

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

ESCUELA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Análisis espacial del ARN mensajero *VegT* en oocitos de *Gastrotheca riobambae* y otras especies de anuros.

Disertación previa a la obtención del título de Licenciada en

Ciencias Biológicas

JOSELYN ALEXANDRA PRADO LÓPEZ

QUITO, 2011

Certifico que la disertación de Licenciatura de Ciencias Biológicas de la Srta. Joselyn Alexandra Prado López ha sido concluida de conformidad con las normas establecidas; por lo tanto, puede ser presentada para la calificación correspondiente.

Dr. Oscar Pérez Vaca

Director de la Disertación

Quito, Junio de 2011

“A mis padres, por su infinito amor y apoyo”.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer al Dr. Oscar Pérez, por darme la oportunidad de elaborar esta investigación en el laboratorio a su cargo y por su constante apoyo.

A mis compañeros de laboratorio Lucía Dután, David Ortega, Diana Vargas y Pablo Mancheno por sus enseñanzas y ayuda incondicional durante la elaboración de esta tesis.

Mi profundo agradecimiento a Ángel Orellana por brindarme ánimo, apoyo y amor día a día.

Finalmente, quisiera agradecer de manera especial a todos mis familiares y amigos que de una u otra manera me acompañaron en la realización de este proyecto.

1. RESUMEN

La presencia del ARN mensajero materno *VegT* en el oocito es de gran importancia para el desarrollo temprano de anuros. Su patrón de localización ha sido estudiado en varias especies de anuros y su función como activador transcripcional involucra genes blanco relacionados a la especificación del endodermo y producción de señales inductoras de mesodermo.

En este trabajo se investigó la localización de *VegT* en el oocito de *Gastrotheca riobambae* mediante la amplificación de la secuencia del mensajero en secciones de polos animal y vegetal utilizando iniciadores afines y se comparó con la localización del mensajero en oocitos de *Xenopus laevis*, *Epipedobates machalilla* y *Rhinella marina*. Además se investigó la localización de *VegT* mediante hibridización *in situ* con ribosondas específicas.

La amplificación del mensajero en secciones de oocito de *Gastrotheca riobambae* mostró una distribución del mensaje tanto en el polo animal como vegetal. Asimismo, la hibridización *in situ* mediante el uso de sonda antisentido en oocitos de *Gastrotheca riobambae* mostró una aparente localización a nivel del cortex vegetal y parte del citoplasma animal.

Dicha localización toma coherencia al ser relacionada con el tamaño del oocito, cantidad de yema y tipo de desarrollo de *X. laevis*, *E. machalilla* y *R. marina* los cuales presentan una localización vegetal de *VegT*.

Palabras clave: *Gastrotheca riobambae*, *VegT*, oocito, polo animal, polo vegetal.

2. ABSTRACT

The presence of the maternal factor *VegT* in the oocyte is important in the early development of anurans. Its localization has been studied in different anuran species, and its function, as a transcriptional activator, involves target genes related with the endoderm specification and the production of mesoderm inductive signals.

In this investigation, the localization of *VegT* in *Gastrotheca riobambae* oocytes, was analyzed with amplification of the messenger sequence in sections of vegetal and animal poles, using related primers; it was possible to compare these results with the localization of *VegT* in the oocytes of *Xenopus laevis*, *Epipedobates machalilla* and *Rhinella marina*. Besides, specific ARN probes were used for *in situ* hybridization in order to investigate *VegT* localization in the oocyte.

The DNA amplification showed a distribution of the message in the animal and vegetal pole of the *Gastrotheca riobambae* oocyte. Also, the *in situ* hybridization procedure with the antisense probe in the *Gastrotheca riobambae* oocytes showed an apparent localization in the vegetal cortex and part of the animal cytoplasm.

Such localization is logical when being compared with the egg size, the amount of yolk in the oocyte and the type of development that characterizes *X. laevis*, *E. machalilla* and *R. marina*, all of which exhibit a vegetal localization of *VegT*.

Key words: *Gastrotheca riobambae*, *VegT*, oocyte, animal pole, vegetal pole.

3. INTRODUCCIÓN

El patrón de localización del ARN materno *VegT* ha sido estudiado en varias especies de anuros, con diferencias que afectan su desarrollo embrionario (Beckham *et al.*, 2003). *Gastrotheca riobambae* presenta un particular modo de desarrollo (Elinson y del Pino, 1985), por lo cual, determinar la localización de *VegT* en los oocitos de esta especie y llevar a cabo un análisis comparativo con otras especies de anuros, permitirá reconocer la importancia del posicionamiento espacial del mensaje materno *VegT*.

Como base para la investigación se han tomado en cuenta algunos conceptos que se encierran en los subtemas descritos a continuación:

3.1. GENERALIDADES DE LAS CAPAS GERMINALES EN ANFIBIOS

La formación de las tres capas germinales conocidas como endodermo, mesodermo y ectodermo es un evento importante durante los estadios tempranos del desarrollo de los animales. La aparición de estas capas marca la primera señal discernible entre grupos de células, y al final de la embriogénesis los tejidos primitivos se diferencian para producir una diversidad de órganos especializados que conforman un organismo complejo. El endodermo dará lugar al sistema digestivo y otros órganos internos como los pulmones. El mesodermo generará músculo, sangre y esqueleto. Finalmente el ectodermo formará piel y tejido nervioso (Gilbert, 2003).

La organización espacial del embrión de anfibio se establece temprano en el desarrollo a través de la formación secuencial de centros localizados con capacidades inductivas. Uno de ellos, y el primero a ser elaborado, es el cortex vegetal del oocito, una región rica en componentes de citoesqueleto y ARNs localizados que logran polarizar la información genética en el oocito (Zhang y King, 1996).

3.2. LOCALIZACIÓN DE ARNs MENSAJEROS

En anfibios, la formación de las capas germinales emplea determinantes maternos localizados y eventos inductivos (Wolpert *et al.*, 2007). Un determinante localizado es un factor cuya posición específica y actividad resultante otorga un estado particular de compromiso a las células que los heredan selectivamente (Mowry y Cote, 1999).

Los ARNs localizados han sido encontrados en diferentes tipos celulares y en una gran variedad de organismos, desde levaduras hasta mamíferos (Clauben *et al.*, 2004). Su localización citoplasmática ha sido reconocida como una herramienta celular sofisticada que optimiza la expresión proteica en un nivel post-transcripcional (Du *et al.*, 2007) y permite la determinación de destinos específicos en las células derivadas de un huevo totipotente (Heasman *et al.*, 2001). Además genera gradientes de morfógenos, identifica polaridades y coordina procesos del desarrollo (Du *et al.*, 2007).

En la localización de ARN se pueden nombrar tres pasos: 1. Reconocimiento: sólo un grupo de moléculas en la célula deben ser reconocidas y luego localizadas, 2. Regionalización: Las moléculas de ARN deben ser transportadas a regiones definidas con la ayuda de elementos del citoesqueleto, proteínas motor, o por protección de degradación local, 3. Mantenimiento: las moléculas localizadas deben permanecer en el dominio citoplasmático correcto para de esta manera asegurar la expresión localizada (Mowry y Cote, 1999), esto puede ser mediante elementos del citoesqueleto como los filamentos intermedios de citoqueratina y microfilamentos. Incluso, ciertos ARNs localizados en la parte vegetal del oocito de anuros, funcionan a su vez como componentes estructurales de la red cortical de citoqueratina (Arthur, *et al.* 2009).

En anuros, los ARNs permanecen en el lugar adecuado dentro del oocito, el cual es arrestado por meses hasta que señales de maduración lo induzcan a convertirse en un huevo fertilizable (Alarcón y Elinson, 2001).

Para la translocación dos vías temporales distintas actúan transportando los ARNs durante la oogénesis, la vía temprana y la tardía (Alarcón y Elinson, 2001) (Anexo 1).

La vía Temprana o METRO opera durante los estadios tempranos de la oogénesis. Varios ARN mensajeros localizados por esta vía están involucrados en el desarrollo de células germinales como *Xcat-2*, *Xlsirts* y *Xwnt-11* (Arthur *et al.*, 2009). Dentro de esta vía se pueden diferenciar tres pasos, el primero es la translocación de ARNs específicos desde el sitio de sus síntesis a los agregados de mitocondrias que rodean la vesícula germinal. En el segundo paso los ARNs integran un solo agregado dominante, la nube mitocondrial (Mowry y Cote, 1999).

La nube mitocondrial (cuerpo de Balbiani) es una estructura esférica sin membrana que se forma en la oogénesis temprana y se fragmenta en la oogénesis tardía. Sus componentes constantes son mitocondrias, retículo endoplasmático, vesículas membranosas y gotas de lípidos (Kloc y Etkin, 2005). La nube mitocondrial se va moviendo hacia el polo vegetal y finalmente se extiende en el cortex vegetal, donde los ARNs logran anclarse, dando lugar al tercer paso. El transporte vegetal de estos ARNs no depende de componentes del citoesqueleto, sin embargo al momento del anclaje los microfilamentos son necesarios (Mowry y Cote, 1999).

La segunda vía, la vía Tardía, localiza ARN mensajeros que codifican determinantes del desarrollo, como *Vg1* y *VegT*, hacia el polo vegetal del oocito. En estadios tempranos estos ARNs se encuentran dispersos en todo el citoplasma, excluidos de la nube mitocondrial, luego se van ubicando en el hemisferio vegetal donde permanecen hasta el final de la oogénesis (Clauben *et al.*, 2004). Yisraeli *et al.* (1990), proponen un modelo de dos pasos para la localización de la vía tardía; el primero consiste en la translocación dependiente de microtúbulos y el segundo es el anclaje de los ARNs al cortex vegetal mediado por microfilamentos (Mowry y Cote, 1999). Varios de los ARN

mensajeros de vía tardía son necesarios para la formación de las capas germinales. Existen pocos ARNs que exhiben ambas vías y se los llama de vía intermedia (Arthur *et al.*, 2009).

3.3. FAMILIA T-BOX

Las proteínas T-box son factores de transcripción que controlan la especificación y la morfogénesis de muchos tipos celulares durante el desarrollo de vertebrados e invertebrados. Se los llama de esta manera porque en su estructura poseen una secuencia conservada llamada T-box (Conlon *et al.*, 2001). VegT es miembro de esta familia (Zhang y King, 1996).

Estas proteínas contienen dos dominios estructurales y funcionales: una secuencia específica de unión al ADN (T-box) y un dominio activador o represor de la transcripción que provee de un rol regulatorio en el desarrollo (Wilson y Conlon, 2002).

En su estructura se puede diferenciar el dominio T que es el responsable de la unión al ADN, una parte C terminal que es la que posee el dominio transcripcional y en algunos miembros de la familia también se puede presentar una región N-terminal la cual se cree que interactúa con ciertos cofactores (Minguillon y Logan, 2003) (Anexo 2).

T-box es un dominio relativamente grande que comprende un tercio de la proteína completa aproximadamente, la cual oscila entre 17 y 26 kDa. Los miembros de la familia muestran mayor o menor homología a través del dominio, sin embargo residuos específicos dentro de la región T-box son 100 % conservados (Anexo 3). De hecho, todos los miembros de la familia se unen a una secuencia consensus del ADN: TCACACCT, pudiendo además unirse a dos o más motivos arreglados en varias orientaciones (Wilson y Conlon, 2002).

Aproximadamente 50 genes T-box han sido registrados en el reino animal (Wilson y Conlon, 2002). Con la identificación de estos genes en los genomas de varios organismos

modelo, ha sido posible agruparlos en cinco subfamilias: Brachyury, T-brain1, Tbx1, Tbx2 y Tbx6, siendo *VegT* perteneciente a la última subfamilia (Minguillon y Logan, 2003).

Genes en la misma subfamilia surgen de la duplicación de un solo gen ancestral, y pueden exhibir sitios de expresión similar que en algunos casos puede indicar redundancia funcional. Sin embargo estos genes también pudieron haber adquirido patrones únicos de expresión y/o funcionalidad mediante divergencia después del evento de duplicación inicial (Minguillon y Logan, 2003).

Para muchos de los genes T-box, existen ortólogos con un alto grado de similitud tanto en la secuencia, como en el patrón de expresión y función (Wilson y Conlon, 2002).

En *X. laevis* la familia T-box se encuentra representada por los genes específicos de mesodermo *Xbrachyury* (*Xbra*) (Smith *et al.*, 1991), *Eomesodermin* (*Eomes*) (Ryan *et al.*, 1996) y *VegT* (Zhang y King, 1996). *VegT*, en contraste a *Xbra* y *Eomes*, tiene un alto nivel de ARN mensajero materno el cual está localizado en el polo vegetal de los oocitos (Stennard *et al.*, 1999) (Anexo 4).

3.4. VegT

VegT, también llamado por algunos autores como Antipodean [Stennard *et al.*, 1996], Xombi [Lustig *et al.*, 1996], Brat [Horb y Thomsen, 1997], y XTbx6r [Smith, 1997] (Zhang *et al.*, 1998), es un factor de transcripción, cuya función es de gran importancia en el desarrollo de los ejes. Se la considera una proteína nuclear que tiene presente en su estructura una región C-terminal la cual es rica la en residuos de serina y treonina. (Zhang y King, 1996).

Proteínas similares se han encontrado en varios grupos de animales y se conoce que juegan un rol en la especificación de linaje celular (Zhang *et al.*, 1998). No existen ortólogos en el ratón ni en humanos para estos genes (Lardelli, 2003 en Nath *et al.*, 2005).

Sin embargo en el pez cebra, otro organismo modelo muy estudiado en Biología del Desarrollo, si existe un ortólogo, lleva el nombre de *spadetail* y es requerido en la formación del mesodermo, su expresión no es materna, es cigótica (Revisado por Stennard *et al.*, 1999). Otro ortólogo puede encontrarse en el pollo (Knezevic *et al.*, 1997), el cual al parecer está involucrado en procesos que ocurren después del desarrollo del mesodermo, mas no en la determinación de capas germinales (Nath *et al.*, 2005).

Ha sido posible también aislar ortólogos de *VegT* en varios anfibios, entre ellos se encuentra *EcVegT* perteneciente a *Eleutherodactylus coqui*, un anuro que presenta desarrollo directo, es decir que su desarrollo no atraviesa un estadio larvario (renacuajo). Este tipo de desarrollo implica que los huevos deben contener grandes cantidades de yema para permitir el desarrollo de una rana juvenil (Beckham *et al.*, 2003). A diferencia de *X. laevis*, el ARN de *EcVegT* está localizado en el citoplasma animal del huevo, mas no en el cortex vegetal (Nath *et al.*, 2005). Se cree que la cantidad de yema está relacionada con la organización de los oocitos y que durante la evolución del oocito de *E. coqui*, el incremento de yema pudo haber desplazado la localización de ARNs, y en consecuencia también el mapa de destino, hacia el polo animal (Beckham *et al.*, 2003). La ausencia de actividad inductora en el polo vegetal de *E. coqui* sugiere que estas células no están destinadas a convertirse en mesodermo ni endodermo. Se cree que las células vegetales sirven solamente como una fuente nutricional para la rana juvenil. Siendo entonces semejante a la yema en amniotes (Revisado por Nath *et al.*, 2005). Pese a la diferencia de localización del mensaje materno en los oocitos de *E. coqui*, la expresión cigótica es similar a la de *X. laevis*, ya que se presenta en la zona marginal de la gástrula (Nath *et al.*, 2005).

Otro ortólogo es RpVegT de *Rana pipiens*. Y, de la misma forma que *VegT* de *X. laevis*, su ARN materno está localizado en la región vegetal del oocito y es expresado cigóticamente en la zona marginal de la gástrula (Nath *et al.*, 2005).

Finalmente una importante investigación con el urodelo *Ambystoma mexicanum* (Ajolote) dio como resultado el aislamiento de un ortólogo de *VegT*, *AmVegT*, el cual posee una identidad del 79% con respecto al T-box de *VegT*. La expresión de este ortólogo es primero observada en la blástula tardía en la zona marginal. Durante la gástrula hay una expresión fuerte en el área que rodea el labio del blastoporo. Luego de la gastrulación la expresión permanece en la punta de la cola y en algunas células de la espina dorsal. El ARN de *AmVegT* no se localiza en la parte cortical del oocito y se lo detecta tanto en el polo animal como vegetal (Nath y Elinson, 2007).

3.4.1. ISOFORMAS DE *VegT*

Existen dos isoformas de *VegT* en *Xenopus laevis*: *mVegT*, un determinante materno y *zVegT*, un gen mesodermal cigótico, ambas tienen secuencias nucleotídicas idénticas excepto las que codifican la región N-terminal de la proteína (Fukuda *et al.*, 2010). Las dos isoformas son controladas por distintos mecanismos regulatorios transcripcionales, mas no por splicing. Otros ortólogos de *VegT* en vertebrados no se expresan de forma materna, por ello se infiere que el gen *mVegT* probablemente emergió por inserción de un promotor en la región corriente arriba del locus de *zVegT* durante la evolución de los anfibios (Fukuda *et al.*, 2010).

El ARN mensajero y la proteína de *mVegT* están depositados asimétricamente en la región vegetal del huevo y están restringidos al endodermo presuntivo de *X. laevis*, mientras que el ARN mensajero y la proteína de *zVegT* están localizados en el futuro

mesodermo. Se propone que los genes inducidos por *mVegT* promueven el destino endodermal y reprimen el mesodermal en las células vegetales (Fukuda *et al.*, 2010).

Inicialmente la isoforma *mVegT* induce la expresión de *Xnrs*, en consecuencia señales Nodal inducen la expresión de *Eomes*, finalmente *Eomes* y el señalamiento Nodal simultáneamente actúan de una manera coordinada para activar la expresión de *zVegT* (Fukuda *et al.*, 2010).

3.4.2. TRANSPORTE, LOCALIZACIÓN Y EXPRESIÓN DE *VegT*

La localización y transporte de los ARN mensajeros *Vg1* y *VegT* es dirigida por los elementos de localización (LEs) contenidos en las regiones no traducidas 3'. Dentro de estas regiones, elementos de secuencias repetidas como VM1 y E2, funcionan como lugares de unión para las proteínas hnRNP I y Vg1RBP/vera, respectivamente (Kress *et al.*, 2004).

Este complejo se asocia a otro factor de transporte como Xstau, luego es transportado activamente a lo largo de los microtúbulos hacia el cortex vegetal, donde es anclado con la ayuda de Prp que además interactúa con dos proteínas asociadas a los microfilamentos, Mena y Profilina (Heasman *et al.*, 2001) (Anexo 5).

El patrón de expresión de *VegT* es dinámico a lo largo del eje animal/vegetal durante la ovogénesis, y luego de esta, a lo largo del eje dorsoventral en la zona marginal. A diferencia de *Brachyury*, otro miembro de la familia T-box, *VegT* nunca es expresado en el notocordio (Zhang y King, 1996).

Los transcritos de *VegT* están concentrados en la parte vegetal de los oocitos. Durante el desarrollo, los niveles de ARN materno permanecen constantes desde el huevo no fertilizado hasta el estadio de blástula tardía. Los transcritos cigóticos se acumulan

desde la blástula tardía, llegando a niveles máximos durante la gastrulación y decreciendo durante el cierre del blastoporo (Zhang y King, 1996).

3.4.3. FUNCIÓN DE *VegT*

La expresión maternal de *VegT* es de excepcional importancia para el desarrollo, esto fue demostrado con experimentos basados en la inyección de oligonucleótidos antisentido que destruyen la reserva del ARN mensajero materno. El fenotipo resultante de la delección de *VegT*, mostró una ausencia completa en la formación del endodermo y dado que los blastómeros del polo vegetal pierden la habilidad de inducir mesodermo, se observa un embrión que presenta mesodermo reducido o casi ausente (Casey *et al.*, 1999) (Anexo 6). Además, en contraste con la situación normal, en embriones carentes de *VegT* el polo vegetal del embrión da lugar a derivados de mesodermo y ectodermo. Las células más vegetales se mueven hacia adentro del embrión, es decir la masa vegetal atraviesa movimientos de convergencia y extensión, movimientos característicos de mesodermo. La zona marginal no se invagina durante la gastrulación, permanece afuera del embrión y forma ectodermo (Zhang *et al.*, 1998). Resultados como estos sugieren que los genes blanco del activador transcripcional *VegT*, están involucrados en la especificación del endodermo y además en la producción de señales inductoras de mesodermo (Casey *et al.*, 1999).

VegT puede actuar de manera autónoma directa como un factor de transcripción y adicionalmente de manera no autónoma generando moléculas señalizadoras (Clements *et al.*, 1999).

Se proponen tres modelos con respecto a la función de la proteína *VegT*, el primero indica que el endodermo es generado de manera autónoma celular por *VegT* en el polo vegetal, mientras que el mesodermo se forma por inducción por otras células.

En el segundo modelo, tanto el mesodermo como el endodermo tienen lugar mediante un proceso autónomo celular por la presencia de VegT, pero el mesodermo se distingue por algún factor presente en esta región y no en la del endodermo, evidencia indica que dicho factor puede ser FGF, actuando como inductor de mesodermo y supresor de endodermo.

En el tercer modelo, VegT genera mesodermo y endodermo pero el endodermo requiere altas concentraciones locales del mismo. Esto sugiere un gradiente animal-vegetal de la proteína de VegT (Kavka y Green, 2000) (Anexo 7).

Se ha demostrado que el mecanismo de gradiente, modelo 3, es posible, dado que la concentración de VegT disminuye hacia el polo animal. Sin embargo el modelo uno es el que más se acerca a la realidad, ya que describe un mecanismo que sin duda ocurre, la inducción de mesodermo (Kavka y Green, 2000).

Pueden distinguirse dos grupos de genes blancos de VegT (Anexo 8). El primer grupo consta de algunos genes endodermo-específicos expresados cigóticamente, VegT los activa para que codifiquen factores de transcripción como *GATAs*, *Xsox17*, y *Mixer* los cuales a su vez forman una red funcional indispensable para el desarrollo del endodermo (Revisado por Souopgui *et al.*, 2008). Se considera a *Mixer* y *Xsox17* como un reguladores ya que además de inducir endodermo, reprimen genes del mesodermo (Heasman, 2006).

Masas vegetales aisladas, en ausencia de componentes animales o ecuatoriales, expresan varios marcadores del endodermo, esta habilidad respalda el hecho que formación del endodermo es autónoma y especificada por factores maternos depositados en el polo vegetal (Zhang *et al.*, 1998).

El mantenimiento del endodermo es dependiente de una señal de la familia Transforming Growth Factor β (TGF- β), además VegT va a generar una señal compleja compuesta por la acción de *Xnr1*, *Xnr2*, *Xnr4*, *activina B* y *derrière*, todas estas moléculas

son encontradas en el polo vegetal de la blástula y por lo tanto se sugiere que mantienen la expresión vegetal de marcadores de endodermo pero también constituyen la señal cigótica inductora de mesodermo (Clements *et al.*, 1999).

El segundo grupo inducido por VegT, contiene moléculas señalizadoras relacionadas con la familia TGF- β que a su vez están involucradas en la inducción del mesodermo y además son requeridas para que los movimientos de gastrulación sean adecuados (Kofron *et al.*, 1999). De hecho, se considera a VegT el responsable de la formación del 90% del mesodermo (Kofron *et al.*, 1999).

Otras moléculas relacionadas con el desarrollo del mesodermo son los genes relacionados con *nodal* *Xnr1*, *Xnr2*, *Xnr4*, *Xnr5*, *Xnr6* y *Derrière*. Estos genes son expresados al momento preciso en el lugar preciso, para actuar como factores inductores endógenos y su inhibición causa defectos en la diferenciación endodermo-mesodermo (Kofron *et al.*, 1999).

El mesodermo del embrión del anfibio se forma mediante una interacción, en la cual las células del hemisferio vegetal de la blástula tardía actúan sobre las células ecuatoriales (White *et al.*, 2002). Nieuwkoop (1973) demostró este principio cuando colocó en contacto un corte de tejido vegetal con un corte de tejido animal y observó que existía una inducción para que el tejido animal se vuelva mesodermo, en vez de ectodermo que normalmente es su destino (Revisado por Stennard, 1998) (Anexo 9).

Los genes inductores del mesodermo son cigóticos, ya que su inducción toma lugar durante la transición de la blástula media, sin embargo estos genes son regulados por factores de transcripción maternos que aparecen antes de este suceso (Revisado por Zhang *et al.*, 1998). Entonces, VegT genera una señal compleja reforzada por señales secundarias, estas se difunden en la región ecuatorial y producen un anillo de mesodermo. Las señales a

su vez son reforzadas en la parte dorsal por moléculas TGF- β generando el labio del blastoporo (Clements *et al.*, 1999).

Existe evidencia que sugiere que FGF y Activina son inductores endógenos del mesodermo liberados por el endodermo, ya que experimentalmente la inducción del mesodermo no fue bloqueada por Follistatin (inhibidor de Activina y BMP) ni por anticuerpos bloqueadores de FGF (Revisado por Agius *et al.*, 2000).

Durante los estadios de gástrula, una segunda ola de expresión de VegT se detecta en el mesodermo, aquí la función de VegT no es del todo comprendida pero puede estar involucrado directa o indirectamente en la activación transcripcional de algunos genes como *chordin*, *noggin*, y *cerberus* (Revisado por Souopgui *et al.*, 2008).

Otra importante y no muy conocida función de *VegT* es su papel estructural en la localización de ARNs. El citoesqueleto cortical de citoqueratina mantiene los transcritos de varios ARNs mensajeros en su lugar. La degradación de *VegT* rompe esta red y desestabiliza la posición de los ARN mensajeros. Cabe recalcar que este efecto en el anclaje fue un resultado de la delección de *VegT* y no debido a la ausencia de la proteína VegT, ya que mediante experimentos que suprimen la traducción a la proteína VegT, no se observó cambio alguno en los ARNs mensajeros vegetales. Por lo tanto, existe un grupo de ARNs mensajeros localizados en el oocito de *X. laevis*, los cuales son dependientes del ARN mensajero de *VegT* para su anclaje en el cortex vegetal (Heasman *et al.*, 2001).

3.5. CARACTERÍSTICAS Y BIOLOGÍA REPRODUCTIVA DE *Gastrotheca riobambae*

Esta investigación está enfocada en el anuro *G. riobambae* (Fowler, 1913) (Anexo 10), el cual se encuentra dentro del orden Anura y pertenece a la familia Hemiphractidae (Frost, 2011). Se distribuye en bosques y valles interandinos del norte y centro de

Ecuador (Provincias Carchi a Chimborazo), a altitudes entre 2200 - 3500 msnm. (Anexo 11). Su hábitat consiste de bosques montanos, zonas de cultivos valles interandinos húmedos y secos (Coloma y Quiguango-Ubillús, 2007).

Fue una especie muy común, sin embargo actualmente sus poblaciones están severamente fragmentadas y reducidas, en especial por la pérdida de hábitat debido al crecimiento urbano en los valles interandinos, cambios climáticos en sus áreas de distribución, patógenos, deforestación, agricultura, ganadería, quema, uso intensivo de pesticidas en cultivos, plantaciones forestales de pino y eucalipto (Coloma y Quiguango-Ubillús, 2007). Según la UICN (2004) se la considera en peligro, debido al declinamiento drástico de su población que se estima que es del 50% en las últimas tres generaciones (Coloma *et al.*, 2004 en UICN, 2009).

La reproducción de estas ranas tiene lugar en el suelo, la fertilización es externa. El amplexus ocurre en tierra y dura 24 a 48 horas antes de la puesta de huevos. Durante el amplexus el macho introduce las patas posteriores en la bolsa dorsal de la hembra y mientras los huevos salen de la cloaca de la hembra, el macho los captura, fertiliza y los mueve hacia la bolsa evitando que toquen el suelo. El transporte de los huevos toma de 6 a 8 horas y el período de incubación aproximadamente 100 días. La puesta contiene 130 huevos en promedio con un diámetro de 3mm aproximadamente (del Pino, 1989).

Bajo las condiciones normales de su hábitat, los embriones se desarrollan en una bolsa situada en la espalda de la madre durante 3 a 3.5 meses a una temperatura entre 17 y 23°C. Luego de la incubación los renacuajos son liberados mediante la ayuda de las patas posteriores de la madre, los renacuajos tendrán una vida acuática durante 4 meses o más hasta que alcancen la metamorfosis, y 8 meses a un año más para convertirse en adultos (del Pino, 1989).

En una condición no incubadora el tejido de la bolsa dorsal se parece a la piel normal de la rana, sin embargo durante la incubación se alarga y forma cámaras altamente vascularizadas para cada huevo (del Pino, 1989).

Los oocitos de *G. riobambae* son ricos en yema, son uniformemente amarillos y el polo animal no puede identificarse en base a pigmentación. Sin embargo en oocitos maduros el polo animal puede ser reconocido por la presencia de la vesícula germinal, la cual puede verse externamente como una mancha translúcida (del Pino, 1989).

Además del anuro antes referido se tomaron en cuenta otras especies para el análisis y comparación del posicionamiento de VegT, estas especies fueron elegidas por su disponibilidad en el laboratorio y por ser ampliamente estudiadas en algunas ramas de la Biología.

3.6 BIOLOGÍA REPRODUCTIVA DE *Xenopus laevis*, *Epipedobates machalilla* y *Rhinella marina*

Los huevos de *Xenopus laevis* miden 1.2 mm de diámetro, miles de estos son depositados en el agua junto con los gametos masculinos, ocurre una fecundación externa y al cabo de 24 a 48 horas eclosionan los renacuajos, estos crecen y atraviesan metamorfosis, donde reabsorben la cola, las branquias y desarrollan extremidades. La rana juvenil debe crecer y madurar sexualmente para convertirse en un adulto. La velocidad de desarrollo de *X. laevis* es rápida en comparación a otras ranas (Revisado por del Pino, 2010).

En el caso de *Epipedobates machalilla* los huevos miden 1.6 mm de diámetro, el desove consta de 8 a 16 huevos los cuales son fecundados y depositados en nidos terrestres que son protegidos por el macho hasta la eclosión de los renacuajos, posterior a la eclosión el macho los transporta en su espalda y los libera en el agua para que completen su

desarrollo. Se requieren 19 días aproximadamente desde la fecundación hasta la eclosión de los renacuajos avanzados (Revisado por del Pino, 2010).

El tamaño de la puesta de *Rhinella marina* varía entre 2500 y 12500 oocitos, de hasta 2 mm de diámetro cada uno. La fecundación es externa, los huevos son depositados en largas hileras, las larvas se desarrollan en el agua y crecen rápidamente entre 30 y 80 días de acuerdo a la temperatura. La madurez sexual la alcanzan en un año (Revisado por Coloma *et al.*, 2007).

En base a lo descrito previamente y a las investigaciones realizadas por varios autores, se puede afirmar que la importancia de *VegT* se ve reflejada en las variaciones de su localización como mensaje maternal en distintos anuros, en su efecto en la localización de estructuras embriónicas, en la correcta localización de otros mensajeros maternos por influencia del mismo, así como también en su rol inductivo del mesodermo y patronamiento del endodermo.

Por lo tanto, con esta investigación se pretende como objetivo principal conocer el posicionamiento espacial del mensaje maternal de *VegT* en los oocitos de *Gastrotheca riobambae*, para ello se trata de implementar técnicas moleculares como la amplificación de la secuencia del mensajero en los polos animal y vegetal de los oocitos de *Gastrotheca riobambae*, mediante el uso de iniciadores afines a la secuencia de *VegT* y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Es importante también aplicar este procedimiento en los hemisferios animal y vegetal de los oocitos pertenecientes a las especies *Xenopus laevis*, *Epipedobates machalilla* y *Rhinella marina*, para poder comparar dichos resultados con los del anuro principal de la investigación, *G. riobambae*.

Otra técnica a implementar es la síntesis de ribosondas para el procedimiento de hibridización *in situ* a realizarse en oocitos de *G. riobambae* y en embriones de *E. machalilla*, este último a manera de control.

Todo esto con la finalidad de contribuir al conocimiento de la biología del desarrollo de los anfibios y en especial al de los que habitan en el Ecuador.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. MATERIAL BIOLÓGICO

Dos especímenes de *Gastrotheca riobambae* fueron donados para esta investigación, uno por el Dr. Diego Almeida-Reinoso (Laboratorio de Herpetología de la Universidad Católica del Ecuador, Proyecto Balsa de los sapos) y uno por la Ing. Andrea Manzano (Laboratorio de Herpetología Molecular de la Universidad Católica del Ecuador). Los individuos correspondían a hembras adultas en buenas condiciones.

Las hembras de *Epipedobates machalilla* y *Rhinella marina* fueron colectadas en la Provincia de Manabí localidades Rio Coaque y Jama - El matal, respectivamente. Los especímenes fueron colectados con el permiso de colección N^o 008-09 IC-FAU-DNB/MA, otorgado por el Ministerio del Ambiente.

Y las hembras de la especie *Xenopus laevis* fueron adquiridas en el local de mascotas ubicado en el Centro Comercial El Bosque “SuperPet”.

4.2. MANTENIMIENTO EN CAUTIVERIO

TERRARIOS

Los ejemplares fueron mantenidos en cautiverio dentro del laboratorio a temperaturas que fluctúan entre 15 y 20 °C. Se utilizó terrarios de plástico, los cuales en el caso de *G. riobambae*, *E. machalilla* y *R. marina*, fueron adecuados con mallas plásticas en la base, piedras pequeñas y hojas. Se logró un ambiente húmedo colocando agua en la base del terrario y rociando agua reposada periódicamente. En el caso de *X. laevis* se llenó dicho terrario de agua ozonificada reposada (del Pino, 1981 y Vargas, 2011).

ALIMENTACIÓN

La alimentación consistió de grillos pequeños, medianos y grandes suministrados por el laboratorio de Herpetología, Proyecto Balsa de los Sapos. Se alimentó a los anuros dos veces por semana con dos grillos cada vez.

4.3. EXTRACCIÓN DE OVARIOS

Se obtuvo los ovarios a partir de un procedimiento quirúrgico. Para anestesiarse al anfibio se lo colocó dentro de un recipiente conteniendo la solución MS-222 de concentración 0.5 % y pH correspondiente a 7.2 (Solución 4.10.1.), que cubría al anfibio parcialmente. Una vez que el anfibio estuvo anestesiado se lo roció con agua reposada y se procedió a la cirugía.

Para llevar a cabo la operación se utilizó un estereoscopio e instrumentos estériles, se realizó una incisión en el cuarto inferior derecho o izquierdo de la parte ventral de la rana, se extrajo el ovario y se cerró la herida utilizando el hilo de sutura Vicryl *Plus* antibacterial, elaborando dos a cuatro puntos dependiendo el tamaño de la incisión realizada (Wright y Whitaker, 2001). Se aisló el anuro para su recuperación y se lo roció periódicamente con Amphibian Ringer Solution (SARS) (Solución 4.10.7.).

4.4. MANTENIMIENTO, MANIPULACIÓN Y SECCIONES DE OOCITOS

Luego de la extracción quirúrgica, se manipuló los ovarios en una solución MBS (Modified Barth Solution) 1 X (Gurdon, 1976), en el caso de *G. riobambae*, Steinberg 1 X en el caso de *E. machalilla* y *R. marina* y en PBS (Phosphate Buffered Saline) 1 X para el manejo del ovario de *X. laevis* (Solución 4.10.2, 4.10.3. y 4.10.4.). Se separó los oocitos del tejido del ovario y de los oocitos previtelogénicos con el fin de simplemente incluir en la investigación los oocitos más grandes de estadios 5 y 6.

4.4.1. PROCEDIMIENTO PREVIO A LA EXTRACCIÓN DE ARN

Se colocó aproximadamente 2 cm³ de oocitos de cada especie en tubos eppendorf de 1.5 ml conteniendo RNA later™ QUIAGEN, se los dejó a temperatura ambiente de 1 a 4 horas dependiendo el tamaño del oocito, siendo 1 hora necesaria en oocitos de tamaño reducido y 4 horas en oocitos de gran tamaño como los de *G. riobambae*. Luego de ello se los cortó horizontalmente con la ayuda de una cuchilla estéril separando el polo vegetal del animal (Anexo 12) y posterior a esto se los devolvió por separado (hemisferios animal y vegetal) a la solución de RNA later™ hasta la posterior extracción de ARN y síntesis de ADNc.

4.4.2. FIJACIÓN Y TRATAMIENTO DE TEJIDOS PARA HIBRIDIZACIÓN *IN SITU*

Se defoliculó otros oocitos pertenecientes a *G. riobambae* y se marcó con tinta china el sitio donde se distinguió la vesícula germinal, con el fin de identificar los polos animal y vegetal en los procedimientos posteriores. Se fijaron los oocitos en MEMFA 1 X (Solución 4.10.5.) por cuatro horas a temperatura ambiente. Luego se los lavó 2 veces con agua destilada en intervalos de 20 minutos. Hecho esto, se los trasladó a una solución de etanol al 50 % durante una hora. Luego se lavó dos veces con etanol al 70 % en intervalos de 1 hora y posteriormente se los dejó en etanol 100 %. Previo al procedimiento de hibridización *in situ*, se biseccionó los oocitos sagitalmente con una cuchilla estéril manteniendo el polo animal y vegetal en cada sección (Anexo 12).

Cabe recalcar que el área de trabajo y algunos de los materiales, para éste y los procedimientos posteriores, fueron tratados con etanol 70 %, RNase Away (Solución 4.10.10) y exposición a temperaturas de 60 °C, todo esto con el fin de eliminar cualquier clase de contaminación.

4.5. EXTRACCIÓN DE ARN

Se retiró el RNA later™ QUIAGEN del tubo que contiene polos animales y del tubo que contiene polos vegetales. Se agregó 1 ml del reactivo TRIzol® Reagent de Invitrogen™ a cada tubo, se homogenizó los hemisferios hasta formar una pasta y se siguió el protocolo de extracción según las especificaciones del fabricante. Se repitió este procedimiento para cada una de las especies estudiadas.

El equipo necesario incluyó una microcentrifuga Spectrafuge 24D Labnet, el baño maría seco Accublock™ Digital Dry Bath Labnet y el horno Optic Ivymen® System. El ARN resultante se disolvió en 24 µl de agua DEPC, de los cuales 2 µl fueron destinados para medir su concentración en el espectrofotómetro Evolution 60 Thermo Scientific y otros 2 µl para visualizar el ARN en una corrida electroforética en un gel de agarosa.

4.6. SÍNTESIS DEL ADN COMPLEMENTARIO

A partir del ARN total extraído se elaboró la síntesis de ADN complementario (ADNc). Para dicha técnica se utilizó la transcriptasa reversa M-MLV Reverse transcriptase de Promega y se siguieron las especificaciones del fabricante, donde para la síntesis de cadena simple de ADNc se requirió del adaptador Poly (A) x (dT)₁₅ de ROCHE, 1 µg para 2 µg del ARN extraído. El coctel de reactivos incluye 5 µl de Buffer de reacción 5 X M-MLV Promega, 1.25 µl de dNTP mix 10mM Invitrogen™, 25 unidades de RNase OUT de Invitrogen™ y 200 unidades de la enzima M-MLV RT Promega. Para la síntesis de la cadena complementaria se utilizó la técnica de reacción en cadena de la polimerasa.

4.7. AMPLIFICACIÓN MEDIANTE REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se llevó a cabo en un termociclador PTC-100 Peltier Thermal Cycler MJ research.

La reacción de PCR fue importante en la amplificación del ADNc obtenido a partir de los polos animal y vegetal de los oocitos, donde cada reacción constó de cuatro iniciadores: “L8 Forward” y “L8 Reverse” (tabla 1) dirigidos a la amplificación del gen “housekeeping” L8 que es utilizado como control, y “*A. spurelli* Forward 1” con el iniciador reverso “*VegT* Exact Reverse N” (Tabla 1) para la amplificación parcial del mensajero materno *VegT*.

Además, para elegir los iniciadores a incorporar en la PCR del ADNc, se utilizó los programas Oligo Analyzer 1.2, la herramienta ClustalW2 del EMBL-EBI y GenBank que forma parte del NCBI.

Los reactivos y detalles adicionales las reacciones de PCR se describen a continuación.

dNTP Mix 10 mM de Invitrogen™	0.5 µl
Taq reaction buffer Invitrogen™	2.5 µl
Magnesio Invitrogen™	0.7 µl
Taq DNA Polymerase Invitrogen™	0.3 µl
Iniciador “ <i>VegT A. spurelli</i> Forward 1”	0.5 µl
Iniciador “ <i>VegT</i> Reverse Exact N”	0.5 µl
Iniciador <i>L8</i> Forward	0.5 µl
Iniciador <i>L8</i> Reverse	0.5 µl
ADNc	1 µl
Agua DEPC	18 µl

VOLUMEN TOTAL	25 μ l
Número de ciclos del termociclador:	30
Temperatura inicial	94°C durante 3 minutos
	94°C por 50 segundos
	53°C por 50 segundos
	72°C por 1 minuto
Temperatura final	72°C durante 10 minutos

4.8. HIBRIDIZACIÓN *IN SITU*

4.8.1 TRANSFORMACIÓN Y CLONACIÓN

Se utilizó productos de miniprep previamente elaborados por el Dr. Oscar Pérez (2008), los cuales se encontraban en stock, almacenados a -20 °C. Corresponden a *VegT* de *G. riobambae* y *E. machalilla*, fragmentos que se encuentran ingresados al vector pGEM®-T Easy Vector System de Promega (Anexo 13) y cuya secuenciación corresponde al clon 813 (Anexo 14) y clon CmPI (Anexo 15) respectivamente (Pérez, 2008).

Para la transformación se siguió el protocolo de Invitrogen™ Transforming Chemically Competent Cells, el cual utiliza bacterias químicamente competentes TOP10® y un shock térmico para cerrar los poros y asegurar que el vector quede dentro de la bacteria. Para el shock térmico se utilizó un Baño María PRECISION Reciprocal Shaking Bath. Las bacterias fueron sembradas en cajas petri conteniendo medio LB (Solución 4.10.8) con agar y ampicilina que se considera el primer marcador. Además se aplicó Ultrapure™ X-gal de Invitrogen™ para que actúe como segundo marcador. Las cajas fueron incubadas en un horno Ivymen® System Incubator Shaker a 37 °C durante un día.

Luego de ello se eligió la colonia adecuada en base a los marcadores y se la sometió a PCR de colonias utilizando los iniciadores SP6 y T7 específicos del vector (tabla 1),

finalmente se escogió la colonia con el mejor resultado de amplificación y se la sembró en LB líquido más ampicilina, dando paso así al proceso de clonación.

Los reactivos y detalles adicionales para las reacciones de PCR se describen a continuación.

PCR PARA PRODUCTO DE MINIPREP:

dNTP Mix 10 mM de Invitrogen TM	0.5 µl
Colorless GoTaq reaction buffer Promega	5 µl
GoTaq DNA Polymerase 5 U/µl Promega	0.25 µl
Iniciador corriente arriba T7 Roche	0.5 µl
Iniciador corriente abajo SP6 Roche	0.5 µl
ADN	5 µl
Agua DEPC	13.25 µl
VOLUMEN TOTAL	25 µl

Número de ciclos del termociclador: 30

Temperatura inicial 94°C durante 3 minutos

94°C por 50 segundos

56°C por 50 segundos

72°C por 1 minuto

Temperatura final 72°C durante 3 minutos

PCR DE COLONIAS BACTERIANAS:

dNTP Mix 10mM de Invitrogen TM	0.5 µl
Colorless GoTaq reaction buffer Promega	5 µl
GoTaq DNA Polymerase 5 U/µl Promega	0.25 µl
Iniciador corriente arriba T7 Roche	0.5 µl

Iniciador corriente abajo SP6 Roche	0.5 μ l
ADN	La mitad de la colonia
Agua DEPC	18.25 μ l
VOLUMEN TOTAL	25 μ l
Número de ciclos del termociclador: 26	
Temperatura inicial 94°C durante 2 minutos	
94°C por 1 minuto	
55°C por 1 minuto	
72°C por 1 minuto	
Temperatura final 72°C durante 7 minutos	

4.8.2. PRODUCTO DE MIDIPREP

La mitad de la colonia restante fue sembrada en 50 ml de medio Luria-Bertoni (LB) líquido (Solución 4.10.8) y se dejó en un horno Ivymen® System Incubator Shaker a una temperatura de 37 °C y movimiento de 150 rpm durante toda la noche. Se centrifugó durante 8 minutos a 5000 rpm hasta obtener un pellet y se siguieron las especificaciones del fabricante Axygen Biosciences Axyprep Midi Kit.

En cuanto al equipo necesario para el procedimiento, se utilizó la centrifuga Jouan MR231 con un rotor apto para tubos Falcon de 50 ml, y la centrifuga Abbott 3531 con rotor para tubos Eppendorf de 1.5 ml.

Se midió la concentración de los productos mediante el espectrofotómetro Evolution 60 Thermo Scientific, a una longitud de onda de 260 nm y se realizó los cálculos y transformaciones correspondientes a μ g/ μ l. Además se comprobó el estado de dichos productos mediante una corrida electroforética.

4.8.3. SÍNTESIS DE LA SONDA

Para la preparación del templado fue necesario linearizar el plásmido con enzimas de restricción *Sal I* y *Apa I* de Invitrogen™. Se incubó las preparaciones a 37 °C durante 3 horas y media, luego se agregó Proteinasa K Fungal de Invitrogen™ y SDS 0.5 %. Se volvió a incubar a 50 °C por aproximadamente una hora. Se añadió un volumen de fenol cloroformo 1:1 a cada tubo. Se centrifugó 10 minutos, la capa superficial fue recogida y trasladada a un nuevo tubo, se agregó igual volumen de cloroformo, se centrifugó de nuevo 10 minutos y se removió la capa superficial para colocarla en otro tubo, a la que se le agregó 0.1 volúmenes de acetato de sodio 5 M y 2.5 volúmenes de etanol al 100 %. Se dejó reposar a menos 20 °C toda la noche.

Se centrifugó 10 minutos y se eliminó el sobrenadante. Se resuspendieron los pellets con aproximadamente 30 µl de etanol al 70 %, se centrifugó 10 minutos y se eliminó el sobrenadante. Este lavado fue repetido dos veces.

Se dejó secar los pellets a temperatura ambiente, y luego se los resuspendió con 15 µl de agua DEPC (Solución 4.10.6.) y finalmente se cuantificó la cantidad de ADN mediante el espectrofotómetro Evolution 60 Thermo Scientific y Qubit fluorometer Invitrogen™

Para la transcripción se utilizó Buffer de transcripción 5 X Roche, DIG RNA Labeling Mix 10 X de Roche, 100 mM DTT, Protector RNase Inhibitor de Roche, RNA polymerase SP6 y T7 de Roche, el templado y Agua DEPC. SP6 fue aplicado en el ADN linearizado con *ApaI* para dar lugar a la sonda antisentido y T7 en la linearización con *Sall* para la sonda sentido. Se llevó los tubos a 37 °C en un horno de hibridización Barnstead Lab-line Hybridization Incubator durante 4 horas.

Se tomó un microlitro del producto para comprobar la presencia del transcrito mediante electroforesis y al resto de muestra se le añadió igual volumen de Cloruro de Litio 8M para después llevarlo a -20 °C durante toda la noche.

Se centrifugó a 13000 rpm, a 4 °C, por 15 minutos y se eliminó el sobrenadante. Se lavó los pellets con 20 µl de etanol al 70 %, se centrifugó durante 10 minutos a la misma velocidad y temperatura para luego descartar el sobrenadante. Se resuspendieron los pellets en 100 µl de agua DEPC.

Para la hidrólisis de la sonda se añadió igual volumen (100 µl) de una mezcla de Bicarbonato de Sodio 80 mM y Carbonato de sodio 120 mM. Se incubó durante 60 °C por 30 minutos. Se añadió 12,5 µl de Cloruro de Litio 8 M y 2,5 volúmenes de etanol 100 % y se dejó precipitar a -20 °C durante toda la noche.

Se centrifugó a 13000 rpm, 4 °C por 10 minutos, se eliminó el sobrenadante. Se lavó los pellets con etanol 70 % dos veces. Finalmente se dejó secar a temperatura ambiente y se resuspendió en 20 µl de buffer de hibridización.

4.8.4. HIBRIDIZACIÓN

Para esto se utilizaron los oocitos de *G. riobambae* almacenados en etanol como se describió en el ítem 4.4. y además embriones estadio 12 (blástula) de *E. machalilla* fijados en MEMFA 1 X (Solución 4.10.5) y almacenados en etanol al 100 %, esto como un control positivo de la técnica. Se siguió las especificaciones del protocolo de Hibridización *In situ* especie-específico (del Pino, E., 1994) con modificaciones de Harland, 1995 (Pérez, 2008).

Se realizaron repeticiones para estandarizar el protocolo de hibridización, en todas ellas se aplicó las sondas a las bisecciones de los oocitos, excepto en una, donde se aplicó primero la sonda en montaje entero y luego se biseccionó.

4.9. ELECTROFORESIS

Este procedimiento fue de gran utilidad para la verificación de las muestras manejadas durante toda investigación.

Para ello, el equipo utilizado fue la cámara de electroforesis horizontal CBS Scientific CO., con una peineta de 10 pocillos, cada uno de 0,5 cm x 0,25 cm y capacidad de 15 µl. Para el procedimiento se realizaron geles de agarosa con concentración de 1 %, se utilizó 0.5 X (Sambrook y Russell, 2001) (Solución 4.10.9.) y solución RNase away (Solución 4.10.10) para limpiar la cámara. Para la preparación y carga de las muestras de usó Buffer de carga 10 X Blue Juice de Invitrogen™, SYBR Gold Nucleic Acid Gel Stain de Invitrogen™, 1 kb DNA ladder Promega y High Mass DNA ladder de Invitrogen™.

Los geles fueron visualizados mediante la exposición a luz UV del transiluminador Safe Imager™ de Invitrogen™ y el tamaño de los productos fue estimado mediante es software libre GelAnalyzer.

4.10. TAMPONES Y SOLUCIONES

4.10.1. MS-222 (1000 ml, 0.5 %, pH 7.2):

5 g Ethyl 3-aminobenzoate, methanesulfonic acid salt, 98 %

NaHCO₃ para ajustar el pH

H₂O destilada

(Wright y Whitaker, 2001)

4.10.2. MBS (Modified Barth Solution):

88 mM NaCl

1 mM KCl

2.4 mM NaHCO₃

0.82 mM MgSO₄
0.33 mM Ca(NO₃)₂
0.41 mM CaCl₂
10 mM HEPES

(Gurdon, 1976)

4.10.3. Steinberg 1 X:

60 mM NaCl
0.7 mM KCl
0.8 mM MgSO₄
0.3 mM Ca(NO₃)₂
1.4 mM Tris

Ajustar a pH 7.4

(Nickells *et al.*, 1988)

4.10.4. PBS (Phosphate Buffered Saline) 20 X:

1,5 mM KH₂ PO₄
7 mM Na₂HPO₄
137,7 mM NaCl

Ajustar el pH a 7.4

(Sive *et al.*, 2000).

4.10.5. MEMFA 1 X:

0.1M MOPS (ph7.4)
2 mM EDTA

1 mM MgSO_4
3.7% formaldehido

(Sive *et al.*, 2000).

4.10.6. Agua DEPC (libre de nucleasas)

1 ml Diethyl Pyrocarbonato SIGMA.

1litro Agua Mili Q

Dejar reposar toda la noche, y esterilizar mediante autoclave.

(Diethyl pyrocarbonato, información del producto, SIGMA)

4.10.7. Amphibian Ringer Solution (SARS)

6.6 g NaCl

0.15 g KCl

0.15 g CaCl_2

0.2 g NaHCO_3

Aforar a 1 litro con Agua Destilada

(Wright y Whitaker, 2001).

4.10.8. Medio Luria-Bertoni (LB) (250ml):

2.5 g Triptona

1.25 g Extracto de Levadura

2.5 g NaCl

250 ul Ampicilina (stock 50 mg/ml)

Aforar con agua destilada

(Sambrook y Russell, 2001).

4.10.9. TBE 5 X:

54 g TRIS
27.2 g Ácido Bórico
0.5 M EDTA

Aforar a 1 litro con agua destilada

(Sambrook y Russell, 2001).

4.10.10. RNase Away (removedor de ARNasas)

15% Peróxido de Hidrógeno
0.1 M NaOH

(Pérez *com pers*, 2010)

4.10.11. SSC 20 X:

3 M NaCl
0.4 M Citrato de Sodio

Aforar a 1 litro con agua destilada y regular el pH a 7.

(Sambrook y Russell, 2001).

4.10.12. Bleaching solution:

E. machalilla:

1 % H₂O₂
5 % Formamida
0.5 X SSC

G. riobambae (20ml):

10 ml metanol

10 ml H₂O₂ 30 %

(Sive *et al.*, 2000; Pérez, 2008).

4.10.13. PTW:

1 X PBS

0.1 % Tritón X-100

(Sive *et al.*, 2000).

4.10.14. Trietanolamina 0.1M:

0.9 g Trietanolamina

1 ml NaOH 1M

Aforar a 50 ml con Agua DEPC, pH 7.5

(Sive *et al.*, 2000).

4.10.15. MTW:

100 mM Ácido Maleico

150 mM NaCl

0.1 % Tritón X-100

10 N NaOH

Ajustar a pH 7.5

(Sive *et al.*, 2000).

4.10.16. Dig Buffer:

100 mM Tris pH 9.5

100 mM NaCl

50 mM MgCl₂

(Sive *et al.*, 2000).

4.10.17. Hybridization Buffer (Buffer de Hibridización):

50 % formamida

5 X SSC

100 µg/ml Heparin

2 % Blocking reagent

1 % Tween-20

0.1 % CHAPS

10 mM EDTA

(Sive *et al.*, 2000).

4.10.18. Hybridization wash (Lavado de Hibridización):

50 % Formamida

5 X SSC

0.1 % CHAPS

0.1 % Tween-20

(Sive *et al.*, 2000).

4.10.19. Buffer TE:

10 mM Tris/HCl pH 8

1 mM EDTA pH 8

(Sive *et al.*, 2000).

5. RESULTADOS

5.1. EXTRACCIÓN DE OOCITOS

El procedimiento quirúrgico fue exitoso en *G. riobambae*, *R. marina* y *X. laevis* sin embargo en *E. machalilla*, el procedimiento fue muy invasivo debido al reducido tamaño del cuerpo por lo que la hembra murió.

Luego de la cirugía se lograron obtener, de todas las especies, oocitos postvitelogénicos de estadio 5 y 6 acompañados de oocitos más pequeños de estadios 1, 2, 3, y 4 y tejido perteneciente al ovario. El tamaño de los oocitos aislados dependió de la especie, en *G. riobambae* los oocitos tuvieron un diámetro de 3 mm, en *E. machalilla* y *R. marina* se observó un tamaño similar de 1.6 mm aproximadamente, y los correspondientes a *X. laevis* 1 mm aproximadamente (Figura 1).

Se prepararon los oocitos tanto para la extracción de ARN como para la hibridización *in situ*.

5.2. EXTRACCIÓN DE ARN Y SÍNTESIS DE ADNc

Se extrajo RNA total de los polos animal y vegetal de los oocitos de *X. laevis*, *E. machalilla*, *R. marina* y *G. riobambae* tal como se describe en el ítem 4.5. La calidad del ARN se estimó por la presencia de bandas de ARN ribosomal de 5 kb y 2 kb; además en algunas ocasiones se observó una banda de 0.1 - 0.3 kb correspondiente a ARN de transferencia. El resultado fue el mismo en los polos animal y vegetal de los oocitos de todas las especies en estudio, sin embargo las bandas fueron más claras en los carriles correspondientes a *E. machalilla* y *G. riobambae* (Figura 2).

La síntesis de ADNc se realizó exitosamente según las especificaciones del fabricante, no se realizaron geles al respecto.

5.3. AMPLICONES *L8* Y *VegT*

Se elaboró un gel por especie, en donde se probaron además otros iniciadores que no dieron resultados positivos (imágenes no mostradas). En la figura 3 se muestran fragmentos de los geles que si dieron resultado. Cada uno de los carriles que se observan representa un ADNc sometido a la acción de los 4 iniciadores “*L8 Forward*”, “*L8 Reverse*”, “*A. spurelli Exact F1*” y “*VegT Exact Reverse N*” (tabla 1), excepto uno, el carril 8 que corresponde al ADNc vegetal del oocito de *R. marina*, donde a manera de prueba se aplicó únicamente los iniciadores dirigidos a *VegT*, esta imagen fue incluida en la figura simplemente porque las bandas contiguas son las de interés.

Las bandas fueron relacionadas con el marcador de peso encontrado en cada gel, sin embargo en la figura el marcador no fue incluido.

La amplificación del gen “housekeeping” *L8*, fue evidenciada en los polos animal y vegetal de todas las especies. La banda representante de dicha amplificación indicó un tamaño de 428 pb.

Por otro lado, los iniciadores amplificaron una secuencia parcial de *VegT* materno, amplificación que fue representada por una banda de 1135 pb., la cual fue observada en el polo vegetal de *X. laevis*, *G. riobambae*, *E. machalilla*, *R. marina* y únicamente en el polo animal de *G. riobambae*.

Se elaboró una repetición más clara y organizada, incluyendo sólo las muestras a amplificar con los 4 iniciadores dirigidos a *VegT* y *L8*. En esta repetición se obtuvo el mismo resultado de la amplificación que se describió previamente (Figura 4).

5.4. HIBRIDIZACIÓN *IN SITU*

5.4.1. PRODUCTOS DE CLONACIÓN Y MIDIPREP

Se obtuvo un crecimiento exitoso de colonias blancas tanto en la placa de *G. riobambae* como en la de *E. machalilla*, así se indica en la figura 5 y 6.

Además se logró obtener el producto de la PCR de tres colonias seleccionadas de ambas especies y visualizar sus fragmentos en un gel de agarosa 1 %. Los amplicones obtenidos de las tres colonias de *G. riobambae* correspondieron a 1500 pb, sin embargo la amplificación de la colonia 3 fue la más clara, por lo que fue escogida para los procedimientos posteriores. En el caso de *E. machalilla* solo dos de las tres colonias amplificaron el fragmento deseado, correspondiente también a 1500 pb aproximadamente. Se eligió la colonia uno para proceder al midiprep (Figura 7).

Mediante electroforesis también se pudo comprobar la presencia de los productos de midiprep de las dos especies, lo que indicó bandas que sugieren un tamaño 4000 pb en ambas especies (Figura 8).

La concentración de dichos productos fue cuantificada en el espectrofotómetro dando los valores que se especifican en la tabla 1. Estos valores fueron tomados en cuenta para la linearización durante el procedimiento de síntesis de la sonda.

5.4.2. SÍNTESIS DE LA SONDA

Se obtuvo la linearización del vector tanto para *G. riobambae* como para *E. machalilla* mediante las enzimas de restricción *SalI* para la síntesis de la sonda sentido y *ApaI* para la síntesis de la sonda antisentido, como se demuestra en la figura 9.

Se sintetizaron las sondas Sentido y Antisentido, luego de lo cual fueron hidrolizadas (Figura 10) y de esta manera se procedió a la hibridización *in situ*.

5.4.3. HIBRIDIZACIÓN IN SITU

Las sondas específicas fueron aplicadas según el protocolo en los embriones estadio 12 de *E. machalilla* como un control de la técnica y en oocitos de *G. riobambae*.

En el embrión de *E. machalilla* hibridizado con sonda antisentido se pudo observar una reacción positiva de color alrededor del tapón de yema, mientras que en el embrión tratado con sonda sentido no se observa reacción alguna (Figura 11).

Las sondas sentido y antisentido de *G. riobambae* se aplicaron a las bisecciones de oocitos fijados y pre tratados para la hibridización.

Se elaboraron varias repeticiones para estandarizar el procedimiento de hibridización *in situ* en oocitos de *G. riobambae*.

En la figura 12 se observan dichas hibridizaciones, las cuales se encuentran organizadas por tipo de sonda para la hibridización (sentido o antisentido) y por el punto de observación de las bisecciones (vista interna o externa). Además se muestran diagramas que representan cada bisección hibridizada donde se señala el marcaje de la vesícula germinal con color negro y la localización del ARN mensajero *VegT* con color azul.

En la primera fila y segunda fila de la figura 12 están los oocitos que fueron hibridizados en montaje entero y que posterior a ello fueron biseccionados. La primera fila corresponde a las bisecciones de oocitos hibridizados con sonda sentido, donde no se distingue ninguna señal y la segunda fila pertenece a la hibridización *in situ* con sonda antisentido, en este caso se distingue una señal ubicada en la parte del cortex vegetal del oocito tanto en la vista interna como externa de la bisección. En la vista externa de la bisección también se diferencia una reacción de color cerca del cortex animal.

En la tercera fila se observan bisecciones hibridizadas con sonda sentido, donde no se diferencia ninguna señal. En la fila 4 se encuentran las bisecciones hibridizadas con

sonda antisentido que indican una localización en el cortex vegetal y parte del cortex animal.

En la quinta fila las bisecciones incubadas con sonda sentido, dieron resultados negativos y en la sexta fila, correspondiente a la aplicación de sonda antisentido, las bisecciones dieron reacción positiva en el cortex vegetal, cortex animal y una pequeña porción de citoplasma animal.

Finalmente en la fila 7 se muestra únicamente la vista interna de una bisección de oocito de *G. riobambae*,. La reacción muestra una señal que se localiza en una parte del hemisferio vegetal, y se ubica ligeramente en el hemisferio animal. En la bisección del oocito hibridizado con sonda sentido no se observó reacción y hubo daño del tejido (imagen no mostrada).

6. DISCUSIÓN

6.1. EXTRACCIÓN DE ARN, SÍNTESIS DE ADNc Y AMPLIFICACIÓN DE *L8* Y *VegT*

Uno de los componentes más abundantes de los oocitos son las plaquetas de yema y estas a su vez tienen un alto contenido de lípidos (Buschiazzo *et al.*, 2003). Estos lípidos pueden intervenir en la pureza de extracción de ARN (TRIzol® Reagent Invitrogen™ Información del producto), por lo que fue necesario centrifugar el lisado y tomar la fase acuosa para seguir con el procedimiento.

En la visualización del ARN de todas las especies mediante el gel de agarosa, se encontraron 2 bandas correspondientes a ARN ribosomal y una a ARN de transferencia. Entre las bandas ribosomales se encuentran los ARNs mensajeros del oocito, sin embargo no es posible visualizarlos debido a su poca concentración. La presencia de estas bandas nos da una pauta del buen estado del ARN extraído y de su óptima aplicación molecular.

Posterior a la extracción de ARN y síntesis ADNc, se realizó amplificaciones mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR). A la par de la amplificación de *VegT*, se amplificó el gen *L8* el cual fue utilizado como control positivo ya que al ser un gen “housekeeping” su presencia está garantizada en el oocito. Los genes “housekeeping” se expresan en varios tipos celulares y son necesarios para mantener una fisiología celular normal (Butte *et al.*, 2001). Existe una alta conservación en su secuencia por lo que es posible utilizar los mismos iniciadores para todas las especies en estudio (Pérez, 2008). La amplificación de *L8* nos indica que el procedimiento de extracción de ARN y la reacción en cadena de la polimerasa se llevó a cabo de manera adecuada, además demuestra que la cantidad de reactivos fue similar en todas las muestras. En el gel de agarosa de las figuras 3

y 4, *L8* se encuentra representado por una banda a la altura del marcador de 500 pb debido a que su amplificación corresponde a 428pb.

La amplificación de *VegT* se realizó mediante iniciadores previamente diseñados, “*A. spurelli* Exact F1” que se basó en la secuencia T-box de *VegT* de *Agalychnis spurelli* (Dután, 2010), y “*VegT* Exact Reverse N” que se basó en una secuencia altamente conservada en anuros, esta secuencia se caracteriza por presentar 17 nucleótidos y estar cercana al terminal 3 prima del marco de lectura abierta (ORF), esta secuencia ha sido descrita anteriormente, encontrándose presente en *VegT* y sus ortólogos (Pérez *et al.*, 2007). Se cree los 17 nucleótidos tienen una función estructural relacionada al mantenimiento de las redes de citoqueratina, o una función como sitio objetivo de micro ARNs para la regulación de la traducción de estos genes (Pérez *et al.*, 2007).

Por lo tanto el uso de estos iniciadores asegura que los amplicones resultantes de las especies en estudio sean genes ortólogos de *VegT*, mas no correspondan a otros genes de la familia T-box. De todas maneras sería importante secuenciar dichos amplificados para confirmar que se trata del ARN mensajero *VegT*.

La amplificación de *VegT* se observó en los geles de las figuras 3 y 4, a una altura de 1000 pb del marcador molecular, esto debido a que el fragmento constituye 1135 pb (Dután, 2010).

La amplificación de *VegT* de los hemisferios animal y vegetal del oocito de *X. laevis* confirmó su localización únicamente en el polo vegetal, resultado que se conoce por estudios anteriores en los que además describen al cortex vegetal como una región rica en componentes de citoesqueleto y ARNs localizados, que logran polarizar la información genética en el oocito (Zhang y King, 1996). En el caso de *E. machalilla* y *R. marina* se observaron los mismos resultados, que indican una localización vegetal del mensaje materno *VegT*.

Por el contrario, en *G. riobambae* la amplificación demuestra la presencia de *VegT* tanto en el hemisferio animal como vegetal (Figuras 3 y 4).

6.2. TRANSFORMACIÓN DE BACTERIAS, SÍNTESIS DE LA SONDA E

HIBRIDIZACIÓN *IN SITU*

Fue de suma importancia que la secuencia *VegT* utilizada en esta investigación haya estado insertada en un vector ya que de esta manera se puede proceder a la clonación de manera eficiente. Además es de gran utilidad para la síntesis de la sonda, debido a que el vector P-GEM presta su sitio múltiple de clonación para el uso deseado de enzimas de restricción y también posee secuencias aptas para la unión de iniciadores SP6 y T7, necesarios para determinar el sentido de la sonda.

Dentro del procedimiento de clonación se observaron placas petri con proliferación de colonias blancas, esto sucedió debido a que la muestra inicial correspondía a un miniprep el cual ya había atravesado varios procedimientos de selección que aseguraron que la secuencia del mensajero se encontraba correctamente insertada en el vector.

Durante la síntesis de la sonda, las enzimas *Sall* y *ApaI* linearizaron el plásmido y dieron origen a secuencias que contenían diferentes sitios de unión a iniciadores, garantizando la correcta síntesis de la sonda sentido y antisentido respectivamente. Estas linearizaciones se observaron en el gel como moléculas de alto peso molecular (Figura 7), esto debido a que la estructura circular abierta tiene mayor dificultad para migrar por los poros del gel de agarosa (Meyers *et al.*, 1976). En contraste, en el gel donde se visualiza las sondas hidrolizadas se distingue un barrido con bajo peso molecular (Figura 8), esto es consecuencia de la migración de pedazos de la sonda con pocas pares de bases.

En las hibridizaciones de embriones de *E. machalilla* (Figura 11) se pudo constatar una señal positiva con la aplicación de la sonda antisentido, señal que se localiza alrededor

del blastoporo, es decir el lugar del mesodermo prospectivo. Esta localización es coherente con los resultados encontrados en investigaciones previas (Pérez, 2008) y además coincide con la localización de otro marcador del mesodermo perteneciente a la familia de genes T-box, Xbra, que tiene una localización superficial alrededor del blastoporo durante el estadio 12 del embrión de *E. machalilla* (Benítez y del Pino, 2003).

En el caso de la hibridización con sonda sentido en el embrión de *E. machalilla*, la reacción fue negativa ya que la sonda no es complementaria al gen en estudio.

Estos resultados se toman como un control positivo de la técnica, ya que indican que los equipos, las soluciones, los tiempos y las temperaturas del protocolo funcionan y que además fueron aplicados de manera correcta, lo que da soporte a las reacciones obtenidas en las hibridizaciones de los oocitos de *G. riobambae*.

Se repitieron las hibridizaciones en oocitos de *G. riobambae* con la finalidad de estandarizar el procedimiento y encontrar la mejor forma de distinguir la señal del mensajero. Los oocitos presentaron mucha dificultad al momento de ser manejados ya que son muy frágiles y fácilmente quebrantables.

En las dos primeras filas de la figura 12 se muestra el oocito al que se aplicó la sonda en montaje entero y luego fue biseccionado, se observa una señal en el cortex vegetal vista desde la parte interna de la bisección, mientras que en la parte externa se observó una señal tanto en el cortex vegetal como animal. Esto pudo deberse a que la cantidad de yema encontrada en el citoplasma y las características de las membranas que cubren al oocito, no permiten la adecuada penetración de la sonda, por lo que la hibridización no es posible en el citoplasma o cortex interno del oocito.

En otra repetición de las filas 3 y 4 (Figura 12) se observa una señal tanto en el cortex vegetal como animal, la señal es bastante tenue. Se asume que esto fue consecuencia

de una mala calidad de la sonda, tal vez por contaminación o por degradación causada por un prolongado tiempo de almacenamiento.

El siguiente procedimiento de hibridización de las filas 5 y 6 tuvo como resultado bisecciones resquebrajadas, debido posiblemente a una rápida deshidratación de los tejidos al momento de los baños con las soluciones del protocolo. Al observar los resultados de esta hibridización con la sonda antisentido en las bisecciones de oocitos de *G. riobambae*, se pudo distinguir una señal ubicada en el cortex vegetal de la parte externa de la bisección, mientras que en la parte interna se observó una señal tenue en el citoplasma animal y cortex del mismo hemisferio. Esta señal coincide con algunas de las repeticiones.

En la fila 7 se observa únicamente una bisección hibridizada con sonda antisentido, donde se observa la misma señal que se indicó en casos anteriores. La bisección que fue hibridizada con la sonda sentido sufrió daños que resultaron en varios pedazos y en ninguno de ellos se observó una reacción de color. Debido al mal estado de esta bisección, no se la incluyó en la figura.

La localización que se observa en la mayoría de hibridizaciones coincide con los datos que aportó la amplificación de *VegT* en los hemisferios animal y vegetal de los oocitos de *G. riobambae*.

La coloración observada, en los oocitos tratados con sonda sentido de la figura 12, es un artefacto dado por la exposición a BM purpura, sin embargo este tinte es fácilmente diferenciable de la verdadera señal de localización.

La localización de *VegT* en el cortex vegetal es una condición conocida ya que en el anuro modelo *X. laevis*, los ARNs que patronan el embrión se localizan en esta zona (Nath y Elinson, 2007), la localización de *VegT* en el polo animal también es conocida cuando nos referimos a *Eleutherodactylus coqui* (Beckham *et al.*, 2003), sin embargo la presencia

del mensajero tanto en el hemisferio vegetal como animal del oocito, es una característica que no se ha descrito en otros anuros.

La localización de *VegT* en el polo animal podría verse desplazada por arreglos del citoesqueleto al momento de la maduración y por la rotación cortical al momento de la fertilización (Gilbert, 2003) para de esta manera ubicar el mensaje materno en el sitio correspondiente a desarrollar patrones meso-endodermales.

Por otro lado, en las hibridaciones con sonda sentido, no se observó señal alguna debido a que la sonda no se unió a secuencias complementarias, no se formó el complejo DIG-ANTIDIG y por lo tanto no dio el sustrato necesario para la reacción con BM púrpura.

6.3. ANÁLISIS ESPACIAL DEL ARN MENSAJERO *VegT* EN OOCITOS DE *Gastrotheca riobambae* Y OTRAS ESPECIES DE ANUROS

El suplemento de una gran cantidad de yema es una condición derivada y es un factor que determina el tamaño de los oocitos (Ninomiya *et al.*, 2001). Como es el caso de *E. coqui*, que se caracteriza por poseer oocitos de aproximadamente 3.5 mm. La abundante reserva de yema de estos oocitos es necesaria para eliminar el estado larvario de renacuajo de su ontogenia y proveer de los nutrientes necesarios para que alcance a desarrollarse directamente como una rana juvenil (Beckham *et al.*, 2003). El tamaño de los oocitos de *G. riobambae* es de 3 mm (del Pino *et al.*, 1986) y abundantes depósitos de yema (del Pino, 1989) razón por la cual se podría considerar similar al caso anterior, sin embargo *G. riobambae* no presenta desarrollo directo, por ello las reservas de yema son utilizadas durante la incubación de los embriones dentro de la bolsa de la madre y en el desarrollo de los renacuajos eclosionados (del Pino, 1989). En consecuencia la cantidad de yema en este

caso no elimina la etapa larvaria, si no que permite la eclosión de renacuajos más grandes y desarrollados (Elinson y del Pino, 2003).

En los oocitos de *E. coqui*, la gran cantidad de yema ha desplazado los eventos de la embriogénesis y por lo tanto algunos ARNs hacia el polo animal (Beckham *et al.*, 2003). Sin embargo el incremento de yema no es necesariamente una causa para este suceso, ya que en *G. riobambae* los eventos de la embriogénesis ocurren cerca del polo vegetal (Ninomiya *et al.*, 2001) lo que sugiere que varios ARNs no han sido desplazados. Esto concuerda con los resultados obtenidos en la hibridización, en los que el ARN mensajero *VegT* se encuentra ubicado en el cortex vegetal.

Pese a que los oocitos de gran tamaño, como el de *G. riobambae*, tienen grandes cantidades de yema, no se conoce si estos oocitos también contienen grandes cantidades de ARNs mensajeros y proteínas. Sin embargo el efecto de dilución de los huevos de gran tamaño podría reducir las cantidades de éstas moléculas. Para sobrellevar este problema Elinson y Beckham (2002) proponen la localización de determinantes maternos y su posible desplazamiento fuera del polo vegetal (Elinson y del Pino, 2003). Esto puede justificar la presencia de *VegT* en el polo animal, presencia que también es soportada por investigaciones previas que indican que en el estadio embrionario 5 de *G. riobambae* existe presencia del mensajero *VegT* en los blastómeros animales (Pérez, 2008).

VegT se encuentra en el citoplasma animal de *G. riobambae*, sin embargo se asume que no podría permanecer allí ya que los eventos de la embriogénesis, en especial la formación del organizador donde interviene *VegT* y β -catenina, son llevados a cabo subecuatorialmente (Del Pino *et al.*, 2004). Es por ello que se podría asumir que el ARN mensajero *VegT* se encuentra momentáneamente en el polo animal atravesando un proceso de translocación hacia el polo vegetal, esto probablemente también se encuentre relacionado con la tasa lenta de desarrollo que caracteriza a *G. riobambae*.

Durante la ovogénesis de *G. riobambae*, el oocito acumula algunos tipos de ARNs y proteínas que se requieren para el desarrollo embrionario. Consecuentemente las modificaciones que ocurren durante la ovogénesis pueden relacionarse con cambios en los patrones y en el tiempo en los que estos suceden durante el desarrollo temprano (del Pino *et al.*, 1986).

El reducido tamaño de los oocitos de *X. laevis*, *E. machalilla* y *R. marina* nos podría indicar que la reserva de yema de estas tres especies no es tan abundante, se conoce además que todos atraviesan el estado larvario de renacuajo y que la tasa de desarrollo (*X. laevis* y *E. machalilla*) es más rápida que la de *E. coqui* o *G. riobambae* (Del Pino *et al.*, 2004; Elinson y Del Pino, 2003). Se hipotetiza que *VegT* se localiza vegetalmente debido a todos estos factores, lo que se corrobora con los resultados obtenidos en la amplificación.

La localización y expresión maternal de *VegT* es gran importancia en el desarrollo, ya que permite la activación transcripcional de genes blanco involucrados en la especificación del endodermo y en la producción de señales inductoras de mesodermo (Casey *et al.*, 1999). Por ello se cree que la especificación de las capas germinales por ortólogos de *VegT* es un carácter basal en anuros y su actividad meso-endodermal se considera una sinapomorfía en los anfibios (Nath *et al.*, 2005).

En conclusión, las técnicas moleculares implementadas en esta investigación fueron de gran importancia para la detección espacial de *VegT* en los oocitos de *G. riobambae* y de las demás especies investigadas. Los resultados obtenidos con la técnica de hibridización *in situ* complementaron la información brindada por los métodos moleculares y la localización que ambas mostraron es congruente con los eventos posteriores de embriogénesis que presenta *G. riobambae*.

Las técnicas estandarizadas en esta investigación pueden utilizarse como base para estudios posteriores que ahonden en el tema y soporten los interesantes resultados que han sido encontrados en esta disertación, además sería importante continuar con la estandarización del procedimiento de hibridización *in situ* en cortes de oocitos con micrótomo, para así poder observar un patrón completo de localización y de esta manera aportar aún más al conocimiento de la biología del desarrollo de *G. riobambae* y de otros anuros ecuatorianos.

7. LITERATURA CITADA

- Agius, E., Oelgeschläger, M., Wessely, O., Kemp, C., De Robertis, E. M. 2000. Endodermal Nodal-related signals and mesoderm induction in *Xenopus*. *Development* 127: 1173-1183.
- Alarcón, V. B., Elinson, R. P. 2001. RNA anchoring in the vegetal cortex of the *Xenopus* Oocyte. *Journal of Cell Science* 114: 1731-1741.
- Arthur, P. K., Clauben, M., Koch, S., Tarbashevich, K., Jahn, O., Pieler, T. 2009. Participation of *Xenopus* ELR-type proteins in vegetal mRNA localization during oogenesis. *The Journal of Biological Chemistry* 284: 19982-19992.
- Beckham, Y., Nath, K., 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 – 371.
- Benítez, M. S. y Del Pino, E. M. 2003. La expresión de Brachyury en ranas con modos divergentes de desarrollo. *Revista de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador*. No.71: 7-14
- Buschiazzo, J., Bruzzone, A., Alonso, T. S. 2003. Detailed lipid analysis of yolk platelets of amphibian (*Bufo arenarum*) oocytes. *Journal of Experimental Zoology, Comparative Experimental Biology*. 297A: 189–195.

- Butte, A.J., Dzau, V. J., Glueck, S. B. 2001. Further defining housekeeping, or “maintenance” genes, focus on a compendium of gene expression in normal human tissues. *Physiology Genomics* 7: 95-96.
- Casey, E. S., Tada, M., Fairclough, L., Wylie, C. C., Heasman, J., Smith, J. C. 1999. *Bix4* is activated directly by *VegT* and mediates endoderm formation in *Xenopus* development. *Development* 126: 4193-4200.
- Clauben, M. N., Horvay, K., Pieler, T., 2004. Evidence for overlapping, but not identical, protein machineries operating in vegetal RNA localization along early and late pathways in *Xenopus* oocytes. *Development* 131: 4263-4273.
- Clements, D., Friday, R. V., Woodland, H. R. 1999. Mode of action of VegT in mesoderm and endoderm formation. *Development* 126: 4903-4911.
- Clements, D., Woodland, H. R. 2003. VegT induces endoderm by a self-limiting mechanism and by changing the competence of cells to respond to TGF- β signals. *Developmental Biology* 258: 454–463.
- Coloma, L. A. y Quiguango-Ubillús, A. 2007. QCAZ Amphibiaweb Ecuador. *Gastrotheca riobambae*. <<http://www.puce.edu.ec/zoologia/vertebrados/amphibiawebec/especies/anura/amphignathodontidae/riobambae>>. Consultado en Enero de 2010.
- Coloma, L. A., Quiguango-Ubillús, A. y Félix-Novoa, C. 2007. QCAZ Amphibiaweb Ecuador. *Rhinella marina*. <<http://www.puce.edu.ec/zoologia/vertebrados/>

amphiawebec/especies/anura/bufonidae/marinus/index.html>. Consultado en Junio de 2011.

Coloma, L. A., Ron, S., Jungfer, K. 2004. *Gastrotheca riobambae*. En: IUCN 2009. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2009.2. <www.iucnredlist.org>. Consultado en Enero de 2010.

Conlon, F. L., Fairclough, L., Price, B. M. J., Casey, E. S., Smith, J. C. 2001. Determinants of T box protein specificity. *Development* 128: 3749-3758.

del Pino, E. M. 1989. Modifications of oogenesis and development in marsupial frogs. *Development* 107: 169-187.

del Pino, E. M., Ávila, M. E., Pérez, O. D. Benítez, M. S., Alarcón, I., Noboa, V., Moya, I. 2004. Development of the dendrobatid frog *Colostethus machalilla*. *International Journal of Developmental Biology* 48: 663-670.

del Pino, E. M. y Elinson, R. P. 2003. The organizer in amphibians with large eggs: Problems and perspectives. En: *The Vertebrate Organizer*, (H. Grunz, eds) pp. 359-374. Springer Verlag. Berlín, Alemania.

del Pino, E.M., Escobar, B. 1981. Embryonic stages of *Gastrotheca riobambae* (Fowler) during maternal incubation and comparison of development with that of other egg-brooding hylid frogs. *International Journal Morphology* 167: 227-295.

- del Pino, E. M., Steinbeisser, H., Hofmann, A., Dreyer, C., Campos, M., Trendelenburg, M. F. 1986. Oogenesis in the egg-brooding frog *Gastrotheca riobambae* produces large oocytes with fewer nucleoli and low RNA content in comparison to *Xenopus laevis*. *Differentiation* 32: 2633.
- del Pino, E. M., Venegas, M., Romero, A., Montenegro, P., Sáenz, N., Moya I. M., Alarcón, I., Sudou, N., Yamamoto, S., Taira, M. 2007. A comparative analysis of frog early development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 29: 11882-11888.
- Desnitskiy, A. G. 2004. Evolutionary Transformations of Ontogenesis in Anuran Amphibians. *Russian Journal of Developmental Biology* 35, 3: 125–130.
- Du, T., Schmid, M., Jansen, R. P. 2007. Why cells move messages: The biological functions of mRNA localization. *Cell and Developmental Biology* 18: 171–177.
- Dután, L. 2010. Identificación del ARN mensajero VegT en oocitos de *Agalychnis spurelli*. Tesis de Licenciatura en Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador.
- Elinson, R. P. y Beckham, Y. 2002. Development in frogs with large eggs and the origin of amniotes. *Zoology* 105: 1-12.
- Elinson, R. P. y del Pino, E. M. 1985. Cleavage and gastrulation in the egg-brooding,

marsupial frog, *Gastrotheca riobambae*. *Journal of Embryology and experimental Morphology* 90: 223-232.

Fletcher, R. B., Harland, R. M. 2008. The Role of FGF Signaling in the Establishment and Maintenance of Mesodermal Gene Expression in *Xenopus*. *Developmental Dynamics* 237:1243–1254.

Frost, Darrel R. 2011. American Museum of Natural History, New York, USA. Amphibian Species of the World: an Online Reference. Version 5.5 <<http://research.amnh.org/vz/herpetology/amphibia>> Consultado en Febrero de 2011.

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

Gilbert, S. F. 2003. *Developmental Biology*. Seventh edition. Sinauer Associates Inc. United States of America.

Gurdon, J. B. 1976. Injected nuclei in frog oocytes: fate, enlargement, and chromatin dispersal. *Journal of Embryology and experimental Morphology* 36, 3: 523-540.

- Havin, L., Git, A., Elisha, Z., Oberman, F., Yaniv, K., Schwartz, S. P., Standart, N., Yisraeli, J. K., 2009. RNA-binding protein conserved in both microtubule- and microfilament-based RNA localization. *Genes and Development* 12: 1593-1598.
- Heasman, J., Wessely, O., Langland, R., Craig, E. J., Kessler, D. S. 2001. Vegetal Localization of Maternal mRNAs is Disrupted by VegT Depletion. *Developmental Biology* 240: 377–386.
- Heasman, J., 2006. Patterning the early *Xenopus* embryo. *Development* 133: 1205-1217.
- Horb, M., y Thomsen, G. 1997. A vegetally localized T-box transcription factor in *Xenopus* eggs specifies mesoderm and endoderm and is essential for embryonic mesoderm formation. *Development* 124: 1689–1698.
- Kavka, A. L. Green, J. B. 2000. Evidence for Dual Mechanisms of Mesoderm Establishment in *Xenopus* Embryos. *Developmental Dynamics* 219: 77–83.
- Kloc, M., Bilinski, S., Dougherty, M. T. 2007. Organization of Cytokeratin Cytoskeleton and Germ Plasm in the Vegetal Cortex of *Xenopus Laevis* Oocytes Depends on Coding and Non-Coding RNAs: Three-Dimensional and Ultrastructural Analysis. *National Institutes of Health* 313: 1639–1651.
- Kloc, M., Etkin, L. D., 2005. RNA localization mechanisms in oocytes. *Journal of Cell Science* 118: 269-282.

- Kloc, M., Zearfoss, N. R., Etkin, L. D. 2002. Mechanisms of Subcellular mRNA Localization. *Cell* 108: 533–544.
- Kofron, M., Demel, T., Xanthos, J., Lohr, J., Sun, B., Sive, H., Osada, S., Wright, C., Wylie, C., Heasman, J. 1999. Mesoderm induction in *Xenopus* is a zygotic event regulated by maternal VegT via TGF β growth factors. *Development* 126: 5759-5770.
- Knezevic, V., De Santo, R., Mackem, S. 1997. Two novel chick T-box genes related to mouse *Brachyury* are expressed in different, non-overlapping mesodermal domains during gastrulation. *Development* 124: 411–419.
- Kress, T. L., Yoon, Y. J., Mowry, K. M., 2004. Nuclear RNP complex assembly initiates cytoplasmic RNA localization. *The journal of cell biology* 165: 1-9.
- Lardelli, M. 2003. The evolutionary relationships of zebrafish genes *tbx6*, *tbx16/spadetail*, and *mga*. *Development, Genes and Evolution* 213:519–522.
- Lustig, K.D., Kroll, K.L., Sun, E., Kirschner, M.W. 1996. Expression cloning of a *Xenopus* T-related gene (*Xombi*) involved in mesodermal patterning and blastopore lip formation. *Development* 122: 4001–4012.
- Meyers, J., Sánchez, D., Elwell, L. P., Flakow, S. 1976. Simple Agarose Gel Electrophoretic Method for the Identification and Characterization of Plasmid Deoxyribonucleic Acid. *Journal of Bacteriology* 1529-1537.

- Minguillon, C., Logan, M. 2003. The comparative genomics of T-box genes. *Briefings In Functional Genomics And Proteomics* 2, 3: 224–233.
- Mowry, K. L., Cote, C. A., 1999. RNA sorting in *Xenopus* oocytes and embryos. The Federation of American Societies for Experimental Biology publishes *Journal* 13: 435–445.
- Nath, K., Boorech, J. I., Beckham, Y., Burns, M. M., Elinson, R. P., 2005. Status of RNAs, Localized in *Xenopus laevis* Oocytes, in the Frogs *Rana pipiens* and *Eleutherodactylus coqui*. *Journal of Experimental Zoology* 304: 28–39.
- Nath, K., Elinson, R. P. 2007. RNA of *AmVegT*, the axolotl orthologue of the *Xenopus* meso-endodermal determinant, is not localized in the oocyte. *Gene Expression Patterns* 7: 197-201.
- Nickells, R., Cavey, M. J., Browder, L. W. 1988. The Effects of Heat Shock on the Morphology and Protein Synthesis of the Epidermis of *Xenopus laevis* Larvae. *The Journal of Cell Biology* 106: 905-914.
- Ninomiya, H., Zhang, Q., Elinson, R. P. 2001. Mesoderm Formation in *Eleutherodactylus coqui*: Body Patterning in a Frog with a Large Egg. *Developmental Biology* 236: 109–123.
- Pérez, O. 2008. El factor de transcripción VegT en el desarrollo temprano de las ranas ecuatorianas *Gastrotheca riobambae* y *Epipedobates machalilla*. Tesis de

Doctorado en Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Quito, Ecuador.

Pérez, O., Benítez, M. S., Nath, K., Haesman, J., del Pino, E. M., Elinson, P. R. 2007.

Comparative analysis of *Xenopus* VegT, the meso-endodermal determinant, identifies an unusual conserved sequence. *Differentiation*: 219-225.

Ryan, K., Garrett, N., Mitchell, A., Gurdon, J.B. 1996. *Eomesodermin*, a key early gene in *Xenopus* mesoderm differentiation. *Cell* 87, 6: 989-1000.

Sambrook, J., Russel, D. 2001. *Molecular cloning, a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York, Estados Unidos de Norte América.

Sive, H. L., Grainger, R. M., Harland, R. M. 2000. *Early development of Xenopus laevis, a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York. Estados Unidos de Norte América.

Smith, W. C. and Harland, R. M. 1991. Injected *Xwnt-8* RNA acts early in *Xenopus* embryos to promote formation of a vegetal dorsalizing center. *Cell* 67: 753-765.

Smith, J. 1997. *Brachyury* and the T-box genes. *Current Opinion in Genetics and Development* 7: 474-480.

Souopgui, J., Rust, B., Venhomwegen, J., Haesman, J., Henningfeld, K. A., Bellefroid, E., Pieler, T. 2008. The RNA-binding protein XSeb4R: a positive regulator of *VegT*

mRNA stability and translation that is required for germ layer formation in *Xenopus*. *Genes & Development* 22: 2347–2352.

Stennard, F., Carnac, G., Gurdon, J.B. 1996. The *Xenopus* Tbox gene *Antipodean* encodes a vegetally localized maternal mRNA that can trigger mesoderm formation. *Development* 122: 4179–4188.

Stennard, F. 1998. *Xenopus* differentiation: VegT gets specific. *Current Biology* 8: 928-930.

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

Vargas, D. 2010. Crecimiento de oocitos biderianos en machos adultos de *Rhinella marina* mediante el uso de hormonas y disruptores endocrinos. Tesis de licenciatura en Ciencias Biológicas. Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Quito, Ecuador.

White, R. J., Sun, B. I. Sive, H. L. Smith, J. C. 2002. Direct and indirect regulation of *derrière*, a *Xenopus* mesoderm-inducing factor, by VegT. *Development* 129: 4867-4876.

Wilusz, J. E., Sunwoo, H., Spector, D. L. 2009. Long noncoding RNAs: functional surprises from the RNA world. *Genes & Development* 23:1494–1504.

- Wilson, V. y Conlon, F. L., 2002. The T-box family. *Genome Biology* 3: 3008 - 3008.
- Wolpert, L., Jessel, T., Lawrence, P., Meyerowitz, E., Robertson, E., Smith, J. 2007. Principles of development. Oxford University Press NewYork, United States of America.
- Wright, K. M. y Whitaker, B. R. 2001. Amphibian Medicine and Captive Husbandry. Krieger Pub. Co. Malabar, Fla.
- Yisraeli, J. K., Sokol, S., Melton, D. A. 1990. A two-step model for the localization of maternal mRNA in *Xenopus* oocytes: involvement of microtubules and microfilaments in the translocation and anchoring of *Vg1* mRNA. *Development* 108, 2: 289-298.
- Zhang, J., Houston, D. W., King, M. L., Payne, C., Wylie, A., Heasman, J. 1998. The Role of Maternal VegT in Establishing the Primary Germ Layers in *Xenopus* Embryos. *Cell* 94: 515–524.
- Zhang, J., 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: 4119-4129.

9. FIGURAS

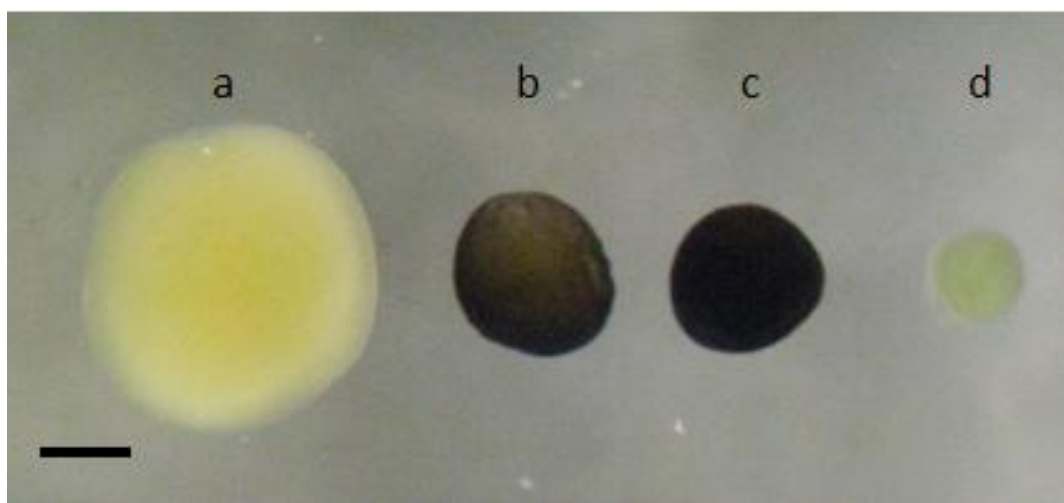


Figura 1. Tamaños de los oocitos de las especies investigadas. Se observa oocitos postvitelogénicos estadio 6 de las siguientes especies: (a) *G. riobambae*, (b) *E. machalilla*, (c) *R. marina* y (d) *X. laevis*. Tamaño de la barra 1mm.

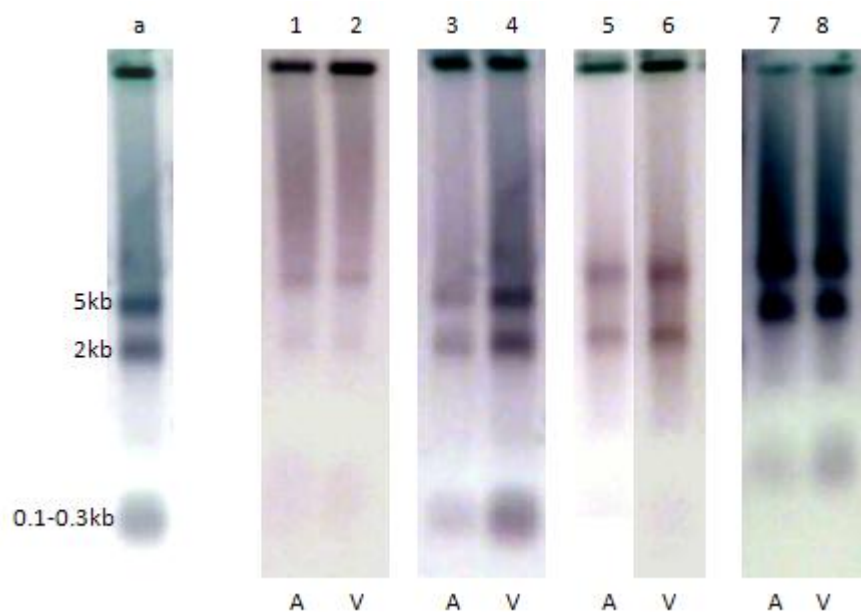


Figura 2. ARN total de oocitos. (a) esquema del ARN total con bandas de 5 y 2 kb correspondientes a ARN ribosomal y una banda de ARN de transferencia de 0.1-0.3 kb. Los carriles 1 y 2 representan el ARN total del polo animal (A) y vegetal (V) de los oocitos de *X. laevis*, los carriles 3 y 4 corresponden al ARN del polo animal (A) y vegetal (V) de *E. machalilla*, los carriles 5 y 6 pertenecen a la especie *G. riobambae*, y los carriles 7 y 8 a *R. marina*.

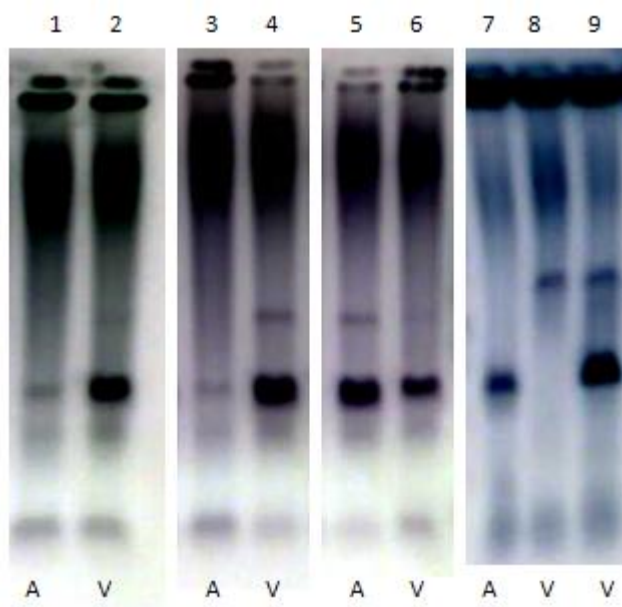


Figura 3. Amplificación a partir de ADNc de los polos animal y vegetal de las especies

X. laevis, *E. machalilla*, *G. riobambae* y *R. marina*. En el carril 1 se observa amplificación del gen *L8* con un tamaño de 428pb a partir del ADNc del hemisferio animal (A) de *X. laevis*. En el carril 2 se observa amplificación de *L8* y *VegT* a partir del hemisferio vegetal (V) del oocito de *X. laevis*, donde *VegT* presenta un tamaño de 1135 pb. Los mismos resultados se observan en los carriles 3 y 4 correspondientes a *E. machalilla*. En los carriles 5 y 6, pertenecientes a *G. riobambae*, se observan amplificaciones de *VegT* y *L8* en ambos hemisferios. Los carriles 7, 8 y 9 corresponden a *R. marina*, donde el 7 indica la amplificación de *L8* en el hemisferio animal (A), el carril 8 presenta la banda de amplificación de *VegT* y el carril 9 la banda de amplificación de *VegT* y *L8*.

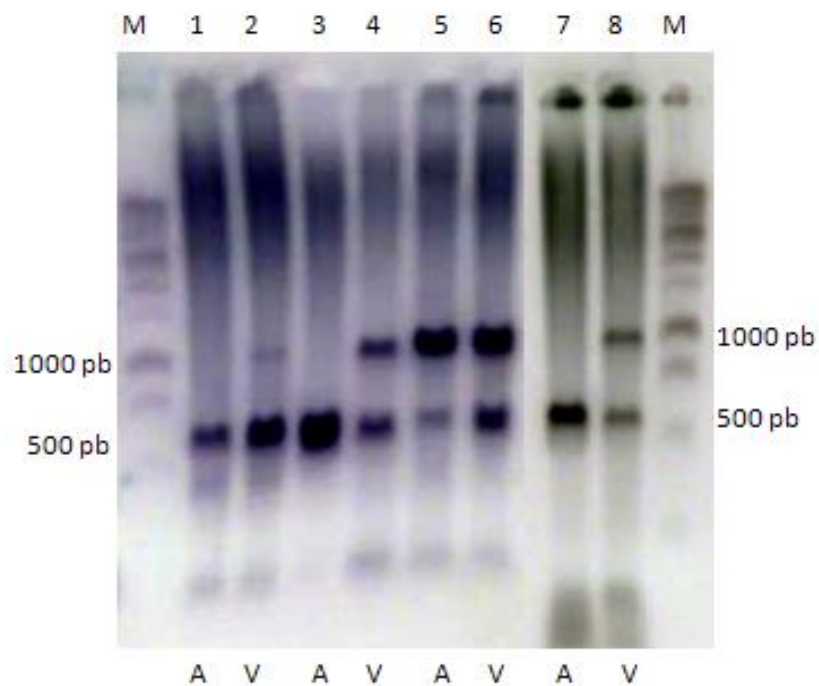


Figura 4. Amplificación de ADNc de los polos animal y vegetal de las especies *X.*

laevis, *E. machalilla*, *G. riobambae* y *R. marina*. La amplificación del gen L8 representa una banda de 428 pb y la de la secuencia parcial *VegT* 1135pb. Se observa en el gel 2 marcadores moleculares (M), el primer carril corresponde al polo animal (A) de *X. laevis*, el segundo al polo vegetal (V) de *X. laevis*, el tercero al polo animal (A) de *E. machalilla*, el cuarto al polo vegetal (V) de *E. machalilla*, el quinto al polo animal (A) de *G. riobambae*, el sexto al polo vegetal (V) de *G. riobambae*, el séptimo al polo animal (A) de *R. marina* y finalmente el octavo al polo vegetal (V) de *R. marina*. En el caso de *G. riobambae* se puede comprobar que la amplificación de *VegT* se da en los dos polos, algo que no ocurre en las demás especies.

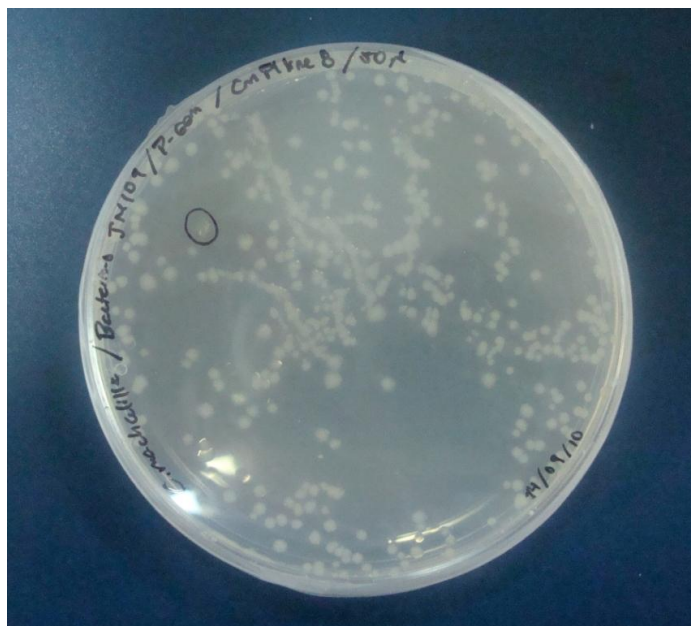


Figura 5. Crecimiento de colonias transformadas con *VegT* de *E. machalilla*. Colonias que reaccionaron positivamente ante los dos marcadores Ampicilina y X-gal.

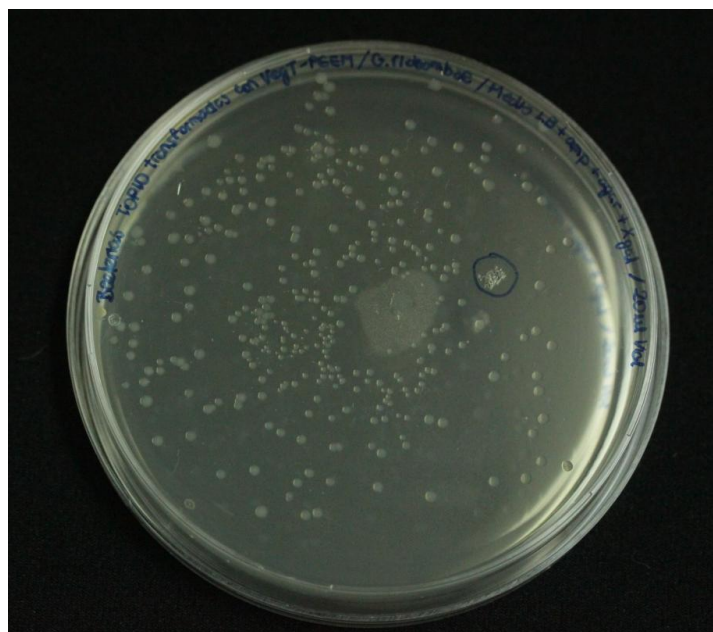


Figura 6. Crecimiento de colonias transformadas con *VegT* de *G. riobambae*. Colonias que reaccionaron positivamente ante los dos marcadores Ampicilina y X-gal.

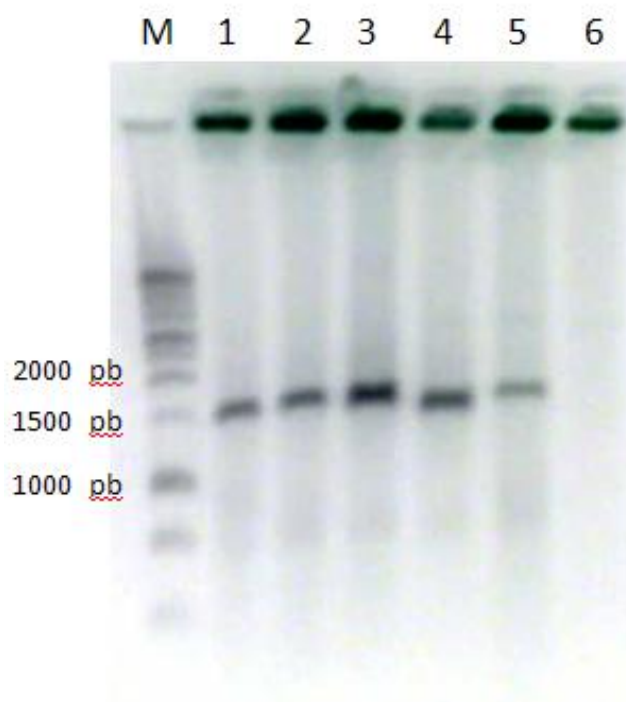


Figura 7. Amplicones de *VegT* de *G. riobambae* y *E. machalilla* a partir de colonias transformadas. El carril M se refiere al marcador molecular. Los carriles 1-3 corresponden a la amplificación de *VegT* de *G. riobambae*, y los carriles 4-6 representan la amplificación de *VegT* de *E. machalilla*. La colonia aplicada en el carril seis no amplificó el fragmento deseado. Las bandas observadas tienen un tamaño de 1500 pb aproximadamente.

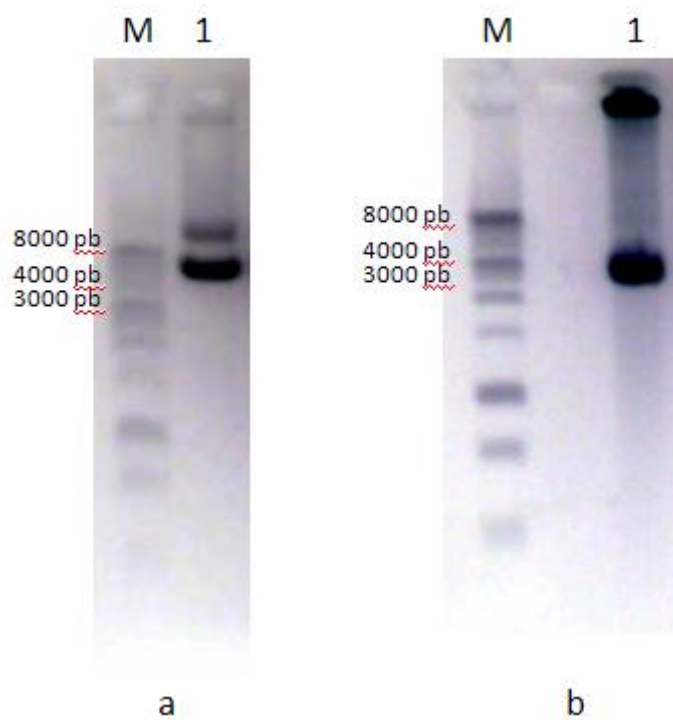


Figura 8. Corrida electroforética de los productos de Midiprep de *VegT*. Producto de midiprep de aproximadamente 4000 pb en los carriles 1 de las especies (a) *G. riobambae* y (b) *E. machalilla*. (M) Marcadores moleculares.

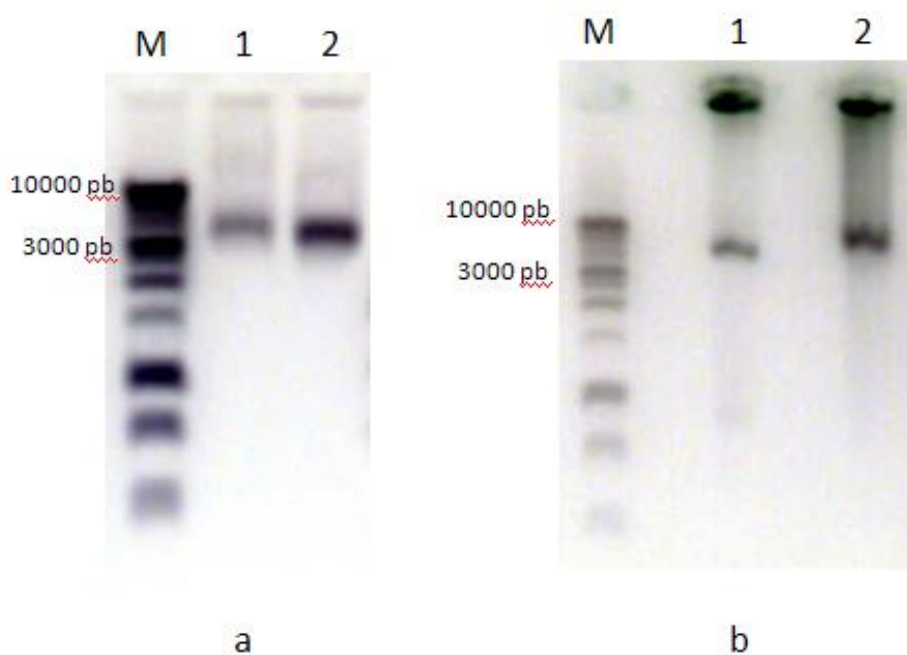


Figura 9. Productos de midiprep digeridos con enzimas de restricción para la síntesis de la sonda. (a) *G. riobambae* y (b) *E. machalilla*. (M) marcador molecular. Los carriles 1 muestran la linearización con la enzima de restricción *Sall* y los carriles 2 la linearización con la enzima *Apal*.

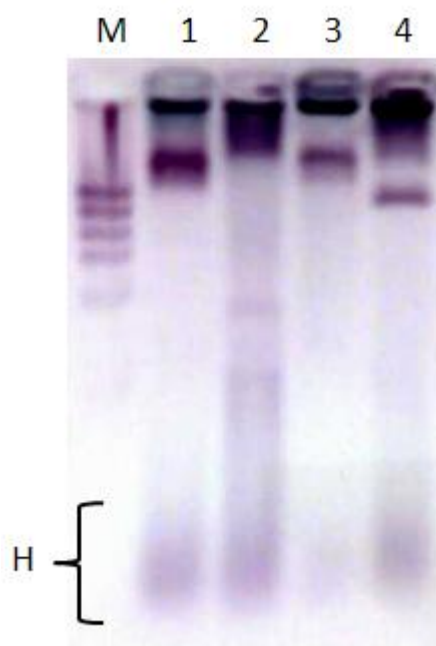


Figura 10. Hidrólisis de las sondas Sentido y Antisentido de *VegT* de *G. riobambae* y *E. machalilla*. (H) Hidrólisis representada por un barrido, formado por pequeños pedazos de la sonda. (M) marcador molecular. Carril 1, sonda hidrolizada sentido de *E. machalilla*. Carril 2, sonda hidrolizada antisentido de *E. machalilla*. Carril 3, sonda hidrolizada sentido de *G. riobambae*. Carril 4, sonda hidrolizada antisentido de *G. riobambae*.

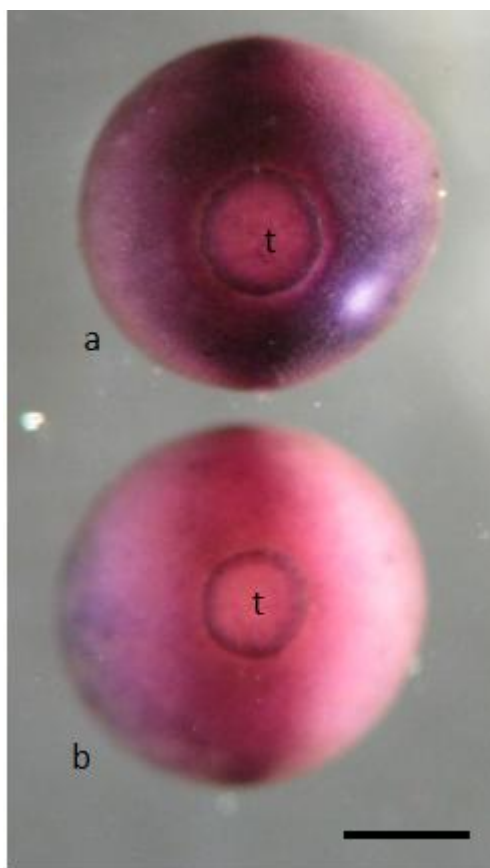


Figura 11. Hibridización *in situ* de *VegT* en embrión de *E. machalilla*. En (a) se observa el embrión tratado con sonda antisentido, cuya señal se dispersa alrededor del tapón de yema (t). En (b) se observa el embrión tratado con sonda sentido, donde no se distingue señal alguna.

Tamaño de la barra 1mm.

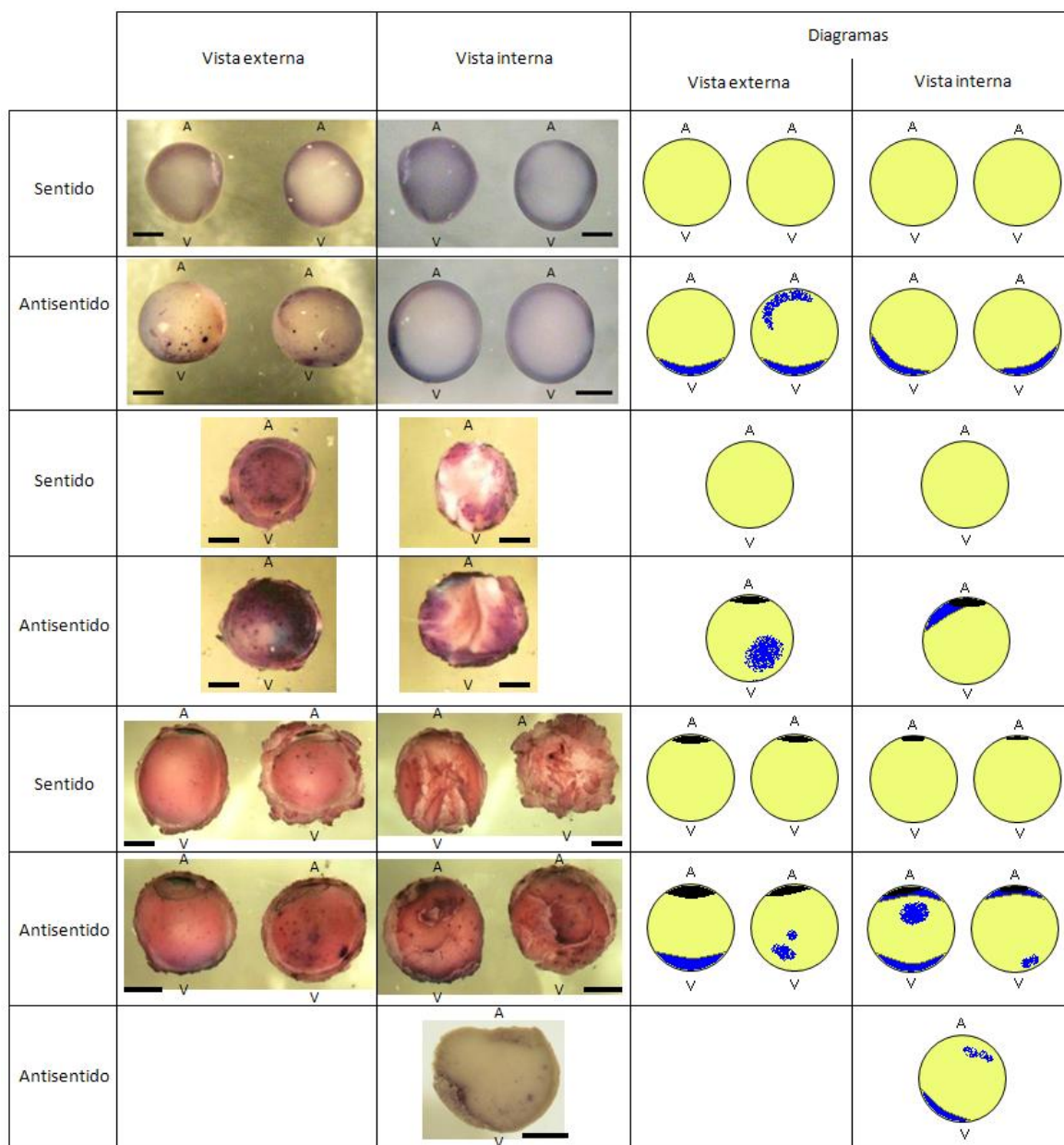


Figura 12. Hibridización *in situ* con sondas sentido y antisentido en bisecciones de oocito de *G. riobambae*. Se muestran todas las repeticiones de hibridización *in situ* ordenadas por sonda aplicada (sentido o antisentido) y punto de observación (vista interna o externa). Los diagramas indican el lugar y localización de la señal, el color negro indica el marcaje de la vesícula germinal y el color azul representa la señal de hibridización. Abreviaturas: A, animal y V, vegetal. Tamaño de las barras 1mm.

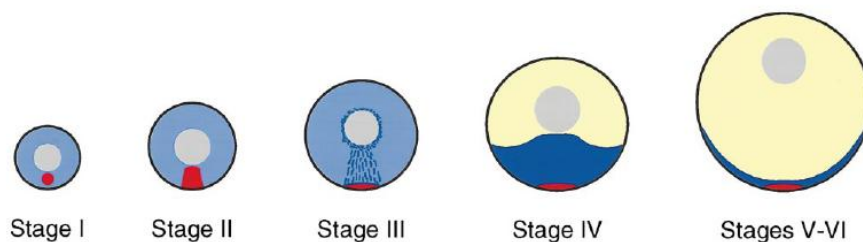
10. TABLAS

Tabla 1. Iniciadores utilizados en la investigación y sus secuencias nucleotídicas

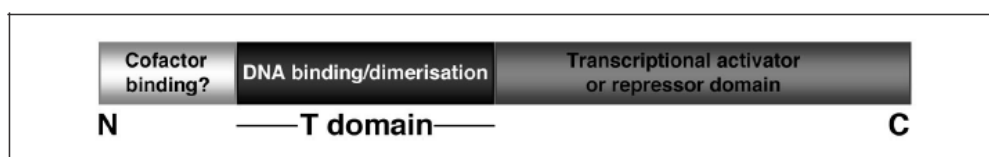
Iniciador	Secuencia
SP6	5' ATTTAGGTGACACTATAGAA 3'
T7	5' TAATACGACTCACTATAGGG 3'
L8F	5' GCTCCTCTTGCCAAGGTTGC 3'
L8R	5' CGTGGCCAGCAGTTCCTCTT 3'
<i>A. spurelli</i> VegT F1	5' GCACTCAATGCACAGATACA 3'
VegT Exact Reverse N	5' GCACTCAATGCACAGATACA 3'

11. ANEXOS

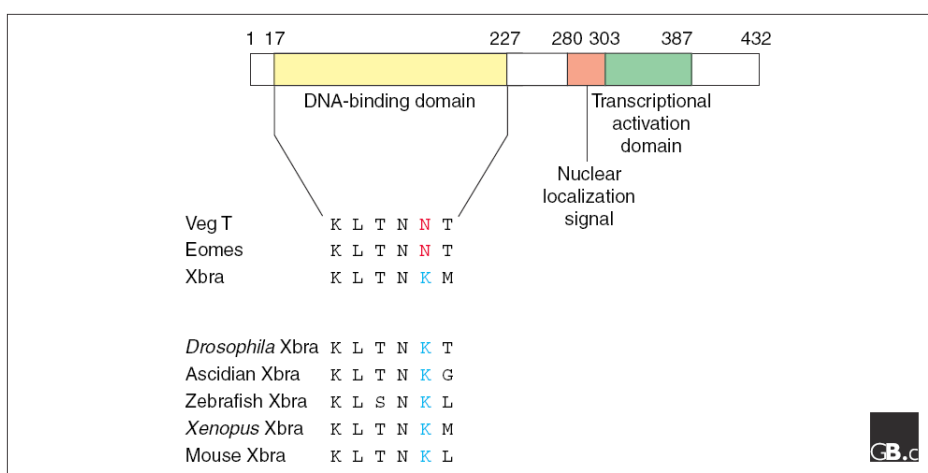
Anexo 1. Vías de localización de ARNs mensajeros al cortex vegetal en oocitos de *X. laevis*. La vía temprana está representada por el color rojo y la tardía por el azul (Mowry y Cote, 1999).



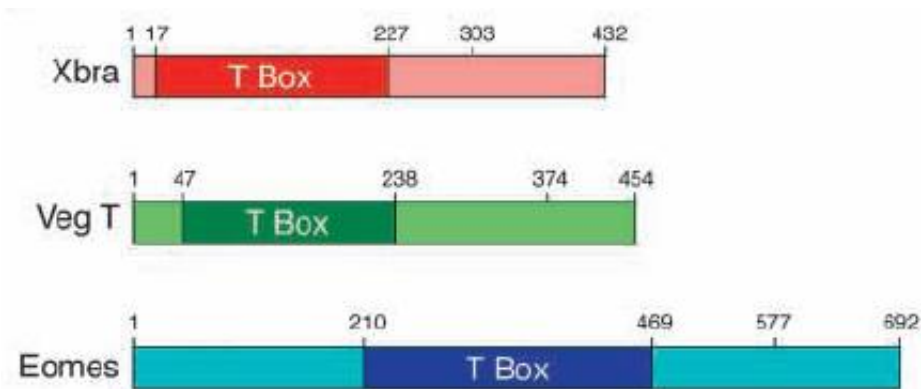
Anexo 2. Estructura general de las proteínas T-box (Minguillon y Logan, 2003).



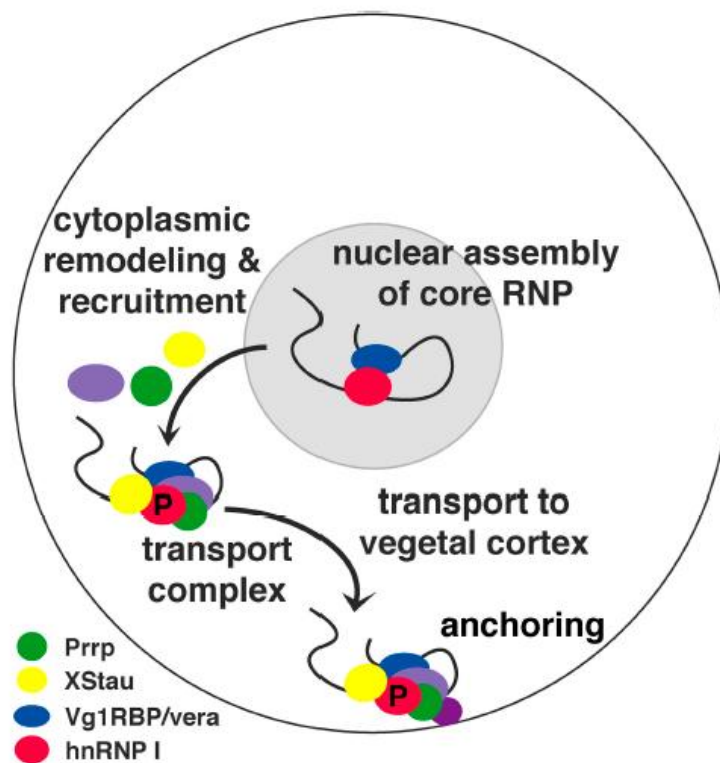
Anexo 3. Conservación de residuos específicos en la región T-box y su presencia en diferentes miembros de la familia (Wilson y Conlon, 2002).



Anexo 4. Estructuras de Xbra, VegT y Eomesodermin. Se diferencian tres segmentos en cada uno, el primero es el terminal N, el segundo corresponde a la región T-box y el tercero indica el terminal C (Conlon *et al.*, 2001).

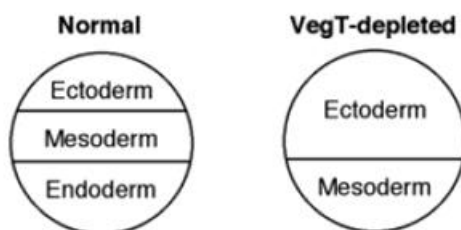


Anexo 5. Modelo de la vía de localización vegetal de ARN (Kress *et al.*, 2004).

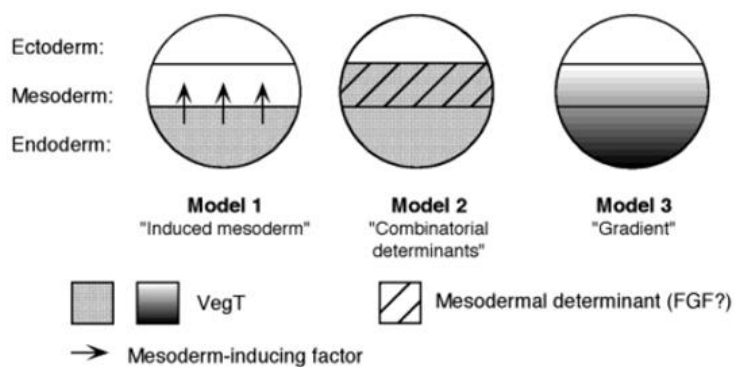


Anexo 6. A. Efecto de la delección del ARN mensajero materno que codifica a VegT

(Kavka y Green, 2000 en Casey *et al.*, 1999).

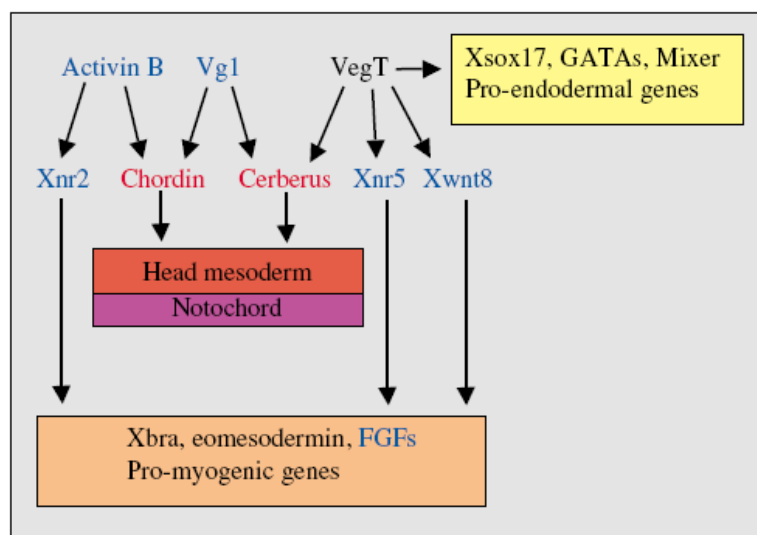


Anexo 7. Modelos del mecanismo de acción de VegT (Kavka y Green, 2000).

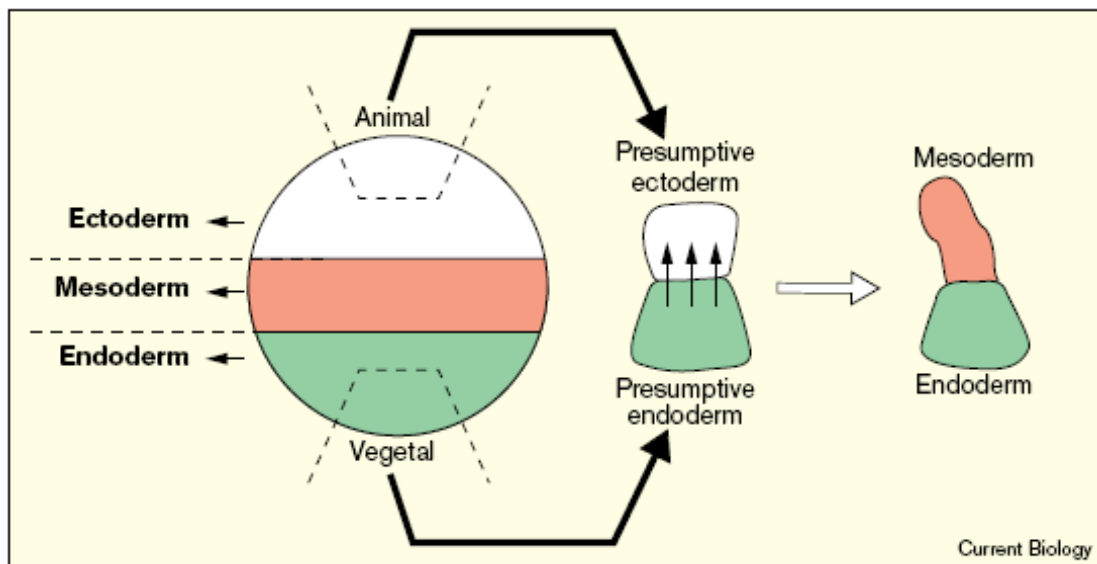


Anexo 8. Acción de VegT sobre genes tanto endodermiales como mesodermiales

(Heasman, 2006).



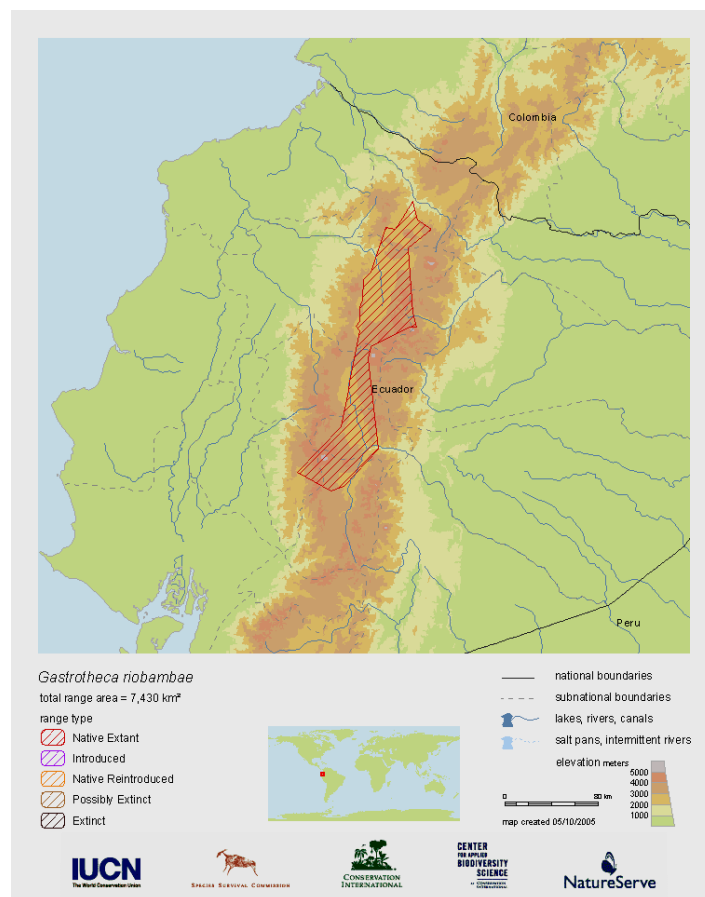
Anexo 9. Experimento de inducción mesodermal. Inducción del endodermo para formar mesodermo (Stennard, 1998).



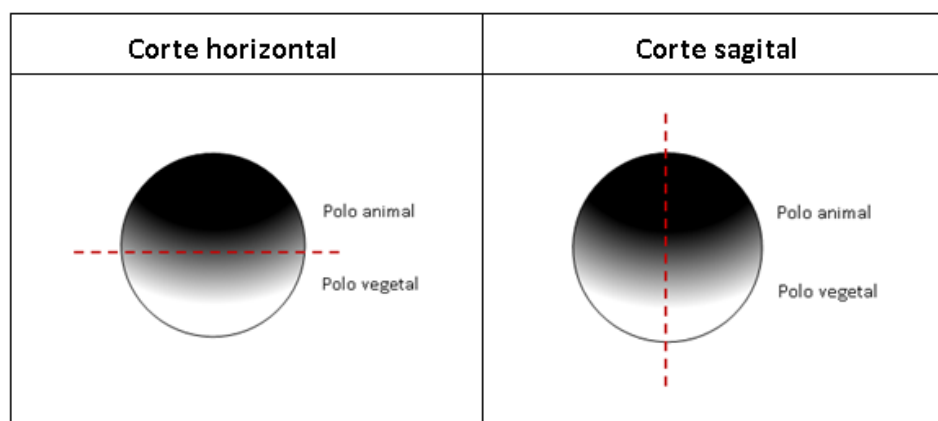
Anexo 10. *G. riobambae*, hembra adulta. Foto por: Joselyn Prado, 2010



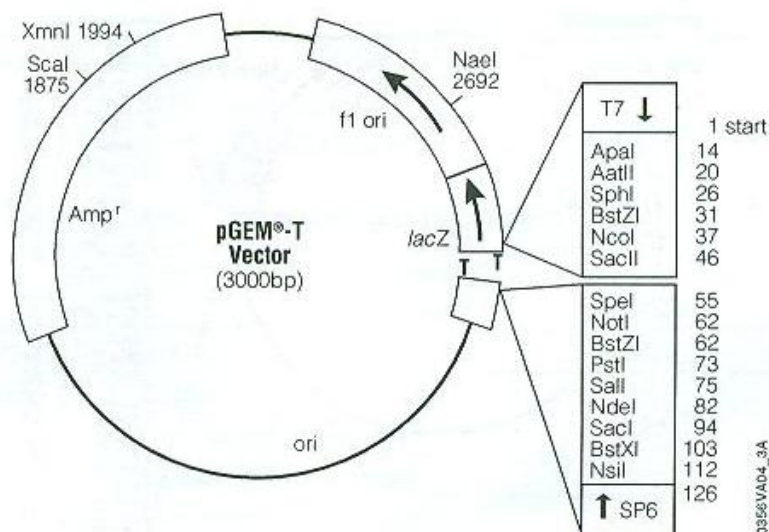
Anexo 11. Distribución de *G. riobambae* en el Ecuador (Coloma *et al.*, 2004 en UICN, 2009).



Anexo 12. Cortes de oocitos para posterior análisis de la ubicación espacial de *VegT*



Anexo 13. Mapa del vector pGEM-T Vector Systems PROMEGA.



Anexo 14. Secuencia del gen *VegT* Clon 813 *Gastrotheca riobambae*. Desde la secuencia del T-Box hasta los 17 nucleótidos conservados (marcados en gris). Extensión de 1096 nucleótidos (Pérez, 2008).

5'GGATGTTCCCACAATGTAAGATAAGACTATTTGGGCTGCATCCTTACACAAAATACG
 TGTTGCTGATGGACTTTACTCTTCAGGATAACTGCAGATACAAGTGAACAAGAATCA
 ATGGGAGGCTGCAGGAAAGTCAGAACCACAGCCACCATGCAGGACTTATATTCACCC
 CGACTCTCCAGCACCCGGTTCCTACTGGATGAAGGATGTAATCCGCTTTCATAAGTTA
 AAATAACCAACAACACACTGGACCAACGTGGTCATATCATCTTGCCTCAATGCACA
 AATATAAACCCAGGTTCCATGTCATCCAGTCCGATGATGCATGCAATATCGGCTGGGG
 GTTACCGCAGGTGTTTCAGCTTCCCAGAGACCGTGTTCACCGCAGTTACTGCTTACCAGA
 ATGAGAAGATCACAAAATTAATAAATTGACCACAATCCATTTGCCAGAGGATTTTCGGGA
 TCTGGATTTAAGCCCCAGAATGGTTAACTTTTTGAAACTTCTGCCACAAAGTTCAAGCA
 AACGTCTGAAAAAGTGGGAGGGCTGTCCTGAAGAAGAAGATGAAGATCACTGTAAAG
 TTGCACATGTAATGGAAGAGCATGAGGATGTTTCTACAGGTGTATACGCACAGTGGGT
 TCCAGATCAAGAAGGAAGTCAAACCTGATGCCCAACTCCCAGATTTGTCAGGATCT
 CCAAAGCAAGAACAACAGGTTCCCTTCATCTTCCCTCCAACATGTTACACAGAAATGCAG
 ACAAAGATATCTTCAACCACCTTCAGGGTCTTTGGATTCTGTGAAGCACAAAGGGAG
 ACGTCTTGACAAGATGTTGCAACAGTGCCAGATTTTGATGCTTTTCAATTACCCTCAT
 TCCGTTACCACACTCTGCACAGGATCACTCAAGCGTAATGAACATTCCCATTGAAAC
 ACCAATGAGACAGAGTCTGCGAGGACCCATGTATAACCCATATGGGGCAGAACAGTG
 GATGGTTCCCACACAAGGGCAGTATCGCCCCATGAGCTACTCTTATCCAACAGAATTT
 GGCACACAGGCGGGCTCGCCACCCACACAATAGTATGTCAGACTGGAGCCA3'

Anexo 15. Secuencia del gen *VegT* Clon CmPI *Epipedobates machalilla*. Contiene la secuencia conservada de 17 nucleótidos (marcada en gris). Extensión de 1108 nucleótidos (Pérez, 2008).

5'AGGGCTGACCTTATGAGACTTGTTCCACAAAGTCCAAACACACGCCAGAAAAGAAA
 GAAGTTGGAGAACAGTCCTGAAGAAGGAGATCATTGTAAAGTTGCACATTTGAAGGA
 AGAGCCTGTTGATGTTCCCTATGGGAGCATAACGCACAGTGGCTTCAAAATCCTGAAGGA
 AGCCAGAACCTGACCCCTAATTCCTCAGATTTGACAAGATCTCCAAGCCAGGAACAGC
 AGGTTCCCTCATCTTCCTCAAGCTTTTTATCCAGAAGTCCAAACAAAAGATATCTTCAG
 CCACTTCCAGGCTCTGTGGATTTCGCATGAAGCCCAAGGCAGACTTCTCACACCAGATG
 TTGCTACAGTGCCAGAGCCGGATGCTTTGCAGGTGCCTTCTTCCATTCACTGCAGCCT
 GCACAGGATCGCTCAAGCGTAATGAACCTTCCAATTGAAACACCAATGAGACAGAGTC
 TGCGAGGACCTATATACGGCCCATATGGGGCAGAACAGTGGATGGTGCCTTCACAAGG
 ACAGTATCGCCCCATGAGCTACCCCTACCCAACAGATCGAAGCGCACAGGGGGCAGT
 CACCCACCCACATAATGGC**ATGTCAGACTGGAGCC**AGTATTCTCTGTTTCCCTTTGCTT
 GCTGGTGAATTGGAGGAAGTATTGAACATGGACGGGACAAACATATTACATGACACA
 GCTATCTCATTTTTTTATTTTATTTTATTTAGAGGTGAATATAAGTGGCTAAAATAG
 ATATGGTTAAAAAATTGTTCTGGCATTAAAAACAATAATAATTTGGTACAAAGGAAGG
 ATCCCTTTTGTCTATTGTGTATATACTTACATTGTTTTGCTTTTGTAAACTAAAAT
 TAGGAAGTAAAAGTATTTCAACTCAATCAACAATATTACTGCTGTTGATTGGTGA
 AGTTTTACTTTCCAGTCTAATGATGGACTAAATACAAATGAAAGATGGCCTTAGACTG
 TGACTGGCACAAAGGATGGACTTCATGAAACGGATCATCTGCTGCACATACATTTTA
 AATAGCCTAAAGACATTTACCTCTCTACCCATCTTCAGTTTACAGCTTGCTGGAAGAG
 TGTA3'

TABLA DE CONTENIDOS

1. RESUMEN	1
2. ABSTRACT	2
3. INTRODUCCIÓN.....	3
3.1. GENERALIDADES DE LAS CAPAS GERMINALES EN ANFIBIOS.....	3
3.2. LOCALIZACIÓN DE ARNs MENSAJEROS.....	4
3.3. FAMILIA T-BOX.....	6
3.4. VegT	7
3.4.1. ISOFORMAS DE <i>VegT</i>	9
3.4.2. TRANSPORTE, LOCALIZACIÓN Y EXPRESIÓN DE <i>VegT</i>	10
3.4.3. FUNCIÓN DE <i>VegT</i>	11
3.5. CARACTERÍSTICAS Y BIOLOGÍA REPRODUCTIVA DE <i>Gastrotheca riobambae</i>	14
3.6 BIOLOGÍA REPRODUCTIVA DE <i>Xenopus laevis</i> , <i>Epipedobates machalilla</i> y <i>Rhinella marina</i>	16
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	19
4.1. MATERIAL BIOLÓGICO.....	19
4.2. MANTENIMIENTO EN CAUTIVERIO	19
4.3. EXTRACCIÓN DE OVARIOS	20
4.4. MANTENIMIENTO, MANIPULACIÓN Y SECCIONES DE OOCITOS	20
4.4.1. PROCEDIMIENTO PREVIO A LA EXTRACCIÓN DE ARN.....	21
4.4.2. FIJACIÓN Y TRATAMIENTO DE TEJIDOS PARA HIBRIDIZACIÓN <i>IN</i> <i>SITU</i>	21
4.5. EXTRACCIÓN DE ARN	22

4.6. SÍNTESIS DEL ADN COMPLEMENTARIO	22
4.7. AMPLIFICACIÓN MEDIANTE REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA	23
4.8. HIBRIDIZACIÓN <i>IN SITU</i>	24
4.8.1 TRANSFORMACIÓN Y CLONACIÓN	24
4.8.2. PRODUCTO DE MIDIPREP	26
4.8.3. SÍNTESIS DE LA SONDA	27
4.8.4. HIBRIDIZACIÓN.....	28
4.9. ELECTROFORESIS	29
5. RESULTADOS	35
5.1. EXTRACCIÓN DE OOCITOS.....	35
5.2. EXTRACCIÓN DE ARN Y SÍNTESIS DE ADN _c	35
5.3. AMPLICONES <i>L8</i> Y <i>VegT</i>	36
5.4. HIBRIDIZACIÓN <i>IN SITU</i>	37
5.4.1. PRODUCTOS DE CLONACIÓN Y MIDIPREP	37
5.4.2. SÍNTESIS DE LA SONDA	37
5.4.3. HIBRIDIZACIÓN <i>IN SITU</i>	38
6. DISCUSIÓN	40
6.1. EXTRACCIÓN DE ARN, SÍNTESIS DE ADN _c Y AMPLIFICACIÓN DE <i>L8</i> Y <i>VegT</i>	40
6.2. TRANSFORMACIÓN DE BACTERIAS, SÍNTESIS DE LA SONDA E HIBRIDIZACIÓN <i>IN SITU</i>	42
6.3. ANÁLISIS ESPACIAL DEL ARN MENSAJERO <i>VegT</i> EN OOCITOS DE <i>Gastrotheca riobambae</i> Y OTRAS ESPECIES DE ANUROS	45
7. LITERATURA CITADA	49

9. FIGURAS	60
10. TABLAS.....	71
11. ANEXOS	72

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1. Tamaños de los oocitos de las especies investigadas.....	60
Figura 2. ARN total de oocitos.....	61
Figura 3. Amplificación a partir de ADNc de los polos animal y vegetal de las especies <i>X. laevis</i> , <i>E. machalilla</i> , <i>G. riobambae</i> y <i>R. marina</i>	62
Figura 4. Amplificación de ADNc de los polos animal y vegetal de las especies <i>X.</i> <i>laevis</i> , <i>E. machalilla</i> , <i>G. riobambae</i> y <i>R. marina</i>	63
Figura 5. Crecimiento de colonias transformadas con <i>VegT</i> de <i>E. machalilla</i>	64
Figura 6. Crecimiento de colonias transformadas con <i>VegT</i> de <i>G. riobambae</i>	64
Figura 7. Amplicones de <i>VegT</i> de <i>G. riobambae</i> y <i>E. machalilla</i> a partir de colonias transformadas.....	65
Figura 8. Corrida electroforética de los productos de Midiprep de <i>VegT</i>	66
Figura 9. Productos de midiprep digeridos con enzimas de restricción para la síntesis de la sonda.....	67
Figura 10. Hidrólisis de las sondas Sentido y Antisentido de <i>VegT</i> de <i>G. riobambae</i> y <i>E.</i> <i>machalilla</i>	68
Figura 11. Hibridización <i>in situ</i> de <i>VegT</i> en embrión de <i>E. machalilla</i>	69
Figura 12. Hibridización <i>in situ</i> con sondas sentido y antisentido en bisecciones de oocito de <i>G. riobambae</i>	70

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1. Iniciadores utilizados en la investigación y sus secuencias nucleotídicas	71
--	----

LISTADO DE ANEXOS

Anexo 1. Vías de localización de ARNs mensajeros al cortex vegetal en oocitos de <i>X. laevis</i>	72
Anexo 2. Estructura general de las proteínas T-box.....	72
Anexo 3. Conservación de residuos específicos en la región T-box y su presencia en diferentes miembros de la familia.....	72
Anexo 4. Estructuras de Xbra, VegT y Eomesodermin.	73
Anexo 5. Modelo de la vía de localización vegetal de ARN.....	73
Anexo 6. A. Efecto de la delección del ARN mensajero materno que codifica a VegT.....	74
Anexo 7. Modelos del mecanismo de acción de VegT	74
Anexo 8. Acción de VegT sobre genes tanto endodermales como mesodermales	74
Anexo 9. Experimento de inducción mesodermal.....	75
Anexo 10. <i>G. riobambae</i> , hembra adulta.....	75
Anexo 11. Distribución de <i>G. riobambae</i> en el Ecuador.....	76
Anexo 12. Cortes de oocitos para posterior análisis de la ubicación espacial de <i>VegT</i>	76
Anexo 13. Mapa del vector pGEM-T Vector Systems PROMEGA.	77
Anexo 14. Secuencia del gen <i>VegT</i> Clon 813 <i>Gastrotheca riobambae</i>	77
Anexo 15. Secuencia del gen <i>VegT</i> Clon CmPI <i>Epipedobates machalilla</i>	78