido para vegt. (B) Vista lateral de un embrión que fue despigmentado. (C) Magnificación de la zona marginal de B. La expresión de vegt se observa en la zona marginal del embrión. Las imágenes de la columna derecha (D y E) corresponden a un embrión control que no fue inmunoteñido. (D) Vista lateral. (E) Magnificación de la zona marginal de D. Se observa presencia de células pigmentadas en la zona marginal. Las barras corresponden a 200 μ m en todas las imágenes. Abreviaturas: A, polo animal; V, polo vegetal.

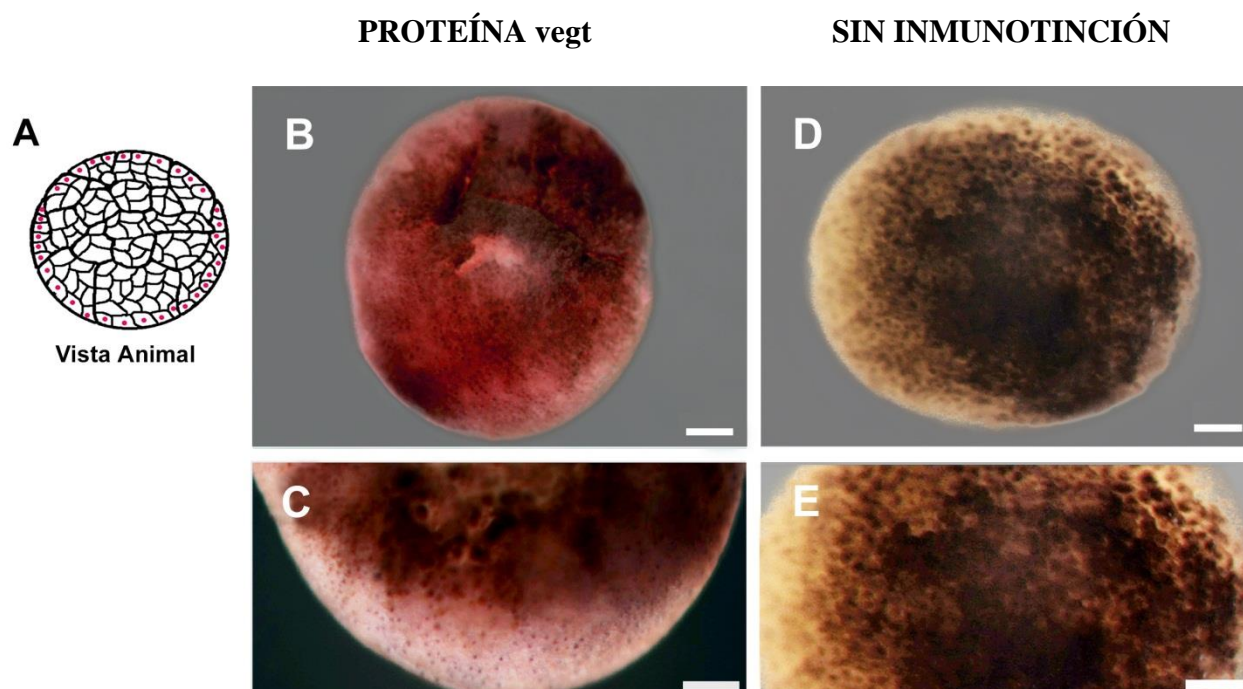


Figura 13. Expresión de la proteína *vegt* en la región animal del estadio de blástula de *E. machalilla* (estadio 8). Diagrama A muestra el esquema de la expresión de *vegt*. Las imágenes de la columna izquierda (B y C) son de embriones inmunoteñidos para *vegt*. (B) Vista de la región animal de un embrión que fue despigmentado. (C) Magnificación de la región animal del mismo embrión de la figura 12B. Se observa que la expresión de *vegt* no llega hasta la región animal. Las imágenes de la columna derecha (D y E) corresponden al mismo embrión no inmunoteñido de la figura 12. (D) Vista del hemisferio animal. (E) Magnificación de D. Se muestra presencia de pigmento en toda esta región del embrión. Las barras corresponden a 200 μm en todas las imágenes.

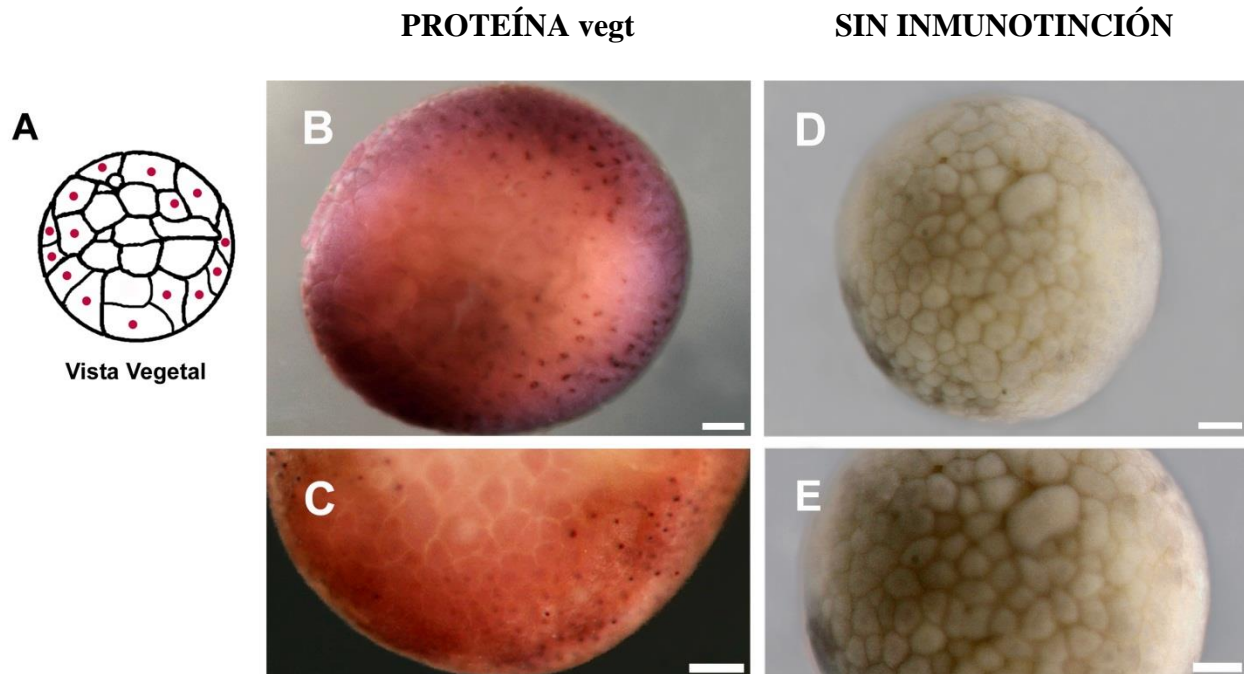


Figura 14. Expresión de la proteína vegt en la región vegetal del estadio de blástula de *E. machalilla* (estadio 8). Diagrama A muestra el esquema de la expresión de vegt. Las imágenes de la columna izquierda (B y C) son de embriones inmunoteñidos para vegt. (B) Vista del hemisferio vegetal de un embrión que fue despigmentado. (C) Magnificación de la región vegetal del mismo embrión de la figura 12B. Se observa que solo pocos núcleos positivos, cercanos hacia la zona marginal, se presentan en esta región. Las imágenes de la columna derecha (D y E) son del mismo embrión no inmunoteñido de la figura 12. (D) Vista del hemisferio vegetal. (E) Magnificación de D. Se observa poca presencia de pigmento en esta región. Las barras corresponden a 200 μm en todas las imágenes.

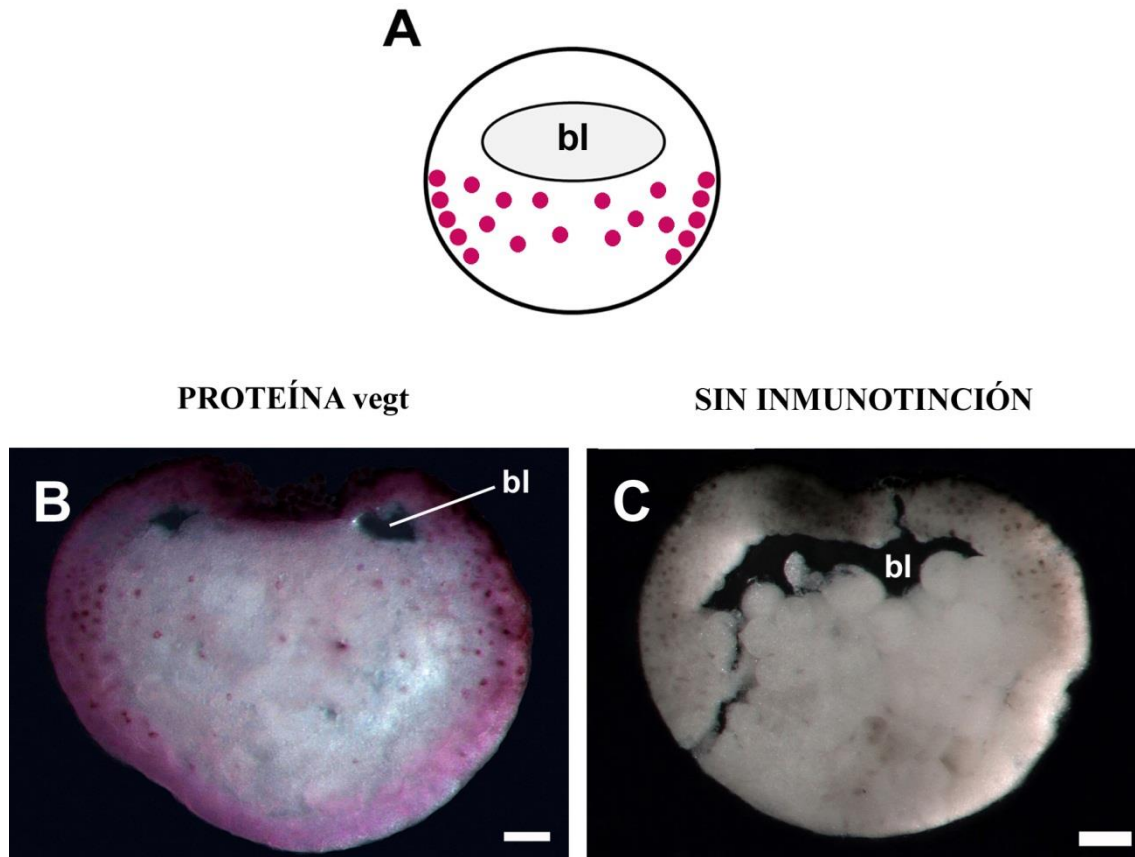


Figura 15. Expresión interna de la proteína vegt en el estadio de blástula de *E. machalilla* (estadio 8). Diagrama A muestra el esquema de la expresión de vegt. (B) Sección sagital de un embrión inmunoteñido. Se observa marcación positiva en las células internas de la zona marginal y pocas en la región vegetal. (C) Sección sagital de un embrión no inmunoteñido. Se observa que el pigmento se localiza en las células del hemisferio animal. No se observa pigmento en las células de la zona marginal. Las barras corresponden a 200 μm en B y a 100 μm en C. Abreviaturas: bl, blastocele.

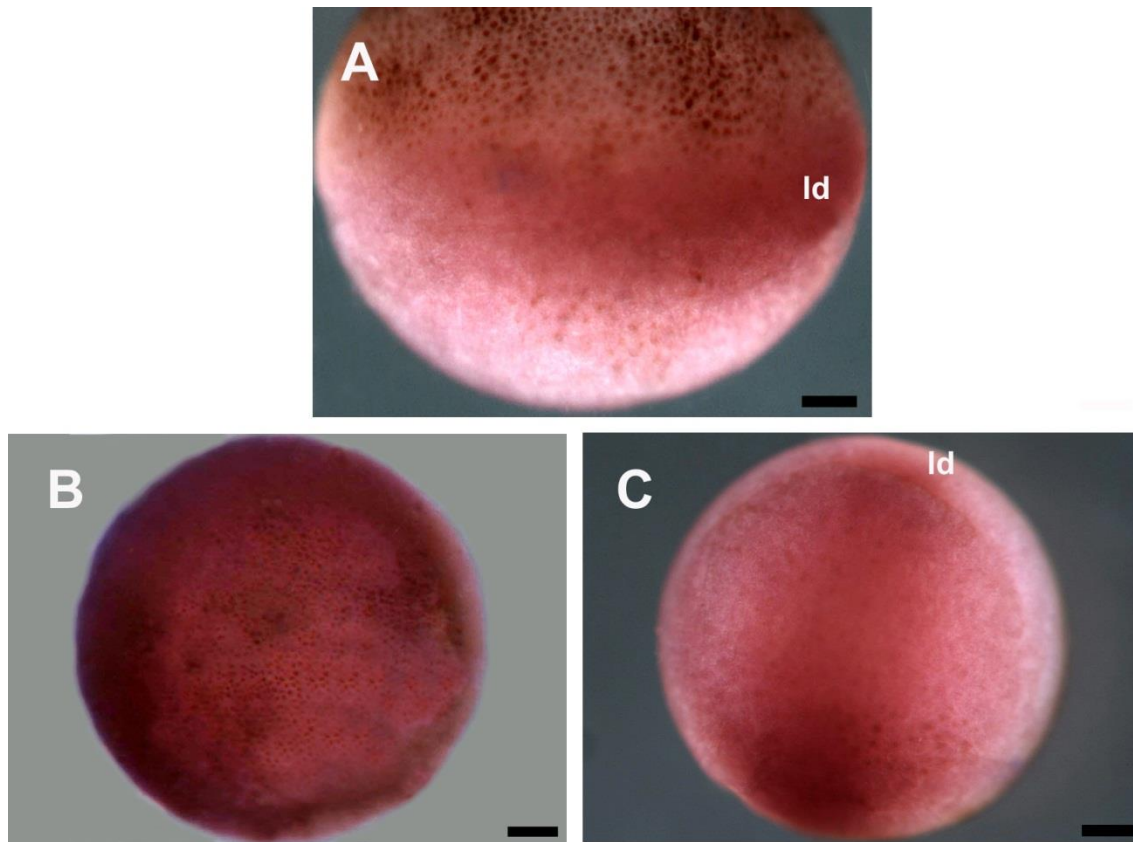


Figura 16. Expresión en montaje entero de la proteína vegt en el estadio de gástrula temprana de *E. machalilla* (estadio 10). Todas las imágenes corresponden a un mismo embrión que fue despigmentado. (A) Vista lateral. (B) Vista de la región animal. (C) Vista de la región vegetal. En todas las imágenes no se observa expresión de la proteína vegt. Las barras corresponden a 200 μm en todas las imágenes. Abreviaturas: lb, labio dorsal del blastoporo.

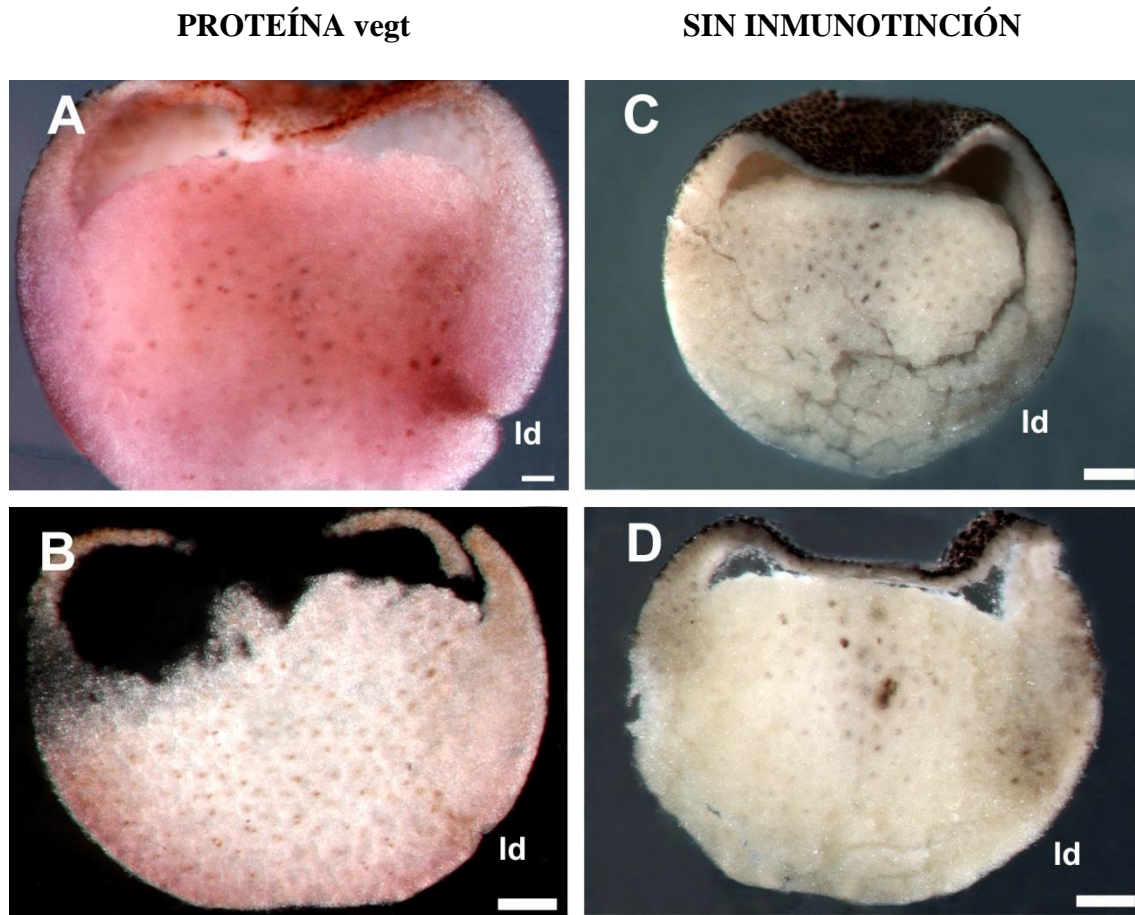


Figura 17. Expresión interna de la proteína vegt en el estadio de gástrula temprana de *E. machalilla* (estadio 10). Las imágenes de la columna izquierda (A y B) son de del mismo embrión inmunoteñido de la figura 16. (A) y (B) Bisección y sección sagital respectivamente. No se observa expresión de vegt en las células internas. Los núcleos celulares oscuros corresponden a pigmento. Las imágenes de la columna derecha (C y D) son de embriones control que no fueron inmunoteñidos. (C) y (D) Bisección y sección sagital respectivamente. Se observa presencia de células pigmentadas en el interior del embrión. Las barras corresponden a 100 μm para A y a 200 μm para B, C y D. Abreviaturas: lb, labio dorsal del blastoporo.

9. TABLAS

Tabla 1. Lista de fotografías y créditos

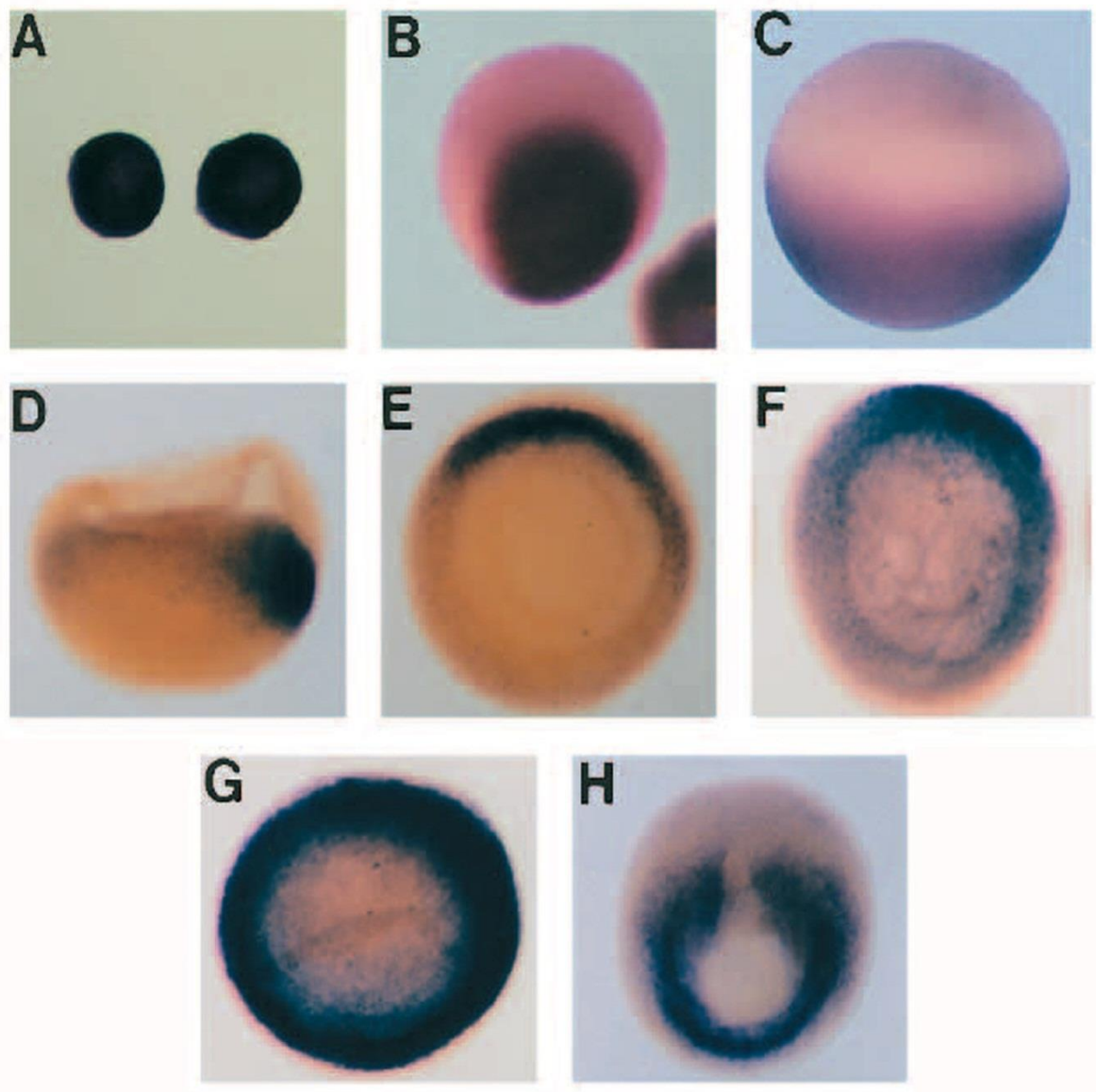
Fig.	Negativo	Especie	Método	Iluminación	Fecha	Crédito
1A	SNAP-105420-0008	<i>E. machalilla</i>	Inmunotinción	Luz Directa	10-SEP-12	Andrés Garcés
1B	SNAP-105420-0008	<i>E. machalilla</i>	Inmunotinción	Luz Directa	10-SEP-12	Andrés Garcés
1C	SNAP-130931-0017	<i>E. machalilla</i>	Hoechst	Fluorescencia	13-SEP-12	Andrés Garcés
2A	SNAP-114633-0006	<i>X. laevis</i>	Inmunotinción	Luz Directa	24-SEP-12	Andrés Garcés
2B	SNAP-114811-0007	<i>X. laevis</i>	Inmunotinción	Luz Directa	24-SEP-12	Andrés Garcés
2C	SNAP-114501-0004	<i>X. laevis</i>	Inmunotinción	Luz Directa	24-SEP-12	Andrés Garcés
3 ^a	SNAP-115826-0012	<i>X. laevis</i>	Inmunotinción	Luz Directa	24-SEP-12	Andrés Garcés
3B	SNAP-115930-0013	<i>X. laevis</i>	Inmunotinción	Luz Directa	24-SEP-12	Andrés Garcés
4D	SNAP-124224-0010	<i>E. randi</i>	Inmunotinción	Luz Directa	16-DIC-11	Andrés Garcés
4E	SNAP-124004-0004	<i>E. randi</i>	Inmunotinción	Luz Directa	15-DIC-11	Andrés Garcés
4F	SNAP-143820-0007	<i>E. randi</i>	Inmunotinción	Luz Directa	06-ENE-12	Andrés Garcés
4G	SNAP-115256-0004	<i>E. randi</i>	Sin Procesar	Luz Directa	24-NOV-11	Andrés Garcés
4H	SNAP-115521-0006	<i>E. randi</i>	Sin Procesar	Luz Directa	24-NOV-11	Andrés Garcés
4I	SNAP-115336-0005	<i>E. randi</i>	Sin Procesar	Luz Directa	24-NOV-11	Andrés Garcés
5B	SNAP-094912-0003	<i>E. randi</i>	Inmunotinción	Luz Directa	17-ENE-12	Andrés Garcés
6B	SNAP-123954-0037	<i>E. randi</i>	Inmunotinción	Luz Directa	24-MAY-12	Andrés Garcés
6C	SNAP-111127-0001	<i>E. randi</i>	Inmunotinción	Luz Directa	28-MAY-12	Andrés Garcés
6D	SNAP-160227-0014	<i>E. randi</i>	Sin Procesar	Luz Directa	18-ENE-12	Andrés Garcés
6E	SNAP-111127-0001	<i>E. randi</i>	Sin Procesar	Luz Directa	28-MAY-12	Andrés Garcés
7C	SNAP-113335-0026	<i>E. randi</i>	Inmunotinción	Luz Directa	28-MAY-12	Andrés Garcés
7D	SNAP-111857-0013	<i>E. randi</i>	Inmunotinción	Luz Directa	28-MAY-12	Andrés Garcés
7E	SNAP-161754-0019	<i>E. randi</i>	Sin Procesar	Luz Directa	18-ENE-12	Andrés Garcés
7F	SNAP-160747-0016	<i>E. randi</i>	Sin Procesar	Luz Directa	18-ENE-12	Andrés Garcés
8B	SNAP-112600-0005	<i>E. randi</i>	Inmunotinción	Luz Directa	05-JUN-12	Andrés Garcés

8C	SNAP-153925-0007	<i>E. randi</i>	Inmunotinción	Luz Directa	04-MAY-12	Andrés Garcés
8D	SNAP-133423-0009	<i>E. randi</i>	Inmunotinción	Luz Directa	06-JUL-12	Andrés Garcés
8E	SNAP-104143-0025	<i>E. randi</i>	Sin Procesar	Luz Directa	08-AUG-12	Andrés Garcés
8F	SNAP-104143-0025	<i>E. randi</i>	Sin Procesar	Luz Directa	08-AUG-12	Andrés Garcés
9A	SNAP-113909-0005	<i>E. randi</i>	Inmunotinción	Luz Directa	04-AUG-11	Andrés Garcés
9B	SNAP-114630-0010	<i>E. randi</i>	Inmunotinción	Luz Directa	04-AUG-11	Andrés Garcés
9C	SNAP-143047-0029	<i>E. randi</i>	Inmunotinción	Luz Directa	01-JUN-11	Andrés Garcés
9D	SNAP-124806-0017	<i>E. randi</i>	Sin Procesar	Luz Directa	18-ENE-12	Andrés Garcés
9E	SNAP-124626-0016	<i>E. randi</i>	Sin Procesar	Luz Directa	18-ENE-12	Andrés Garcés
9F	SNAP-144513-0002	<i>E. randi</i>	Sin Procesar	Luz Directa	18-ENE-12	Andrés Garcés
10A	SNAP-123600-0003	<i>E. randi</i>	Inmunotinción	Luz Directa	27-ABR-12	Andrés Garcés
10B	SNAP-125429-0005	<i>E. randi</i>	Inmunotinción	Luz Directa	27-ABR-12	Andrés Garcés
10C	SNAP-144832-0020	<i>E. randi</i>	Sin Procesar	Luz Directa	11-JUL-2012	Andrés Garcés
10D	SNAP-144832-0020	<i>E. randi</i>	Sin Procesar	Luz Directa	11-JUL-2012	Andrés Garcés
11C	SNAP-143842-0005	<i>E. machalilla</i>	Inmunotinción	Luz Directa	15-DIC-12	Andrés Garcés
11D	SNAP-122426-0018	<i>E. machalilla</i>	Inmunotinción	Luz Directa	31-MAY-12	Andrés Garcés
11E	SNAP-101537-0010	<i>E. machalilla</i>	Inmunotinción	Luz Directa	06-JUN-12	Andrés Garcés
11F	SNAP-095221-0012	<i>E. machalilla</i>	Sin Procesar	Luz Directa	08-AUG-12	Andrés Garcés
11G	SNAP-093344-0006	<i>E. machalilla</i>	Sin Procesar	Luz Directa	08-AUG-12	Andrés Garcés
11H	SNAP-093344-0006	<i>E. machalilla</i>	Sin Procesar	Luz Directa	08-AUG-12	Andrés Garcés
12B	SNAP-154528-0013	<i>E. machalilla</i>	Inmunotinción	Luz Directa	27-ABR-12	Andrés Garcés
12C	SNAP-154528-0013	<i>E. machalilla</i>	Inmunotinción	Luz Directa	27-ABR-12	Andrés Garcés
12D	SNAP-123025-0003	<i>E. machalilla</i>	Sin Procesar	Luz Directa	09-JUL-12	Andrés Garcés
12E	SNAP-123025-0003	<i>E. machalilla</i>	Sin Procesar	Luz Directa	09-JUL-12	Andrés Garcés
13B	SNAP-114134-0007	<i>E. machalilla</i>	Inmunotinción	Luz Directa	28-FEB-11	Andrés Garcés
13C	SNAP-155100-0033	<i>E. machalilla</i>	Inmunotinción	Luz Directa	24-MAR-11	Andrés Garcés
13D	SNAP-123139-0005	<i>E. machalilla</i>	Sin Procesar	Luz Directa	09-JUL-12	Andrés Garcés

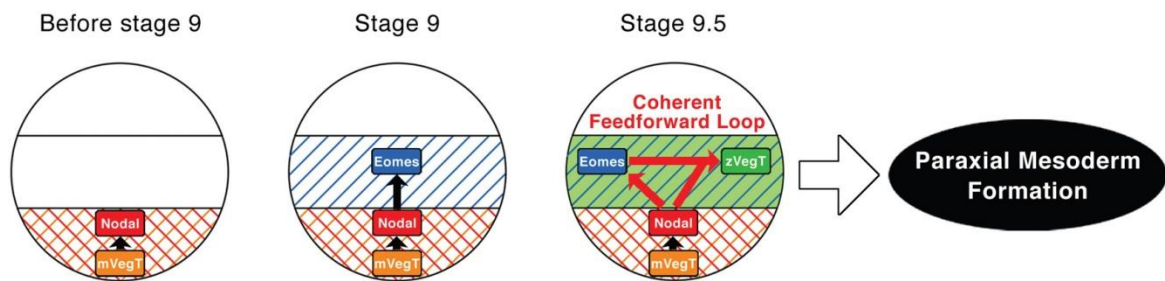
13E	SNAP-123139-0005	<i>E. machalilla</i>	Sin Procesar	Luz Directa	09-JUL-12	Andrés Garcés
14B	SNAP-121457-0018	<i>E. machalilla</i>	Inmunotinción	Luz Directa	05-MAY-11	Andrés Garcés
14C	SNAP-155759-0035	<i>E. machalilla</i>	Inmunotinción	Luz Directa	24-MAR-11	Andrés Garcés
14D	SNAP-123635-0008	<i>E. machalilla</i>	Sin Procesar	Luz Directa	09-JUL-12	Andrés Garcés
14E	SNAP-123635-0008	<i>E. machalilla</i>	Sin Procesar	Luz Directa	09-JUL-12	Andrés Garcés
15B	SNAP-104344-00068	<i>E. machalilla</i>	Inmunotinción	Luz Directa	23-JUL-12	Andrés Garcés
15C	SNAP-125120-0010	<i>E. machalilla</i>	Inmunotinción	Luz Directa	12-JUL-12	Andrés Garcés
16A	SNAP-105832-0009	<i>E. machalilla</i>	Inmunotinción	Luz Directa	08-AUG-11	Andrés Garcés
16B	SNAP-123534-0028	<i>E. machalilla</i>	Inmunotinción	Luz Directa	09-NOV11	Andrés Garcés
16C	SNAP-111036-0014	<i>E. machalilla</i>	Inmunotinción	Luz Directa	08-AUG-11	Andrés Garcés
17A	SNAP-122713-0015	<i>E. machalilla</i>	Inmunotinción	Luz Directa	09-ENE-12	Andrés Garcés
17B	SNAP-113705-0002	<i>E. machalilla</i>	Inmunotinción	Luz Directa	11-ABR-12	Andrés Garcés
17C	SNAP-121215-0006	<i>E. machalilla</i>	Sin Procesar	Luz Directa	17-AUG-11	Andrés Garcés
17D	SNAP-105201-0004	<i>E. machalilla</i>	Sin Procesar	Luz Directa	18-ENE-12	Andrés Garcés

10. ANEXOS

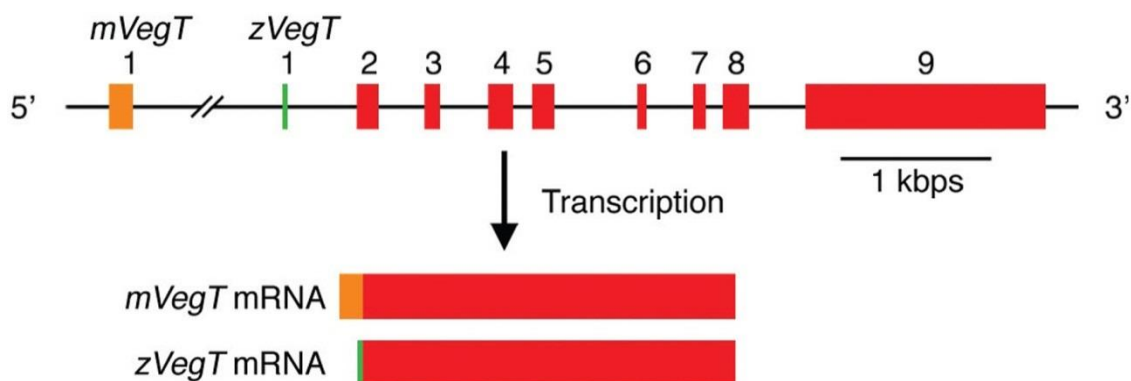
Anexo 1



Anexo 1. Localización espacial de *vegt* en *X. laevis* desde la oogénesis hasta la finalización de la gastrulación. (A) Oocitos en estadio I. *Vegt* se encuentra uniformemente distribuido. (B) Oocito en estadio IV. *Vegt* se localiza en el hemisferio vegetal. (C) Huevo ovulado. *Vegt* permanece en la región vegetal. (D) Embrión en estadio 9.5. Vista lateral orientado con el polo animal hacia arriba. El *vegt* zigótico se expresa mayormente en el lado dorsal. (E) Estadio 9.5. Vista desde polo vegetal del mismo embrión que D. (F) Embrión en estadio 10.25. Vista polo vegetal. *Vegt* permanece mayormente en el lado dorsal, pero ha comenzado a expandirse a lo largo de los lados lateral y ventral. (G) Embrión en estadio 10.5. Vista vegetal. La expresión de *vegt* ha cubierto toda la zona marginal. (H) Embrión en estadio 12.5. Vista posterior. *Vegt* se localiza alrededor del blastoporo a excepción de la región dorsal (Modificado de Zhang y King, 1996).



Anexo 2. Modelo de regulación del *vegt* zigótico por las señales de *Eomesodermin* y *Nodal*. El *vegt* materno induce la expresión de las señales *Nodal* antes del estadio 9. Las señales *Nodal* inducen la expresión de *Eomesodermin* en el estadio 9. Luego, las señales de *Nodal* y *Eomesodermin* en conjunto y simultáneamente activan la expresión zigótica de *vegt* en el estadio 9.5. Este mecanismo inductivo de regulación forma un coherente circuito de retroalimentación y participa en la formación del mesodermo paraxial (Fukuda *et al.*, 2010).



Anexo 3. Estructura genómica del locus de *vegt* en *X. tropicalis*. El primer exon de *vegt* maternal, el primer exon de *vegt* zigótico y los exones comunes de ambas variables se muestran en los bloques color naranja, verde y rojo, respectivamente. Se observa que el extremo que presenta variación es el 5' (Fukuda *et al.*, 2010).

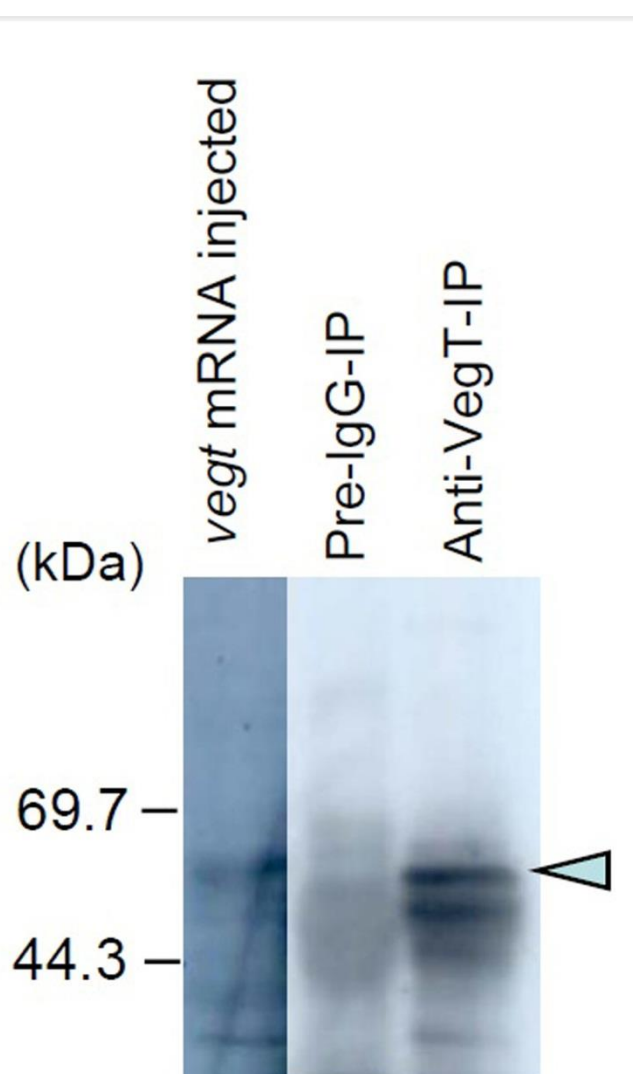


Anexo 4. Diagrama del sitio de reconocimiento del anticuerpo desarrollado en contra de la proteína vegt. La imagen esquematiza la proteína vegt. La región verde muestra la zona que reconoce el anticuerpo en contra de la proteína vegt. El sitio de reconocimiento comprende desde el aminoácido 237 al 363. El número de acceso es NP_001081665 (Modificado de Sudou *et al.*, 2012).

ORIGIN

1 mnrccrergf svgrlepets fscasdvkss pdmdsvssqd slylpnsiga sledqnlwtq
61 fhqegtemii tksgrrmfpq ckirlfglhp ytkymllvdf vpldnfrykw nknqweaagk
121 aephppcrty vhpdspasga hwmkdpicfq klkltntld qgghiilhsm hrykprfhvv
181 qsddmynspw glvqvfsfpe teftavtayq nekitklkin hnpfakgfre qershkrddv
241 lktlqqspk sqkrkkweds peadisdfpk atrikeesim dpagvyqnwv sdheanqglt
301 phspesegvn qeqqvptsss nfyiksqr r ssqhlsspyd lgepssrrlt pdvatvpdsd
361 pds lavlhvi ptqnsaqert csmnfsmetp mkqplrgaiy spygteqwmv paqgpyqpv
421 ytayptdlsa qgavahphsg msdwsqyslf pycw

Anexo 5. Secuencia de aminoácidos de la proteína vegt de *X. laevis*. La secuencia muestra la región de aminoácidos correspondiente al T-box de color amarillo. La región de color verde muestra la secuencia de aminoácidos que reconoce el anticuerpo desarrollado en contra de la proteína vegt utilizada en este trabajo. El número de referencia de la secuencia es NP_001081671.1 (Kloc *et al.*, 2011).



Anexo 6. Detección de la proteína *vegt* por parte del anticuerpo (anti-*vegt*) por western blotting. En el tercer carril la flecha muestra la presencia de la banda correspondiente a la proteína *vegt* (Sudou *et al.*, 2012).

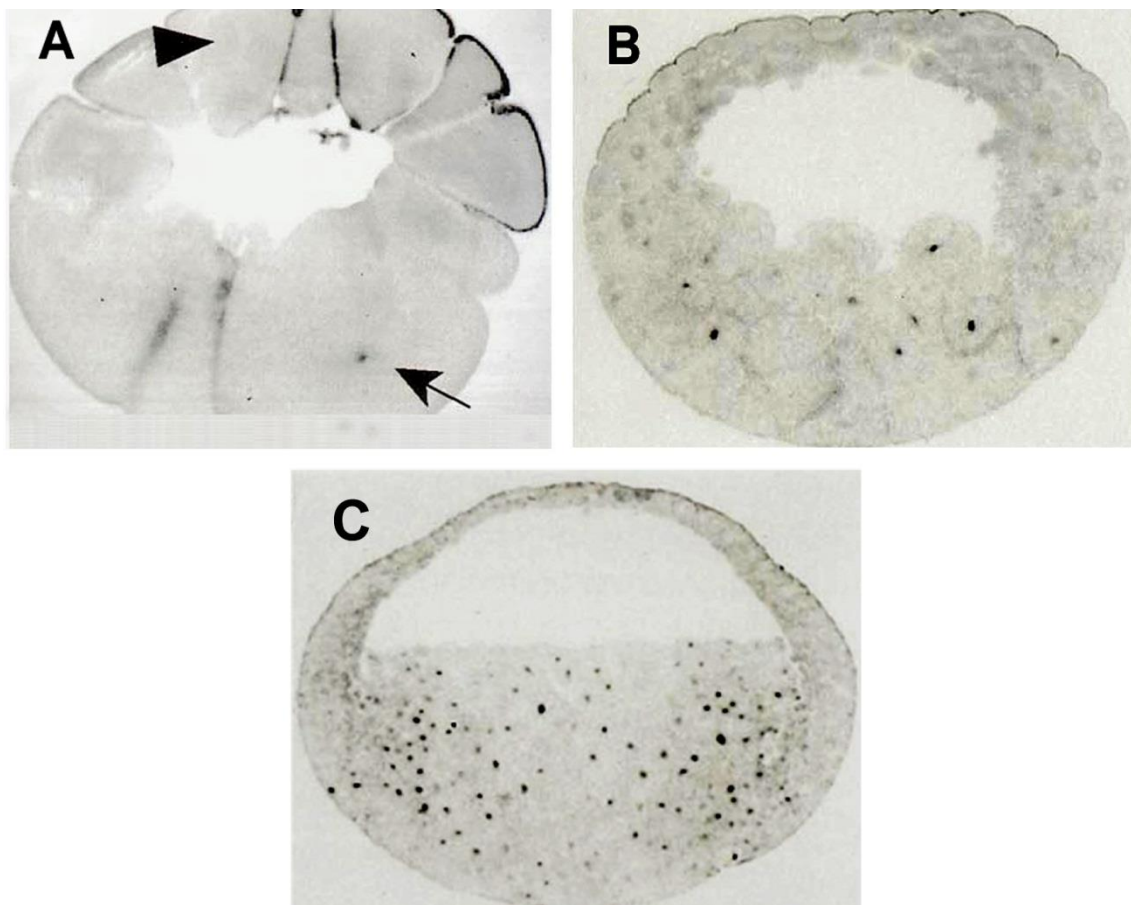
Developmental characteristics of different frogs.

Species	Reproductive mode	Egg diameter (mm)	Developmental time ^a
Rapid Development			
<i>Xenopus laevis</i>	Aquatic	1.2	14 h
<i>Engystomops randi</i>	Foam nest	1.1	24 h
Slow Development			
<i>Epipedobates machalilla</i>	Terrestrial nest	1.6	4 days

^a Time from fertilization to the end of gastrulation, reviewed in del Pino et al. (2007).

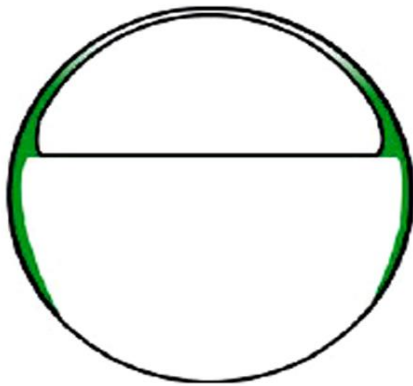
^b Detected by the elongation of the notochord, reviewed in del Pino et al. (2007).

Anexo 7. Características del desarrollo en diferentes ranas. La imagen muestra el tiempo que transcurre desde la fertilización hasta el final de la gastrulación en diferentes ranas. Las ranas *X. laevis* y *E. randi* tienen huevos pequeños y son de desarrollo rápido. La rana *E. machalilla* tiene huevos grandes y es de desarrollo lento (Modificado de Sáenz-Ponce *et al.*, 2012).

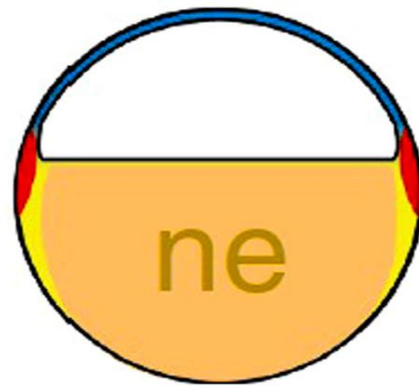


Anexo 8. Expresión de la proteína vegt en el clivaje tardío, blástula y gástrula tempranas de *X. laevis* (estadios 6, 8 y 10.25). Las imágenes están orientadas con el polo animal hacia arriba. (A) Expresión de vegt en el estadio 6. La flecha indica un núcleo positivo para vegt. (B) Expresión de vegt en el estadio 8. Se observa núcleos positivos en la zona marginal y parte de la región vegetal. (C) Expresión de vegt en el estadio 10.25. Se observa marcación de vegt en la zona marginal y región vegetal (Modificado de Stennard *et al.*, 1999).

BLASTULA/GASTRULA
Mesoderm Including Activity



FATE MAP



Anexo 9. Patronamiento de la inducción mesodermal y mapa de destino en *E. coqui*.

Todos los diagramas son vistas sagitales y dibujados a escala. En el esquema de la blástula/gástrula se observa que la actividad inductora del mesodermo (verde) se restringe a la periferia de las zonas marginal y submarginal. En el mapa de destino se observa que la falta de actividad molecular en gran parte del hemisferio vegetal es debido al desarrollo de endodermo nutritivo en esta región (anaranjado) (Modificado de Elinson y del Pino, 2012).