



FACULTAD DE
CIENCIAS

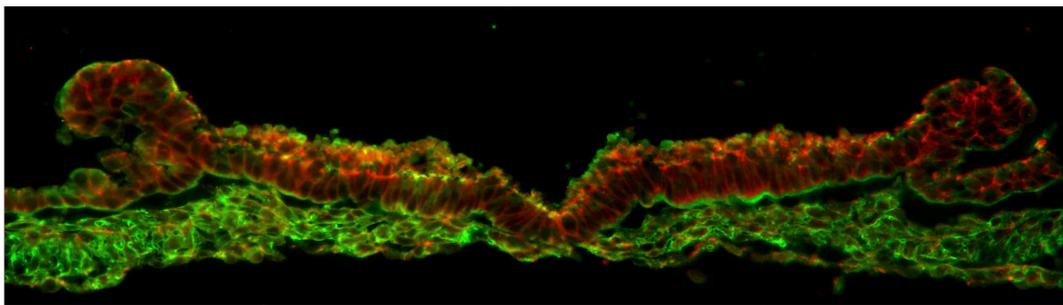
UDELAR | fcien.edu.uy



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
URUGUAY

Tesina para optar por el grado de Licenciado en Ciencias Biológicas,
Profundización en Biología Celular

MARCKS en la neurulación de embriones de pollo:
localización subcelular en función de la actividad de
interactores moleculares.



Hector Gonzalo Aparicio Diaz

Orientador

Dr. Flavio Zolessi

Sección Biología Celular

Tribunal

Prof. Dra. Cristina Arruti

Mag. Gabriela Casanova

Dr. Flavio Zolessi

Febrero 2012

Tabla de contenido

Resumen.....	1
Introducción.....	2
Desarrollo temprano del sistema nervioso central.....	2
Inducción neural.....	3
Polaridad epitelial y neuroepitelial.....	4
Cierre del tubo neural.....	5
El citoesqueleto de actina y el cierre del tubo neural.....	7
Proteína quinasa C.....	8
MARCKS.....	9
MARCKS y el desarrollo del sistema nervioso.....	10
Materiales y métodos.....	13
Cultivo de embriones.....	13
Tratamientos farmacológicos.....	14
Cortes a congelación.....	14
Inmunofluorescencia indirecta sobre cortes.....	15
Inmunofluorescencia indirecta sobre embriones in toto.....	17
Análisis de imágenes.....	18
Resultados.....	19
Tratamiento con PMA desde etapas embrionarias tempranas.....	19
Tratamiento con PMA durante la neurulación.....	22
Efecto del PMA sobre la polaridad neuroepitelial.....	25
Efecto en la distribución subcelular de MARCKS en células neuroepiteliales bajo tratamiento con PMA.....	31
Efecto del tratamiento con PMA sobre los movimientos morfogénicos de la neurulación.....	36
Discusión.....	40
Tratamiento con PMA en embriones tempranos.....	40
Tratamiento farmacológico sobre embriones en estadio de neurulación: Efecto del PMA sobre el citoesqueleto de actina.....	42

Alteraciones en la integridad del neuroepitelio.....	43
Distribución subcelular de MARCKS.....	45
Efecto del PMA en los movimientos morfogénicos de la neurulación.....	46
Conclusiones.....	48
Apéndice.....	49
Referencias bibliográficas.....	50

Resumen

El proceso de formación del tubo neural es el primer y más crítico evento en el desarrollo del sistema nervioso central en los vertebrados. En los tetrápodos, la formación de la mayor parte del sistema nervioso comienza con la construcción de la placa neural debido a un engrosamiento del ectodermo dorsal. Luego ocurre una invaginación de la línea media, seguida de la elevación de las zonas laterales de la placa, constituyendo el surco neural. Finalmente, un proceso de fusión de epitelios, une los dos pliegues, proceso que es denominado cierre del tubo neural.

MARCKS es una proteína moduladora de actina, cuya depleción en ratones afecta principalmente el desarrollo del sistema nervioso, incluyendo la aparición de defectos del cierre del tubo neural (NTD). Esta proteína interactúa con la membrana y con los filamentos de actina de una manera regulada por la proteína quinasa PKC y Calcio-Calmodulina, y se acumula transitoriamente en el borde apical del neuroepitelio durante la neurulación en el pollo. Con el fin de comenzar a comprender las funciones de MARCKS y su translocación en este proceso, desarrollamos y pusimos a punto un protocolo para la activación farmacológica de PKC en embriones tempranos de pollo en cultivo. La adición del agonista de PKC, PMA en estadios tempranos del desarrollo del embrión de pollo genera defectos muy severos en la morfología general del embrión, probablemente por afectar los movimientos morfogenéticos de la gastrulación. En estadios de neurulación, observamos importantes NTD, y la mayor parte de MARCKS resultó separada de la membrana plasmática. La polaridad celular del neuroepitelio se vio afectada, con la aparición de *blebs* de membrana apical y un desplazamiento de distintos marcadores apicales a un área central. Los anillos apicales de actina se distorsionaron, con la formación de gruesos paquetes irregulares. Una fracción de MARCKS permaneció acumulada alrededor de estos paquetes de actina, aunque mayormente no co-localizando con ellos. Los resultados de esta tesina muestran que la actividad de PKC debe ser finamente controlada durante la neurulación.

Introducción

Desarrollo temprano del sistema nervioso central

El sistema nervioso central de todos los vertebrados se genera a partir del tubo neural, estructura que se forma durante el desarrollo embrionario por un proceso denominado neurulación.

En la mayor parte de los tetrápodos, la neurulación ocurre de dos maneras posibles, llamadas neurulación primaria y neurulación secundaria. La neurulación primaria resulta en la formación de la mayor parte del tubo neural, el cual dará lugar al cerebro y la mayor parte de la médula espinal. Aunque existen algunas diferencias morfológicas entre distintas clases de vertebrados tetrápodos la formación de esta región del tubo neural comienza a partir de un engrosamiento de una capa de células epiteliales ectodérmicas en la región dorsal del embrión y la subsiguiente elevación de las regiones laterales de esta capa celular. Estas elevaciones, denominadas pliegues neurales, se dirigen hacia la línea dorsal media donde se encuentran y fusionan completando la conversión de una lámina plana en un tubo. Este proceso se denomina colectivamente cierre del tubo neural (Wallingford, 2005).

En contraste, una pequeña porción del tubo neural caudal es formado por un proceso denominado neurulación secundaria. Durante la neurulación secundaria no existe una placa neural de naturaleza epitelial como fase intermedia equivalente a la neurulación primaria. El tubo neural caudal deriva de una población de células mesenquimales, que condensan para formar el “cordón medular”. Posteriormente, las células externas del cordón medular sufren un proceso de elongación para formar un epitelio columnar pseudoestratificado similar al de la placa neural. Más tarde comienza el desarrollo de uniones intercelulares y las células epiteliales se convierten en células polarizadas. El lumen se forma sobre la superficie apical de las células epiteliales, por un proceso denominado cavitación, convirtiendo el cordón medular en el tubo neural. Por último, se produce la fusión con la región rostral del tubo generado por neurulación primaria para generar un tubo neural único y continuo

(Colas y Schoenwolf, 2001).

La clasificación de la neurulación en los peces teleósteos es un tema de controversia en la literatura, dada sus características especiales. Ha sido clasificada inicialmente como neurulación secundaria (Schmitz et al., 1993; Geldmacher-Voss et al., 2003) por la presencia en la región presuntiva del cerebro y la médula espinal de un cordón celular, la quilla neural. A partir de la formación de la quilla se genera el lumen o neurocele por un proceso de cavitación dando como resultado la formación del tubo neural. Durante este proceso no se evidencian surco ni pliegues neurales. Sin embargo, al igual que otros vertebrados que sufren neurulación primaria, el comienzo de la neurulación en los teleósteos la da la formación de la placa neural, por lo cual se ha clasificado más recientemente como neurulación primaria (Lowery y Sive , 2004).

Inducción neural

Previo a la formación de la placa neural, la región del ectodermo dorsal que dará lugar al sistema nervioso debe ser especificada a convertirse en ectodermo neural, en un proceso denominado inducción neural. Dicha inducción involucraría la supresión de un destino epidérmico, más que una inducción de un destino neural tal como lo indica el modelo de “inducción por defecto” (De Robertis y Kuroda, 2004). Este modelo postula que una subfamilia de factores TGF β , denominados proteínas morfogenéticas de hueso (BMPs) son las encargadas de especificar un destino epidérmico. Estas son proteínas extracelulares que se unen y activan receptores de superficie celular, dicha unión conlleva a la activación de factores de transcripción que expresan genes de diferenciación epidérmica. En la región en que se formará el sistema nervioso existen antagonistas de BMPs, secretados por el cordamesodermo dorsal. Estos antagonistas (folistatina, noggina, cordina y cerberus) son proteínas de secreción que se unen a los ligandos de BMP previniendo la activación de los receptores de BMP y por lo tanto determinando un destino neural (De Robertis y Kuroda, 2004).

Sin embargo, otros experimentos realizados en pollo y *Xenopus* han arrojado

evidencias de que el proceso de inducción neural no es tan sencillo. Se ha sugerido que la cascada de señalización mediada por FGF posee un rol instructivo en la inducción neural en estadios tempranos y que es independiente de su actividad inhibitoria de la vía de BMP. Se ha observado en embriones de pollo que la señal de BMP inhibe la expresión del marcador de placa neural “definitivo” Sox2, pero no la expresión del marcador temprano Sox3 (Linker y Stern, 2004). A su vez, en *Xenopus* el bloqueo de la señal de BMP en el estadio de gástrula (cuando ocurre la inducción neural) no induce tejido neural, pero cuando la inhibición de la actividad de BMP se realiza luego del estadio de gástrula, se genera tejido neural ectópico. Sin embargo, cuando la inhibición tardía de BMP es combinada con una activación temprana de FGF, existe un aumento considerable en la inducción. Dichos ensayos apoyan la idea de que una señal inicial de FGF temprana es requerida antes de la inhibición de la actividad de BMP para una correcta inducción neural (Delaune et al., 2005). Por lo tanto, parece ser que la inducción neural no ocurre en un simple paso, sino que requiere de una secuencia de señales en un orden específico en el cual la inhibición por BMP constituye un evento tardío (Stern, 2006).

Polaridad epitelial y neuroepitelial

Los epitelios son tejidos constituidos por células contiguas yuxtapuestas, unidas fuertemente unas con otras por complejos de adhesión célula-célula. En un epitelio simple, las membranas de cada célula contactan distintos ambientes extracelulares definiendo tres dominios. El dominio basal contacta con la lámina basal a través de uniones mediadas por integrinas, en el dominio lateral se encuentran los complejos de unión célula-célula, como son las uniones estrechas y *zonula adherens*. Dichos complejos de unión delimitan y separan los dominios basolateral y apical de la membrana plasmática al impedir el pasaje de moléculas entre un dominio y el otro (Griep y Robbins, 1983). El dominio de membrana apical es la región de la célula que queda libre al medio extracelular. En el interior celular existe también una organización polarizada de organelos, como es el caso del aparato de Golgi, el núcleo y el centrosoma.

A su vez, existe una distribución diferencial de proteínas entre dominios distintos de membrana, dicha separación la determina la red del *trans*-Golgi que segrega y marca las proteínas para que sean transportadas a su dominio correspondiente (Nelson, 2003). El establecimiento de la polaridad ápico-basal está dada en gran medida por tres complejos proteicos que se ubican en la cara citoplásmica de la membrana: el complejo Par ubicado en las uniones estrechas, el complejo Crumbs localizado en el dominio apical y el complejo Scribble ubicado en la membrana lateral. El complejo Par está compuesto por PAR3, PAR6 y la proteína quinasa C atípica (aPKC), el complejo Crumbs por Crumbs (CRB), PATJ y PALS1 y el complejo Scribble por Scribble (SCRIB), Lethal Giant Larvae (LGL) y Disc Large (DLG) (Zolessi, 2009).

Las células neuroepiteliales son morfológicamente polarizadas en dominios apical y baso-lateral como son otras células epiteliales (Chen et al., 1998). A su vez contienen estructuras subcelulares polarizadas, como el centrosoma y el citoesqueleto cortical de actina (Chenn et al., 1998). Sin embargo poseen una particularidad, durante el estadio de placa neural, el neuroepitelio expresa la proteína transmembrana ocludina específica de las uniones estrechas, pero durante el cierre del tubo neural desaparece la expresión de ocludina y aumenta la expresión de la proteína de membrana ZO-1 en las uniones de tipo adherente (Aaku-Saraste et al., 1996).

Cierre del tubo neural

La formación de la placa neural comienza con una diferenciación fenotípica de sus células con respecto al ectodermo que la rodea. Las células adoptan una forma columnar y se elongan en su eje ápico-basal en relación con las células del ectodermo que formarán la epidermis. Se cree que la elongación de las células neuroepiteliales está mediada en parte por microtúbulos paraxiales (Schoenwolf y Powers, 1987).

El segundo paso, el moldeado de la placa neural, es un paso crítico en la formación del tubo neural. Al momento de la especificación, la placa neural es ancha

a lo largo del eje medio-lateral y corta en el eje rostro-caudal. Durante este paso, la placa neural se estrecha en el eje medio-lateral y se alarga en el eje rostro-caudal, mediante un proceso de convergencia y extensión en el cual las células convergen en la línea media y como consecuencia el tejido se alarga. Alteraciones de estos movimientos generan defectos en el cierre del tubo neural (Wallingford y Harland, 2002). A su vez el cambio de forma que sufren las células neuroepiteliales de acuerdo al eje ápico-basal también contribuye al moldeado de la placa neural. La elevación del neuroepitelio ayuda a disminuir el ancho de la placa con respecto al eje medio-lateral, ya que el volumen de las células no varía durante el proceso de elongación de las células (Schoenwolf and Powers, 1987).

El plegamiento de la placa comienza mientras el moldeado está en marcha, en este proceso el plegamiento involucra la formación de los pliegues neurales en los extremos laterales de la placa y la subsecuente elevación y convergencia de los pliegues en la línea media. Este proceso se lleva a cabo gracias a fuerzas intrínsecas y extrínsecas a la placa neural. Las fuerzas intrínsecas involucran la generación de puntos de bisagra, un punto de bisagra medial que se extiende a lo largo de todo el eje rostro-caudal, y un par de puntos bisagras laterales que se encuentran principalmente en las regiones presuntivas del cerebro (Colas y Schoenwolf, 2001). Luego la placa neural rota alrededor de los puntos de bisagra. Las fuerzas extrínsecas a la placa neural son llevadas a cabo por el tejido ectodérmico no neural adyacente a la placa que genera fuerza de tracción ayudando a la convergencia de los pliegues neurales (Moury y Schoenwolf, 1995).

Por último, la convergencia de los pliegues dada por el plegamiento lleva a que estos entren en contacto en la línea media, en donde se adhieren y posteriormente se fusionan. Como resultado se genera un tubo neural separado del ectodermo epidérmico.

El citoesqueleto de actina y el cierre del tubo neural

El citoesqueleto de actina posee un papel preponderante en la generación del tubo neural, en especial en el proceso de plegamiento de la placa. Esta observación está dada por el hecho de que agentes farmacológicos que afectan a los filamentos de actina, y mutaciones en genes que codifican proteínas reguladoras de actina, bloquean el cierre del tubo neural en este paso. Dos eventos morfológicos ocurren en este momento que dan cuenta de la dependencia del citoesqueleto, uno de ellos es la formación de los puntos de bisagra a través del cambio en la morfología celular mientras que el segundo es el plegamiento de la placa alrededor de los puntos de bisagra.

La formación de los puntos de bisagra se puede llevar a cabo por dos mecanismos: constricción apical y expansión de la región basal de las células neuroepiteliales. El primero consiste en una reducción del área de la región apical de las células, mientras que la región basal no cambia, transformando células de morfología columnar en células con aspecto de cuña. La disminución de la región apical se da por un proceso de constricción del anillo de actina y miosina (actomiosina) (Sawyer et al., 2010). Existe una densa distribución de filamentos de actina en la región apical de las células neuroepiteliales y proteínas clave que participan en la contracción del anillo de actomiosina, como son Rho, la quinasa de Rho (ROCK) y la proteína motora miosina IIB, están localizadas apicalmente en las células neuroepiteliales (Hildebrand, 2005; Kinoshita et al. 2008; Nishimura y Takeichi, 2008). A su vez, el complejo motor de la miosina II se encuentra en un estado activo, dada por la fosforilación de la cadena liviana de la miosina II (Kinoshita et al. 2008).

Sin embargo, en experimentos utilizando citocalasina D -droga que previene la adición de monómeros de actina al filamento-, se bloquea la formación de los puntos de bisagra laterales y la convergencia de los pliegues neurales, pero el punto de bisagra medial no sufre alteraciones (Schoenwolf et al., 1988). Las células del punto de bisagra medial poseen ciclos celulares largos, y cortos estadios de mitosis en la región apical de las células en comparación con el resto del neuroepitelio (Smith y Schoenwolf, 1988). Utilizando estas evidencias, Smith y Schoenwolf

desarrollaron un modelo según el cual los núcleos se localizan un mayor periodo de tiempo en la región basal de las células, expandiéndola y ayudando así a la generación de las bisagras (Smith and Schoenwolf, 1988).

Por otro lado, se ha observado que existen diferencias regionales en el requerimiento de actina filamentosa. Tratamientos en los que se utilizó citocalasina D en embriones de ratón, rata y pollo generaron defectos en el cierre del tubo neural cefálico pero no en regiones más caudales del tubo neural (Ybot-Gonzalez y Copp, 1999; van Straaten et al., 2002).

Proteína quinasa C

La proteína quinasa C comprende una familia de isoenzimas serina/treonina quinasa estructuralmente homólogas, las cuales poseen un rol crítico en la transducción de señales. Esta familia está involucrada en una gran variedad de funciones celulares y vías de transducción de señales regulando migración, polaridad, proliferación, diferenciación y muerte celular (Nishizuka 1989, 1995). Como mecanismo general, su activación está mediada por el segundo mensajero diacilglicerol, producto de la reacción enzimática de la fosfolipasa C sobre el fosfolípido fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP_2), generando diacilglicerol e inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3). El IP_3 aumenta la concentración citosólica de Ca^{2+} , lo cual provoca la translocación de PKC desde el citosol a la cara citoplasmática de la membrana plasmática. Allí se activa por la combinación de Ca^{2+} , diacilglicerol y el fosfolípido fosfatidilserina (Alberts et al., 2007).

La familia PKC comprende trece miembros que están agrupados en cuatro subclases de acuerdo a sus características estructurales y requerimientos de cofactores. Todos los miembros comparten una estructura básica, consistiendo en un dominio regulatorio en la región N-terminal y el dominio catalítico en C-terminal. Las subclases se dividen en PKCs clásicas o convencionales (cPKC: α , βI , βII y γ), PKCs noveles (nPKC: ϵ , θ , η y δ), PKCs atípicas (aPKC: ζ y ι) y las quinasas relacionadas a PKC (PKR1, 2 y 3) (Ron et al, 1999; Mellor y Parker, 1998). Todas las isoformas requieren de fosfatidilserina para su activación. Las cPKCs son sensibles

al Ca^{2+} y necesitan la adición de diacilglicerol o éster de forbol para su activación. Las nPKCs son insensibles al Ca^{2+} pero igual requieren de la adición de diacilglicerol o éster de forbol para su activación. Para el caso de la aPKCs, las cuales son insensibles al Ca^{2+} e independientes de diacilglicerol y éster de forbol. Por último, las PRK son insensibles al Ca^{2+} al diacilglicerol y éster de forbol, sin embargo se ha documentado que PRK1 se une a RhoA aumentando su activación *in vitro* (Mellor y Parker, 1998).

MARCKS

MARCKS (Myristoylated Alanine-Rich C Kinase Substrate) es una proteína ubicua, particularmente abundante en el sistema nervioso y que fuera originalmente descubierta como un sustrato mayor de PKCs clásicas (Albert et al., 1986). MARCKS, y su proteína relacionada MRP, pertenecen a una familia de proteínas pequeñas, intrínsecamente desplegadas, ácidas, ricas en alanina, glicina, prolina y ácido glutámico. En el pollo, la secuencia de MARCKS consta de 280 aminoácidos y tiene un peso molecular medido por espectrometría de masa MALDI-TOF de 27.8kDa (Graff et al., 1989; Zolessi et al., 2004), pero su alto contenido en aminoácidos con carga negativa y su estructura desplegada hacen que su migración en geles de SDS-poliacrilamida sea anómala y su tamaño aparente ronde entre los 60 y 80 kDa (Blackshear, 1993). Se encuentra tanto asociada a la membrana celular como libre en el citosol (soluble). Contiene tres dominios conservados, un dominio N-terminal que puede ser miristilado, un dominio MH2 cuya función es desconocida y un dominio efector básico también llamado dominio de fosforilación, ya que los sitios de fosforilación por PKC se encuentran en él (Stumpo et al., 1989). El dominio amino terminal está formado por los primeros catorce aminoácidos que conforman la secuencia consenso para su miristilación. Ésta es una modificación co-traducciona en la cual se adiciona un ácido mirístico al grupo amino de la glicina, en el extremo N-terminal, mediante un enlace amida (Towler et al., 1988). La secuencia que codifica el dominio MH2 presenta el único sitio de empalme del ARNm (Blackshear et al., 1992). Finalmente, el dominio efector (ED) posee una secuencia de 25

aminoácidos (Graff et al., 1989a; Graff et al., 1991) y es extremadamente básico a diferencia del resto de la proteína.

Además de ser el sitio de fosforilación por PKC, el ED también actúa como sitio de interacción con otras moléculas tales como la calmodulina unida a calcio (Ca-CaM), los fosfolípidos de membrana cargados negativamente y los microfilamentos de actina. La proteína desfosforilada entrecruza los filamentos de actina, lo que puede ser inhibido por la unión de calmodulina o por la fosforilación mediada por PKC. La fosforilación no impide la unión a la actina, pero ésta se vuelve más laxa impidiendo el entrecruzamiento de los microfilamentos (Hartwig et al., 1992). La unión a la membrana plasmática está mediada por la unión hidrofóbica del grupo mirístico a la bicapa lipídica, y por la interacción electrostática entre los residuos básicos del ED y las cabezas cargadas negativamente de fosfolípidos de la membrana con los (Wang et al., 2001; Blackshear, 1993; Aderem, 1992). El dominio efector puede ser separado de la membrana plasmática si se eliminan los polifosfoinosítidos PIP₂ y PIP₃, demostrando la importancia de estos fosfolípidos en el anclaje del ED a la membrana plasmática (Heo et al., 2006). La fosforilación también provoca su translocación al citosol, al cambiar las cargas eléctricas del ED (Rosen et al., 1990). MARCKS es de esta manera modulada por la activación de PKC y de Ca-CaM (Hartwig et al., 1992). Se sabe que esta proteína está implicada en la coordinación de los eventos de señalización membrana-citoesqueleto tales como la adhesión, migración, secreción, fagocitosis y crecimiento de las neuritas en una amplia variedad de células (Aderem, 1992; Blackshear, 1993).

MARCKS y el desarrollo del sistema nervioso

A pesar de ser MARCKS una proteína ampliamente distribuida en distintos tejidos, los efectos de la delección de su gen, sólo son importantes a nivel del sistema nervioso (Stumpo et al., 1995). Todos los ratones homocigotos para dicha delección murieron antes o algunas horas después del nacimiento. Un alto porcentaje de los mismos presentó exencefalia y onfalocelo indicando defectos de la línea media dorsal. En aquellos ratones donde no existía exencefalia, se apreciaron defectos

tales como la falla en la laminación de la corteza cerebral. Estos ratones presentan además agenesia del cuerpo calloso y otras comisuras del cerebro anterior. Algunos de estos defectos pueden ser explicados por anomalías en la migración neuronal, ya sea como consecuencia de alteraciones en la interacción célula-célula o célula-matriz, funciones donde MARCKS podría jugar un rol importante. En estos ratones mutantes existen anomalías en la lámina basal que rodea el tubo neural y en otras moléculas de la matriz extracelular como los proteoglicanos, lo cual puede ocasionar defectos en la migración de los neuroblastos (Blackshear et al., 1997). Por otro lado, recientemente se demostró que MARCKS posee un rol esencial en la ubicación y proliferación de la glía radial. Los ratones *marcks*^{-/-} presentan una organización aberrante del andamiaje dado por la glía radial presentando células progenitoras ectópicas a lo largo de toda la zona intermedia y la placa cortical. Esto determina defectos en la organización de las capas de la corteza y la presencia de neuronas ectópicas (Weimer et al., 2009). Las alteraciones observadas en los ratones “knock out” son corregidas totalmente cuando se realiza la transgénesis con la forma humana de MARCKS (Swierczynski et al., 1996). Los ratones transgénicos que expresan una variante no miristilada de MARCKS o una variante no fosforilable en el ED, complementan todos los defectos neuroanatómicos de *Macs*^{-/-} (Weimer et al., 2009), pero no tienen valores normales de sobrevivencia postnatal (Swierczynski et al., 1996; Scarlett et al., 2003). Estos resultados sugerirían que la fosforilación por PKC no es necesaria para la/s función/es que MARCKS media durante el desarrollo normal del sistema nervioso central, pero sí lo son para la sobrevivencia luego del nacimiento.

Por otra parte, resultados previos del laboratorio donde se realizó esta pasantía mostraron que MARCKS se acumula transitoriamente en la región apical de las células neuroepiteliales durante el cierre del tubo neural (Zolessi y Arruti, 2001). La apicalización comienza luego de formada la placa neural, sin embargo es durante el proceso de plegamiento donde su distribución asimétrica se vuelve evidente. Luego de finalizado el proceso de formación del tubo neural, se pierde su distribución asimétrica, encontrándose homogéneamente distribuida en la periferia de las células neuroepiteliales. Como fue mencionado anteriormente, la expresión de MARCKS es necesaria para el proceso de cierre del tubo neural, sin embargo, se

abren aquí al menos dos preguntas: a) ¿es importante su la localización subcelular de MARCKS para su función?; b) ¿cuál es el mecanismo de esta acumulación apical? En este trabajo intentamos responder a esta segunda pregunta, teniendo en cuenta que muy probablemente la acumulación apical de MARCKS durante la neurulación dependa de la asociación de MARCKS con la membrana plasmática apical (o subapical), o con el anillo apical de actina, o eventualmente con ambos. El objetivo general de esta tesina fue, entonces, contribuir a la comprensión de las funciones de la proteína MARCKS en el proceso de cierre del tubo neural. Para ello pusimos a punto un método de cultivo de embriones de pollo que nos permitió alterar farmacológicamente la asociación de MARCKS con la membrana plasmática, mediante la activación de PKC, y correlacionar los defectos causados en el cierre del tubo neural con la localización subcelular de MARCKS.

Materiales y métodos

Cultivo de embriones

Los huevos embrionados de pollo (donados por Avícola Prodhin) fueron incubados a 37° C, con humedad constante. Se obtuvieron embriones de diferentes estadios, desde estadio 6 (24 horas) hasta estadio 8 (30 horas), de acuerdo a la tabla de estadios normales de desarrollo del pollo de Hamburger y Hamilton (Hamburger y Hamilton, 1951). Luego los embriones fueron cultivados utilizando el método EC (Chapman et al., 2001). Este método consiste en la utilización de un papel de filtro para mantener el embrión bajo la tensión de la membrana vitelina, sobre un sustrato semi-sólido de agar-albúmina. Para la implementación del cultivo, los huevos embrionados se mantuvieron a temperatura ambiente durante 15 minutos. Luego se procedió a la rotura de la cáscara colocando el contenido del huevo en una placa de Petri de 10 cm de diámetro. El blastodermo debe quedar hacia arriba y aproximadamente centrado en la yema de huevo. La albúmina interfiere con la capacidad de la membrana vitelina para pegarse en el papel de filtro. Por lo tanto, se retiró la albúmina que cubre el blastodermo utilizando papel tisú, mediante movimientos suaves desde el centro hacia la periferia del blastodermo. Una vez que el área de membrana vitelina quedó libre de albúmina, una pieza de papel de filtro de aproximadamente 1,5-2,0 cm cuadrados con una abertura central con forma de trébol de cuatro hojas en el centro se colocó suavemente sobre la membrana vitelina, de manera que el embrión quede en el centro. El papel inmediatamente absorbe el líquido de la superficie de la membrana vitelina, adhiriéndose firmemente el papel a la membrana. Posteriormente se cortó la membrana vitelina alrededor del papel de filtro. Con pinzas finas se retiró suavemente el papel de filtro (con el embrión adherido al mismo por medio de la membrana vitelina) de la yema en dirección oblicua. Se eliminó el exceso de yema del blastodermo realizando inmersiones en solución Pannet-Compton. Luego se procede a la datación del embrión de acuerdo a Hamburger y Hamilton (1951). Por último los embriones son incubados a 37°C a humedad constante, den-

tro de una placa de Petri de 3,5 cm de diámetro conteniendo el medio semi-sólido de agar-albúmina.

Tratamientos farmacológicos

Los tratamientos farmacológicos se llevaron a cabo sobre embriones en cultivo. En el medio semi-sólido de agar-albúmina se incluyó la droga forbol-miristato-acetato (PMA) con su respectivo vehículo dimetil sulfóxido (DMSO). Luego de una puesta a punto, determinamos que la adición del PMA se debe realizar cuando el medio de agar-albúmina se enfría, ya que el calor inactiva al compuesto.

Se llevaron a cabo tratamientos que comprendieron una dosis de PMA 5 μM por un período de 24 horas desde el estadio de línea primitiva (HH 3 según tabla de datación de Hamburger-Hamilton) hasta el estadio de surco neural (HH 8). Por otro lado se realizaron exposiciones de 3 horas a PMA 5 μM desde HH 8 (presencia de surco neural) hasta HH 9 (cierre de tubo neural cefálico). En todos los casos se administró a los embriones controles dosis equivalentes de DMSO a las utilizadas en los grupos experimentales.

Cortes a congelación

Luego de culminados los tratamientos farmacológicos, los embriones fueron fijados por inmersión en paraformaldehído (PFA) al 4% en PBS para la inmovilización y la preservación de la estructura interna, y fueron procesados para la realización de criocortes. Para ello se hicieron tres lavados de una hora en PBS para sacar por completo el fijador y luego se realizó la crioprotección del material biológico mediante soluciones de sacarosa 4% y 20% respectivamente. Las piezas se dejaron en dichas soluciones hasta que se sumergieran por completo. En una etapa posterior se realizó la inclusión de las muestras en un medio de soporte. El medio de inclusión utilizado fue gelatina al 7,5% (Stern, 1993). Los bloques fueron realizados en placas de petri de 3,5 cm de diámetro y fueron llevados a 4°C hasta la utilización de los mis-

mos, siendo este tiempo nunca mayor de 5 días. Al momento del procesamiento, los bloques fueron tallados con una hoja de bisturí para que las superficies fueran lo más paralelas posible y fueron colocados en el soporte del crióstato (Cryocut E Reichert-Jung, Alemania), utilizando como pegamento el medio de inclusión por congelación OCT Jung. Los bloques fueron congelados rápidamente por la adición indirecta de nitrógeno líquido y luego colocados por aproximadamente 10 minutos dentro del crióstato hasta que alcanzaran la temperatura a la cual se realizarían los criocortes. Se hicieron cortes transversales en criostato, a -25°C , de 5-7 μm de espesor aproximadamente en el caso de preparados para microscopía de epifluorescencia y de 15 μm para microscopía confocal. Los cortes fueron levantados en portaobjetos (previamente lavados y cubiertos con gelatina crómica) y secados a temperatura ambiente. Luego de realizados los cortes, los preparados fueron mantenidos en vasos coplin a 4°C , hasta su posterior utilización.

Inmunofluorescencia indirecta sobre cortes

Para realizar la inmunodetección, primero se extrajo el exceso de gelatina incubando los cortes en un baño de PBS a 38°C , durante media hora. Luego, se realizó una post-fijación de los cortes en el portaobjetos durante 10 minutos, para evitar pérdidas del material durante los pasos subsiguientes. Después, lavamos 5 veces en PBS durante 2 minutos cada uno. Los sitios de unión inespecífica fueron bloqueados mediante una incubación en albúmina sérica bovina (BSA) al 1% en PBS durante 40 minutos, en cámara húmeda y a 37°C . Posteriormente los cortes fueron incubados en presencia del anticuerpo primario en cámara húmeda a 37°C , durante 40 minutos. Para ello se utilizaron 20 a 40 μl de anticuerpo por grupo de cortes, por encima de los cuales se colocó una lámina de Parafilm para que el anticuerpo estuviera homogéneamente distribuido sobre éstos. Las diluciones se realizaron en BSA al 1% en PBS y las concentraciones variaron dependiendo del anticuerpo en cuestión. Se utilizaron varios anticuerpos primarios (Tabla 1).

Tabla 1: Dilución y especificidad de los anticuerpos utilizados en criocortes.

Anticuerpos	Dilución	Estructura que identifican
Polo52	1:5000	MARCKS total.
pMARCKS	1:50	MARCKS fosforilada en el dominio efector.
5e	1:400	Glicoproteína de unión celular N-CAM. Se utiliza como marcador temprano de placa neural.
aPKC	1:500	aPKC, marcador de polaridad apical.
γ -tub	1:500	γ -tubulina, Se utiliza como marcador del centrosoma.

El anticuerpo policlonal de conejo Polo52 (producido previamente en el laboratorio en colaboración con el Polo Tecnológico de Pando, Facultad de Química, UdelaR y el Institut Pasteur de Montevideo a partir de proteína MARCKS recombinante de pollo) reconoce a la población total de la proteína MARCKS. Se utilizó el anticuerpo policlonal anti-fosfo S152-S156 MARCKS, que reconoce la subpoblación de MARCKS fosforilada por PKC en el ED (“p-MARCKS”). El anticuerpo policlonal anti-aPKC reconoce a la proteína del mismo nombre; este anticuerpo fue utilizado como marcador de polaridad celular, en particular del dominio apical del neuroepitelio. Además utilizamos un marcador de células precursoras del sistema nervioso central, el anticuerpo monoclonal 5e, el cual indica la presencia de la molécula de adhesión celular neural (N-CAM) (Thiery et al, 1982) Realizamos ensayos con este anticuerpo para poner en evidencia la placa neural. Por último, utilizamos el anticuerpo monoclonal anti- γ -tubulina, el cual es un marcador del centrosoma celular. En todos los casos fueron realizados controles negativos por omisión del anticuerpo primario. Después se realizaron cinco lavados en PBS de 2 minutos para extraer el anticuerpo primario que no fue unido al antígeno. Inmediatamente después, se incubaron los cortes en presencia del anticuerpo secundario en BSA al 1% en PBS, en las mismas condiciones que el primario. Se utilizaron el anticuerpo de cabra anti IgG de ratón conjugado a Alexa546 y el anticuerpo de cabra anti IgG de conejo conjugado a Alexa488, ambos en una proporción 1:2000. En algunos casos, en lugar del anticuerpo conjugado a Alexa546, y junto con el anticuerpo secundario, se agregó el marcador de actina filamentosa faloidina conjugado a rodamina (TRITC) en una dilución 1:5000. Posteriormente se realizaron 5 lavados en PBS en los cuales se incluyó el marcador de ADN Hoechst 33342, en una proporción 1:8000 en PBS en el caso de

los preparados para microscopía de epifluorescencia. En los criocortes a ser observados mediante microscopía confocal, los núcleos fueron marcados con yoduro de propidio en una proporción 1:10000. En ambos casos los cortes se incubaron con el marcador nuclear durante 10 minutos, a temperatura ambiente, y se realizó un último lavado en PBS, previo al montaje en glicerol 70% en Tris 20mM pH8. El sellado entre los bordes del cubre y portaobjetos fue llevado a cabo con esmalte para uñas incoloro. La observación de los preparados fue realizada en un microscopio de epifluorescencia Nikon Microphot FXA y fotografiados con una cámara digital Nikon D70S o en un microscopio confocal Leica TCS-SP5. Posteriormente los preparados fueron guardados a -20°C.

Inmunofluorescencia indirecta sobre embriones *in toto*

Terminados los tratamientos farmacológicos una cierta proporción de embriones fue procesada para inmunofluorescencia indirecta *in toto*. Para ello, se realizaron 3 lavados de 10 minutos en PBS seguidos de una incubación con tripsina al 0,25% en hielo, por 10 minutos, con el objetivo de permeabilizar el material biológico. Luego se llevaron a cabo tres lavados de 30 minutos cada uno en PBS-T (PBS 0,1% Tritón X100) para eliminar por completo el fijador y la tripsina, y continuar el proceso de permeabilización de las muestras. Inmediatamente después, se procedió al bloqueo de los sitios inespecíficos por 12 horas a 4°C en agitación suave utilizando BSA 1% en PBS-T y suero de cabra al 5%. Terminado el bloqueo se incubó con el anticuerpo primario policlonal Polo 52, en una dilución 1:2000 en BSA al 1% en PBS-T y suero de cabra al 5%, por un período de 12 horas a 4°C en agitación suave. Para eliminar el anticuerpo primario que no se unió a su antígeno se llevaron a cabo 5 lavados de 1 hora en PBS-T. Posteriormente se incubaron las muestras con el anticuerpo secundario anti IgG de conejo, conjugado a Alexa488, en una dilución 1:1000 en BSA al 1% en PBS-T y suero de cabra al 5%. Además, se incluyó el marcador de actina filamentosa faloidina conjugado a TRITC en una dilución 1:5000, y el marcador de ADN yoduro de propidio en una proporción 1:8000. La incubación fue por un tiempo de 36 horas, en agitación suave y a 4°C. Luego se

realizaron 2 lavados en PBS de 2 horas cada uno y los embriones fueron montados en glicerol al 70% en Tris 20mM pH8, en una cámara realizada con cinta aisladora sobre un portaobjetos. El sellado entre los bordes del cubre y portaobjetos fue llevado a cabo con esmalte para uñas incoloro. La observación de los preparados fue realizada en un microscopio confocal Leica TCS-SP5. Posteriormente los preparados fueron mantenidos a -20°C.

Análisis de imágenes

Se realizaron medidas de intensidad de fluorescencia para MARCKS total a lo largo de transectas en sentido ápico-basal, sobre micrografías digitales de células neuroepiteliales de embriones control y tratados con PMA 5 μ M durante 3 horas. Para la cuantificación usamos embriones de 2 experimentos independientes, siendo un total de 5 embriones los utilizados (3 bajo tratamiento farmacológico y 2 controles).

Utilizando el programa de acceso libre ImageJ versión 1.44 (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>), se generaron sobre imágenes de placas neurales, transectas rectangulares de 20 μ m de ancho y de largo dependiente del grosor de la placa neural. De cada embrión se tomaron 10 perfiles de intensidad de fluorescencia, se midió el ancho de la placa neural y se registró la señal de fondo midiendo la intensidad de fluorescencia en regiones sin tejido.

Luego de obtenidos los perfiles, se procedió a normalizar el ancho de las placas medidas en función de la placa control de ancho menor, utilizando el programa de análisis de datos Origin Pro 8. En el mismo programa se llevó a cabo el alineamiento de los perfiles de cada embrión tomando como referencia los picos de mayor valor en la señal de fluorescencia, se sustrajo la señal de fondo a todas las medidas y se calculó el promedio para cada embrión.

Resultados

Tratamiento con PMA desde etapas embrionarias tempranas

Con el objetivo de determinar si la localización apical de MARCKS es necesaria para la correcta formación del tubo neural, procedimos a la activación farmacológica de PKC, su principal quinasa. En primer lugar realizamos tratamientos en condiciones de cultivo que comprendieron desde HH3 hasta HH8 con una duración total de 24 horas. En estos experimentos encontramos que una exposición prolongada desde estadios tempranos genera defectos muy severos en la morfología general del embrión, que dificultan determinar en qué etapa del desarrollo se encuentran (figura 1). Para profundizar el análisis morfológico del tubo neural generamos criocortes sobre dichos embriones. Encontramos una desorganización total de los tejidos, a tal punto que nos fue imposible diferenciar placa neural de ecto, meso y endodermo (figura 2). Cuando realizamos inmunodetecciones contra la molécula de adhesión neural N-CAM, utilizado como marcador temprano de placa neural, observamos una señal predominante en las células neuroepiteliales en la situación control. Sin embargo, en la situación experimental encontramos una señal muy baja, homogéneamente distribuida que nos imposibilitó determinar dónde se encontraba la placa neural.

Como fue descrito en la introducción, encontramos un enriquecimiento de MARCKS en la región apical de las células neuroepiteliales en embriones control. Sin embargo, en embriones bajo tratamiento farmacológico la localización de MARCKS fue ubicua, presentando una distribución homogénea en los tejidos analizados (a diferencia de los embriones control que poseen una fuerte señal en el mesodermo) y sin presentar un enriquecimiento en cierto tipo celular (figura 2). A nivel subcelular la señal de MARCKS se evidenció en las membranas plasmáticas, sin observarse señal citoplásmica. A su vez, no se evidenció un enriquecimiento en ciertas regiones de membrana, siendo homogéneamente distribuida, a diferencia del control el cual presenta un enriquecimiento en la región apical de la placa neural.

Figura 1. Tratamiento farmacológico con 5 μ M PMA desde HH3 sobre embriones en cultivo por 24 horas. Efectos sobre la morfología general del embrión. **A.** Embrión control (DMSO). Presencia de somites (*) y pliegues neurales (puntas de flecha). **B.** Embrión bajo tratamiento farmacológico. Se pueden observar defectos muy severos en la morfología general del embrión, como la ausencia de somites y una placa neural reconocible. Barra: 300 μ m.

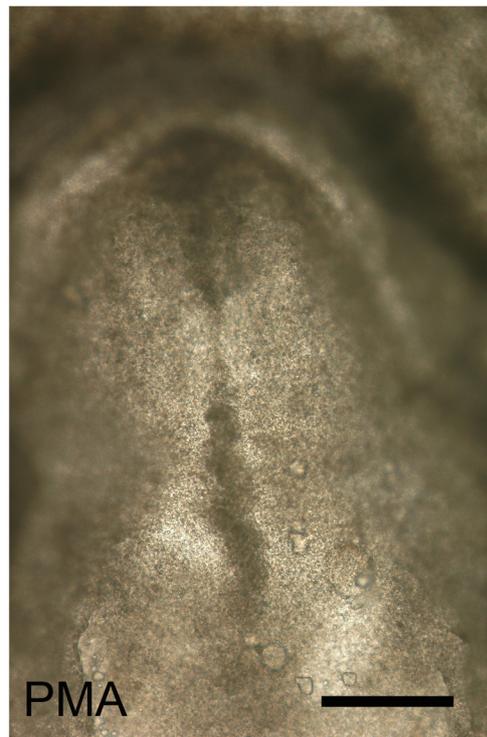
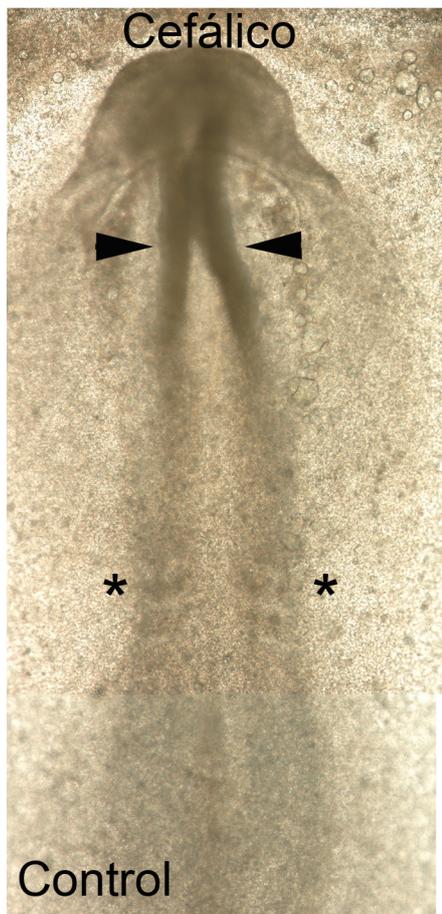
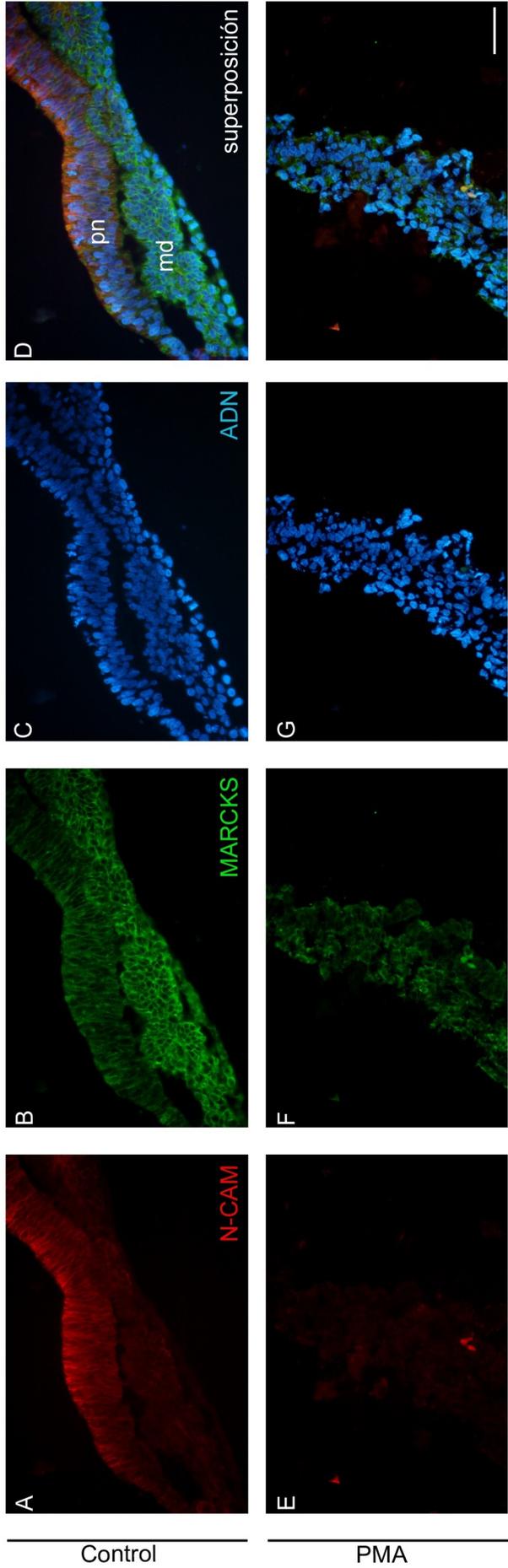


Figura 2. Tratamiento farmacológico con 5 μ M PMA desde HH3 sobre embriones en cultivo por 24 horas. Localización subcelular de MARCKS y N-CAM. **A-D.** Corte transversal de embrión control (DMSO) a nivel del tubo neural caudal. En **A** se observa el inmunomarcado de la molécula de adhesión neural N-CAM (marcador de placa neural). Se puede apreciar que la señal proviene mayoritariamente de la placa neural. **B.** Inmunomarcado de MARCKS total con el anticuerpo policlonal Polo52. Se observa señal en la placa neural, en especial en la región apical de las células neuroepiteliales y una fuerte señal proveniente del mesodermo. **C.** Marcado fluorescente de los núcleos con el agente intercalante del ADN Hoechst 33342. Se pueden observar los núcleos a distintas alturas con respecto al eje ápico-basal de la placa neural. **D.** Superposición de la señal de MARCKS, N-CAM y núcleos. Nótese la colocalización entre MARCKS y N-CAM en la región apical de las células de la placa neural. **E-H.** Corte transversal de embrión bajo tratamiento con PMA. **E.** Se observa una señal muy baja homogéneamente distribuida de N-CAM. **F.** MARCKS se presenta en la membrana plasmática homogéneamente y no presenta un enriquecimiento en ningún tipo celular. **G.** Marcado del ADN. No se aprecia una distribución pseudoestratificada de los núcleos. **H.** Superposición de la señal de N-CAM, MARCKS y núcleos. Imágenes tomadas con microscopio de epifluorescencia. md: mesodermo, pn: placa neural. Barra: 50 μ m.



Por otro lado, encontramos una alteración de la polaridad celular y tisular evidenciada por la distribución del marcador apical aPKC (figura 3). En los embriones control, pudimos constatar que aPKC posee una distribución subcelular mayoritariamente apical en las células neuroepiteliales, acompañada de una débil y homogénea señal citoplásmica (Margolis y Borg, 2005). Una distribución similar observamos para los filamentos de actina (figura 3). En los embriones tratados con PMA, constatamos una acumulación no apical de ambos marcadores, encontrándose que se ubican juntos en una región central del embrión. Este enriquecimiento ectópico de aPKC presenta una señal más débil que el del borde apical de la placa neural control. Curiosamente, la señal citoplásmica permanece con una intensidad y distribución similares a las del control.

Tratamiento con PMA durante la neurulación

A partir de los resultados anteriormente descritos y con el objetivo de obtener fenotipos menos severos, procedimos a la realización de tratamientos farmacológicos de corta duración en embriones más avanzados en el desarrollo embrionario. En la figura 4 se muestran embriones en condiciones de cultivo, bajo un tratamiento farmacológico de 3 horas de duración con PMA 5 μ M y su respectivo control.

Cabe destacar que los tratamientos se llevaron a cabo en embriones de estadio HH8 en los cuales ya existe una elevación de los pliegues neurales en la región cefálica. Se puede observar la morfología general de un embrión control. En el embrión con exposición al PMA se observa el neuroporo anterior totalmente abierto (asterisco) y un pronunciado ensanchamiento de la placa neural que abarca el romboencéfalo hasta el nivel del primer somite (puntas de flecha).

Figura 3. Tratamiento farmacológico con 5 μ M PMA desde HH3 sobre embriones en cultivo por 24 horas. Distribución subcelular de aPKC. **A-D.** Corte transversal de tubo neural caudal de embrión control (DMSO). **A.** Se observa el citoesqueleto de actina utilizando el marcador de actina filamentosa faloidina-TRITC. Se puede apreciar un enriquecimiento en microfilamentos de actina en la región apical de las células de la placa neural. **B.** Inmunomarcado de aPKC. Se observa una señal predominante en la región apical de las células neuroepiteliales. **C.** Marcado nuclear con Hoechst 33342. Se pueden observar los núcleos a distintas alturas con respecto al eje ápico-basal de la placa neural. **D.** Superposición de la señal del citoesqueleto de actina, aPKC y núcleos. **E-H.** Corte transversal de embrión bajo tratamiento con PMA. **E.** Se aprecian paquetes de actina filamentosa (puntas de flecha). **F.** Se observa un enriquecimiento de aPKC en ciertas regiones de membrana en varias células (puntas de flecha) **G.** Marcado del ADN. No se aprecia una distribución pseudoestratificada de los núcleos. **H.** Superposición de la señal del citoesqueleto de actina, aPKC y núcleos. Nótese la colocalización de la señal de aPKC con el citoesqueleto de actina en los paquetes mencionados anteriormente. Imágenes tomadas con un microscopio de epifluorescencia. pn: placa neural, -ec: ectodermo. Barra: 50 μ m.

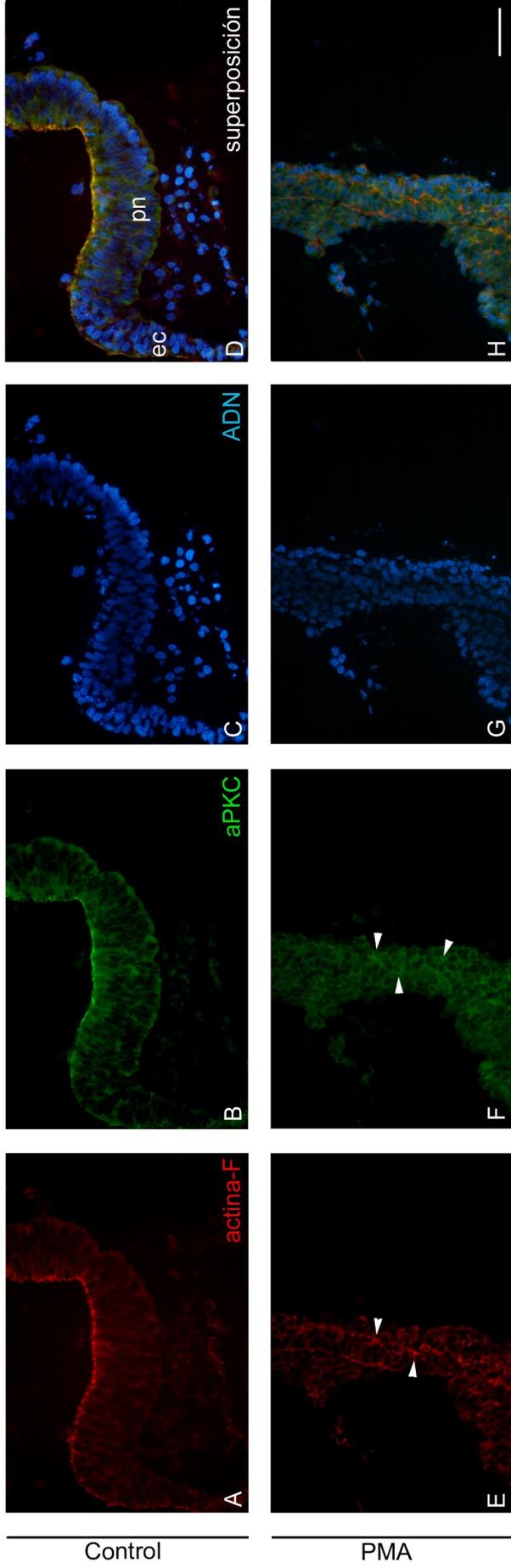
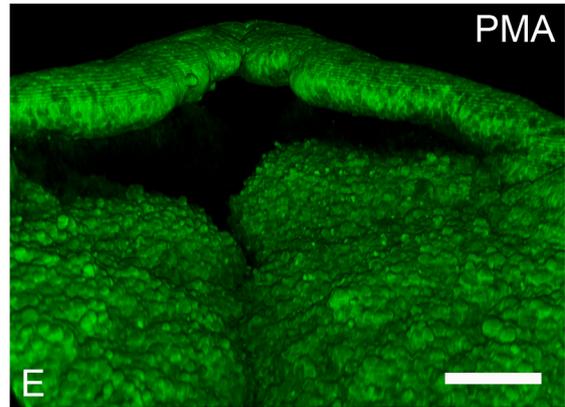
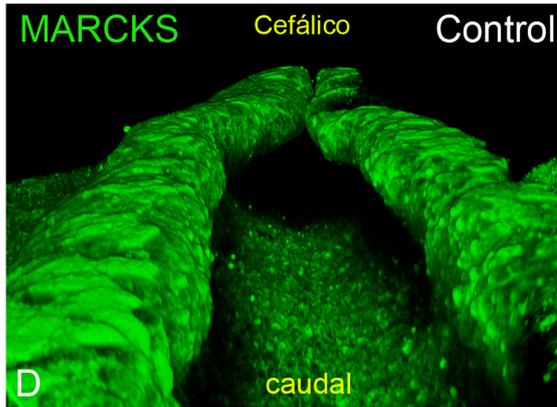
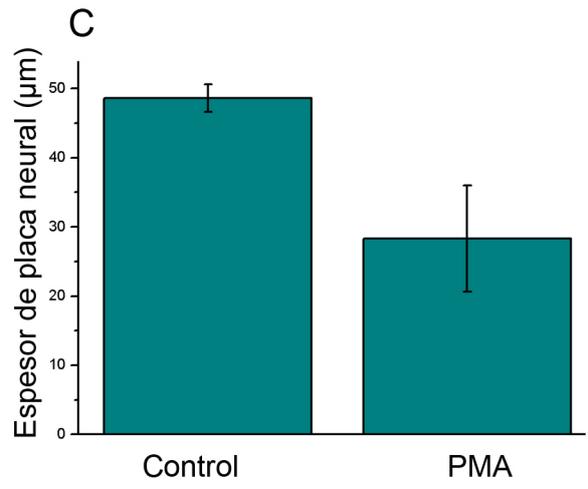


Figura 4. Tratamiento farmacológico con 5 μ M PMA desde HH8 sobre embriones en cultivo por 3 horas. Efectos en la morfología de la placa neural. **A-B.** Preparaciones de embriones enteros. **A.** Embrión control (DMSO). Se observa el tubo neural, los pliegues neurales y somites. **B.** Embrión bajo tratamiento farmacológico. Se observa el neuroporo anterior totalmente abierto (asterisco) y un pronunciado ensanchamiento de la placa neural que abarca el romboencéfalo hasta el nivel del primer somite (puntas de flecha). **C:** Medida del espesor promedio de la placa neural en embriones control (2) y tratados (3). Barra: desvío estándar. **D-E.** Reconstrucciones tridimensionales a partir de planos confocales de embriones bajo tratamiento con 5 μ M PMA desde HH8 en cultivo por 3 horas, inmunomarcados con el anticuerpo policlonal anti-MARCKS Polo52. **D.** Embrión control. Se observa los pliegues neurales y el tubo neural. **E.** Embrión tratado. Se observa un ensanchamiento de la placa neural y *blebs* en la región apical de las células neuroepiteliales. A su vez, se aprecian ondulaciones en la placa neural y curvaturas del punto de bisagra medial. Barras: A-B, 300 μ m.; D-E, 100 μ m.



En la figura 4 se muestran reconstrucciones tridimensionales a partir de planos confocales de embriones *in toto* bajo el tratamiento previamente mencionado. En el embrión control se observan los pliegues neurales (que mantienen la distancia entre ambos pliegues constante a lo largo del eje rostro-caudal) y la superficie apical de las células de la placa neural. Sin embargo, los embriones bajo exposición a PMA presentan un ensanchamiento muy grande de la placa neural, evidenciado por la distancia entre los pliegues neurales. A su vez, se evidencian ondulaciones en la placa neural y curvaturas de la bisagra media con respecto al eje rostro-caudal. Por otro lado, se pueden observar a nivel de la superficie de la placa neural, protrusiones o *blebs* de membrana apical que no se encuentran en la situación control. Asimismo, estos *blebs* están enriquecidos en MARCKS de la misma forma que la membrana apical del embrión control.

Finalmente, los efectos del PMA sobre embriones en estadio HH8 también se evidencian en una disminución de aproximadamente un 20% en el espesor de la placa neural con respecto al control (figura 4). A su vez, los embriones bajo tratamiento farmacológico presentan una mayor variabilidad en la medida del espesor de la placa evidenciado por el desvío estándar con respecto a la situación control (figura 4).

Efecto del PMA sobre la polaridad neuroepitelial

Con el objetivo de determinar si ocurren alteraciones en la polaridad del neuroepitelio, realizamos cortes transversales de embriones bajo tratamiento farmacológico y embriones control. En la figura 5 se observa la morfología general de una placa neural en proceso de cierre. Se puede apreciar la distribución del citoesqueleto de actina como anillos en las células, por debajo del dominio apical (figura 5 y 6).

Cuando analizamos los embriones que sufrieron la exposición a PMA observamos una alteración en la disposición del citoesqueleto de actina. Particularmente, la estructura regular de anillos subapicales en la placa neural de embriones control, es sustituida por paquetes irregulares de microfilamentos (figura

5 y 6). Por otra parte, los *blebs* de membrana apical mencionados anteriormente también poseen filamentos de actina, que se ubican en una muy delgada capa en estrecha asociación con la membrana plasmática (figura 6).

Al analizar la localización subcelular del marcador apical aPKC en las células neuroepiteliales, notamos una alteración en su localización subcelular. Bajo el tratamiento farmacológico, aPKC sufrió un desplazamiento en su localización, presentándose enriquecida en los *blebs* de membrana apical. A su vez encontramos aPKC en las regiones donde se encuentran los paquetes irregulares de filamentos de actina (figura 6).

La placa neural es un epitelio pseudoestratificado, dicha característica está dada por la localización de los núcleos a distintas alturas con respecto al eje ápico-basal del tejido, lo que le confiere el aspecto de poseer múltiples capas (figura 5). Sin embargo, en los embriones bajo tratamiento con PMA, los núcleos presentaron una distribución anómala dentro de la placa neural. Lejos de presentar núcleos a distintas alturas dando la impresión de ser un epitelio estratificado como en el embrión control, la mayor parte de éstos se localizan en la región basal de las células, mientras que unos pocos núcleos lo hacen de forma ectópica, por encima de los mencionados paquetes de actina (figura 5). Por otro lado, el centrosoma, estructura polarizada en las células, presentó una redistribución subcelular en los embriones bajo tratamiento farmacológico. En la placa neural de un embrión sin tratamiento, el centrosoma, evidenciado con un anticuerpo anti- γ -tubulina, se encuentra en la región apical de las células neuroepiteliales (figura 7). Sin embargo, en los embriones tratados con el éster de forbol, los centrosomas poseen una distribución aparentemente aleatoria a lo largo del eje ápico-basal de las células neuroepiteliales (figura 7). Finalmente, cuando analizamos la presencia de N-CAM, encontramos en los embriones control una señal enriquecida en la región apical de la placa neural. Al analizar los embriones expuestos a PMA observamos una disminución general en la señal en toda la placa neural, sin embargo encontramos una leve señal en una región enriquecida en MARCKS en los *blebs* de membrana apical (figura 8).

Figura 5. Tratamiento farmacológico con 5 μ M PMA desde HH8 sobre embriones en cultivo por 3 horas. Morfología de la placa neural y distribución de aPKC. **A-D.** Corte transversal de tubo neural de embrión control (DMSO). **A.** Se observa el citoesqueleto de actina utilizando el marcador de actina filamentosa faloidina-TRITC. Se puede apreciar un enriquecimiento en microfilamentos de actina en la región apical de las células de la placa neural. **B.** Inmunomarcado de aPKC. Se observa una señal predominante en la región apical de las células neuroepiteliales. **C.** Marcado fluorescente de núcleos con Hoechst 33342. Se pueden observar los núcleos a distintas alturas con respecto al eje ápico-basal de la placa neural. **D.** Superposición de la señal del citoesqueleto de actina, aPKC y núcleos. **E-H.** Corte transversal de embrión bajo tratamiento con PMA. **E.** Se observan paquetes de actina filamentosa en la placa neural y finos filamentos de actina en estrecha asociación con los *blebs* de membrana apical. **F.** Se evidencia la localización subcelular de aPKC, enriquecida en los *blebs* de membrana apical y en regiones donde se encuentran los paquetes de microfilamentos de actina. **G.** Marcado del ADN. Se observan los núcleos concentrados en la región basal de las células y ciertos núcleos ectópicos (puntas de flecha). **H.** Superposición de la señal de microfilamentos de actina, aPKC y núcleos. Imágenes tomadas con un microscopio de epifluorescencia. pn: placa neural, md: mesodermo, ec: ectodermo, n: notocorda. Barra: 50 μ m.

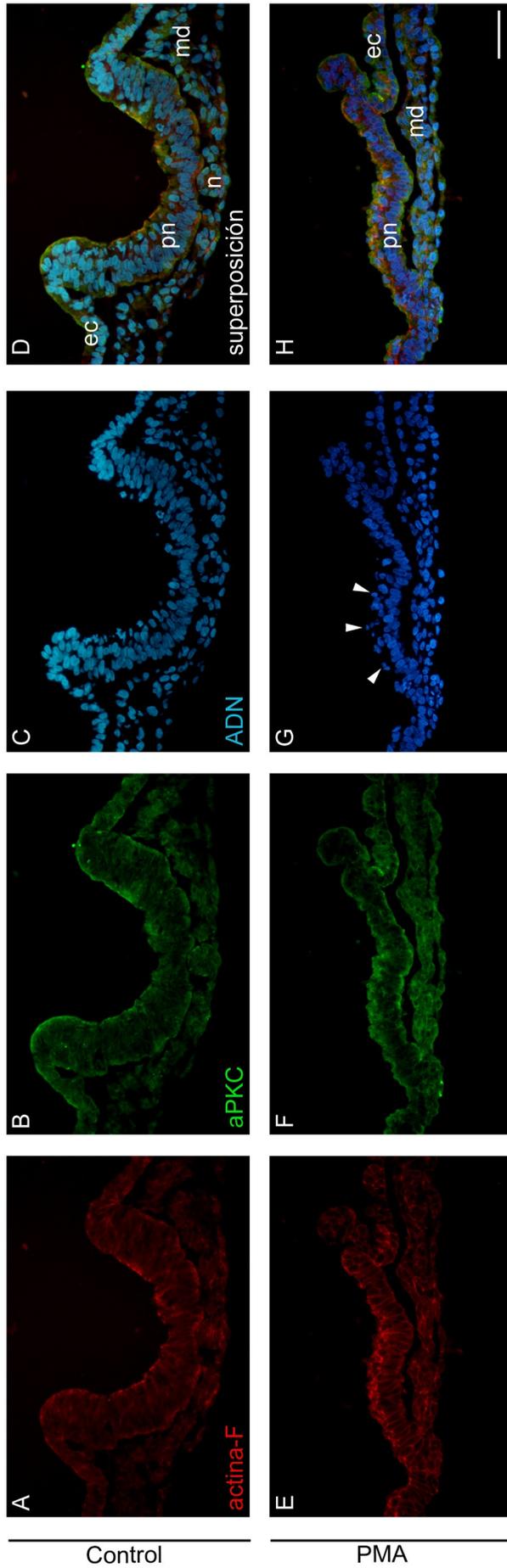
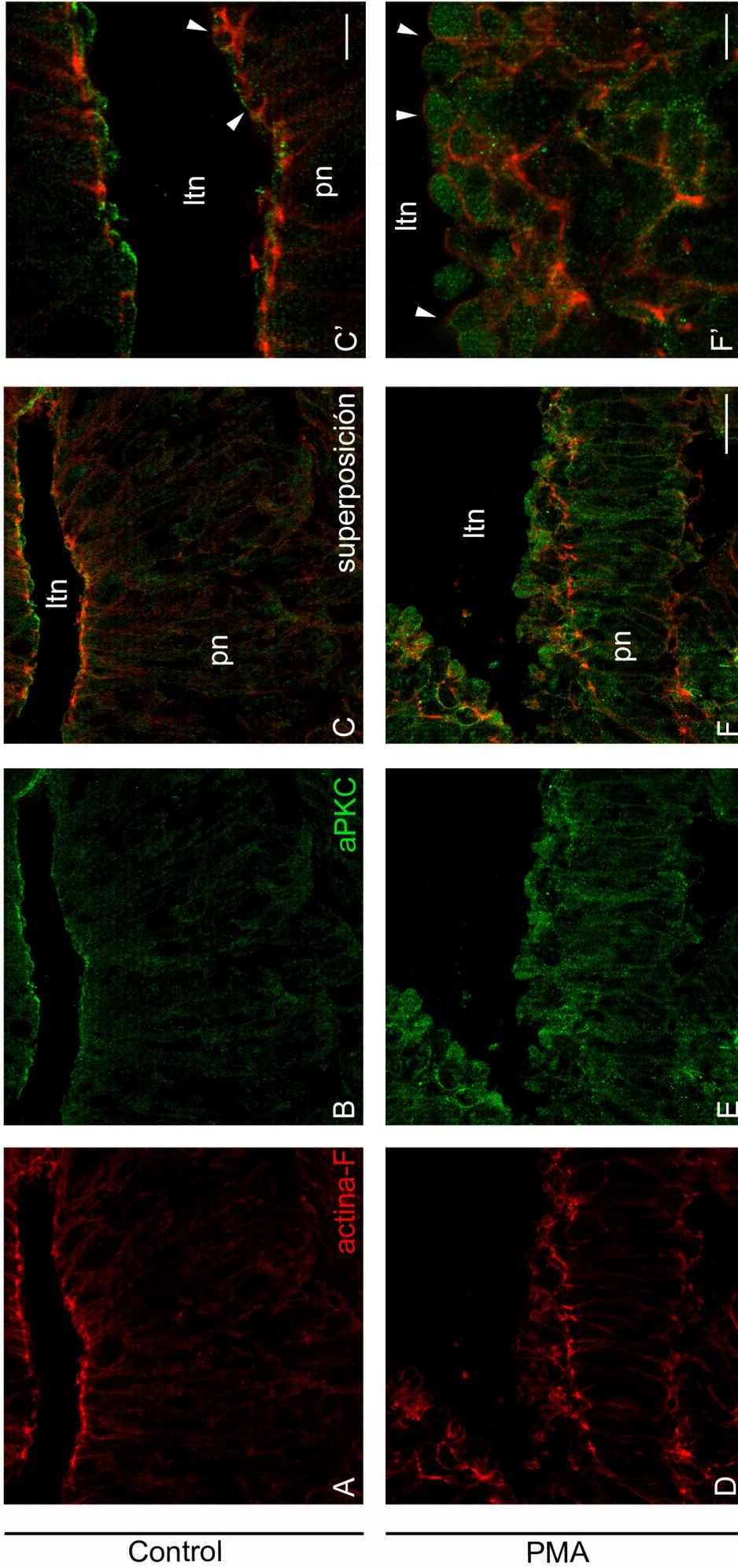


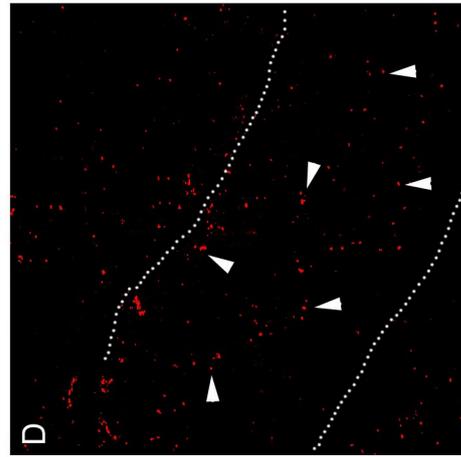
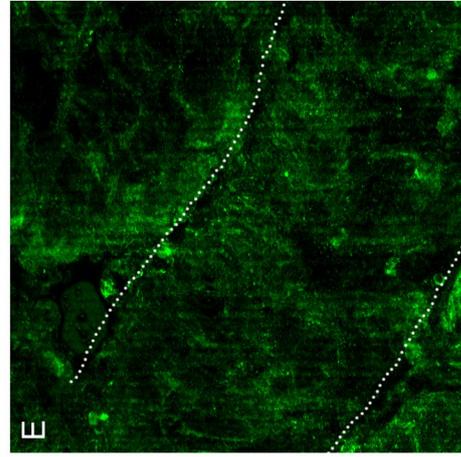
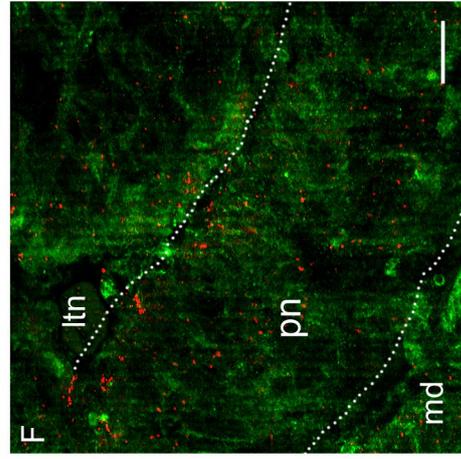
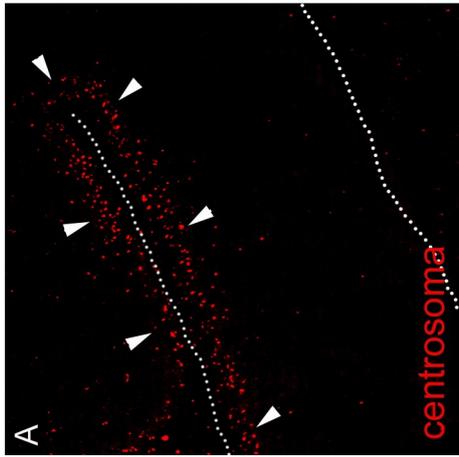
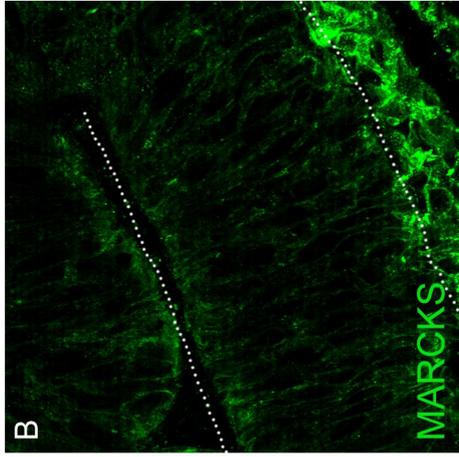
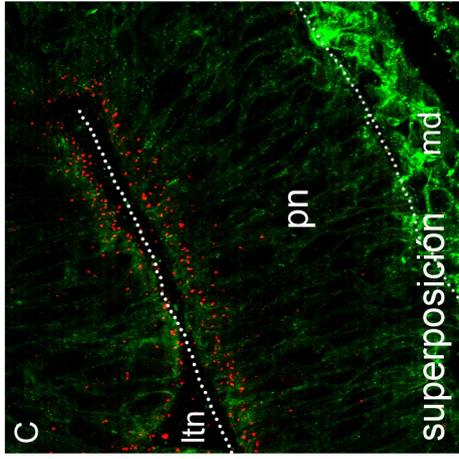
Figura 6. Imágenes de alta resolución de embriones bajo tratamiento farmacológico, localización subcelular de aPKC. **A-C´.** Corte transversal de tubo neural de embrión control (DMSO). **A.** Se observa el citoesqueleto de actina utilizando el marcador de actina filamentosa faloidina-TRITC. Se puede apreciar un enriquecimiento en microfilamentos de actina en la región apical de las células de la placa neural. **B.** Inmunomarcado de aPKC. Se observa una señal predominante en la región apical de las células neuroepiteliales. **C.** Superposición de microfilamentos de actina y aPKC. **C´.** Imagen a mayor aumento de la región apical de la figura C. Se observan los anillos corticales de actina (puntas de flecha). **D-F´.** Corte transversal de embrión bajo tratamiento con PMA. **D.** Se observan paquetes de actina filamentosa en la placa neural y finos filamentos de actina en estrecha asociación con los *blebs* de membrana apical. **E.** Se evidencia la localización subcelular de aPKC, enriquecida en los *blebs* de membrana apical y en regiones donde se encuentran los paquetes de microfilamentos de actina. **F.** Superposición de la señal de aPKC y filamentos de actina. **F´.** Imagen a mayor aumento de los *blebs* de membrana apical de la figura F. Se observan los filamentos de actina en estrecha asociación con la membrana plasmática. ltn: luz del tubo neural; pn: placa neural. Imágenes tomadas a partir de un microscopio confocal. Barras: A-F, 10 µm; C´-F´, 5 µm.



Control

PMA

Figura 7. Imágenes de alta resolución de embriones bajo tratamiento farmacológico, localización de los centrosomas en la placa neural. **A-C.** Corte transversal de tubo neural de embrión control (DMSO). **A.** Inmunomarcado del centrosoma utilizando un anticuerpo monoclonal anti- γ -tubulina. Se observan los centrosomas localizados en la región apical de las células de la placa neural (puntas de flecha). **B.** Inmunomarcado de MARCKS total con el anticuerpo policlonal Polo52. Se observa señal en la placa neural, en especial en la región apical de las células neuroepiteliales y una fuerte señal proveniente del mesodermo. **C:** Superposición de la señal de MARCKS y del centrosoma. **D-F.** Corte transversal de embrión bajo tratamiento con PMA. **D.** Se observa la distribución de los centrosomas a lo largo del eje ápico-basal (puntas de flecha). **E.** Se aprecia la señal de MARCKS en el citoplasma de las células de la placa neural. **F.** Superposición de la señal de MARCKS y del centrosoma. Imágenes tomadas a partir de un microscopio confocal. ltn: luz del tubo neural, md: mesodermo, pn: placa neural. Barra: 20 μ m.



Control

PMA

Figura 8. Tratamiento farmacológico con 5 μ M PMA desde HH8 sobre embriones en cultivo por 3 horas. Distribución de MARCKS y N-CAM en la placa neural. **A-D.** Corte transversal de tubo neural de embrión control (DMSO). **A.** Se observa el inmunomarcado realizado con el anticuerpo monoclonal 5e de la molécula de adhesión neural N-CAM (marcador de placa neural). Se puede apreciar que la señal proviene mayoritariamente de la placa neural. **B.** Inmunomarcado de MARCKS total con el anticuerpo policlonal Polo52. Se observa señal en la placa neural, en especial en la región apical de las células neuroepiteliales y una fuerte señal proveniente del mesodermo. **C.** Marcado fluorescente del ADN con Hoechst 33342. Se pueden observar los núcleos a distintas alturas con respecto al eje ápico-basal de la placa neural. **D.** Superposición de la señal de MARCKS, N-CAM y núcleos. Nótese la colocalización entre MARCKS y N-CAM en la región apical de las células de la placa neural. **E-H.** Corte transversal de embrión bajo tratamiento con PMA. **E.** Se observa una débil señal de N-CAM y un leve enriquecimiento en la región apical. **F** Se aprecia un enriquecimiento en la señal de MARCKS en los *blebs* de membrana apical y en la región basal de las células neuroepiteliales. A su vez, se observa una fuerte señal en el mesodermo. **G.** Marcado nuclear. Se observan los núcleos concentrados en la región basal de las células y ciertos núcleos ectópicos (puntas de flecha). **H.** Superposición de la señal de N-CAM, MARCKS y núcleos. Nótese la colocalización de MARCKS y N-CAM en *blebs* con núcleos ectópicos (puntas de flecha). Imágenes tomadas con un microscopio de epifluorescencia. pn: placa neural, md: mesodermo, ec: ectodermo, n: notocorda. Barra: 50 μ m.

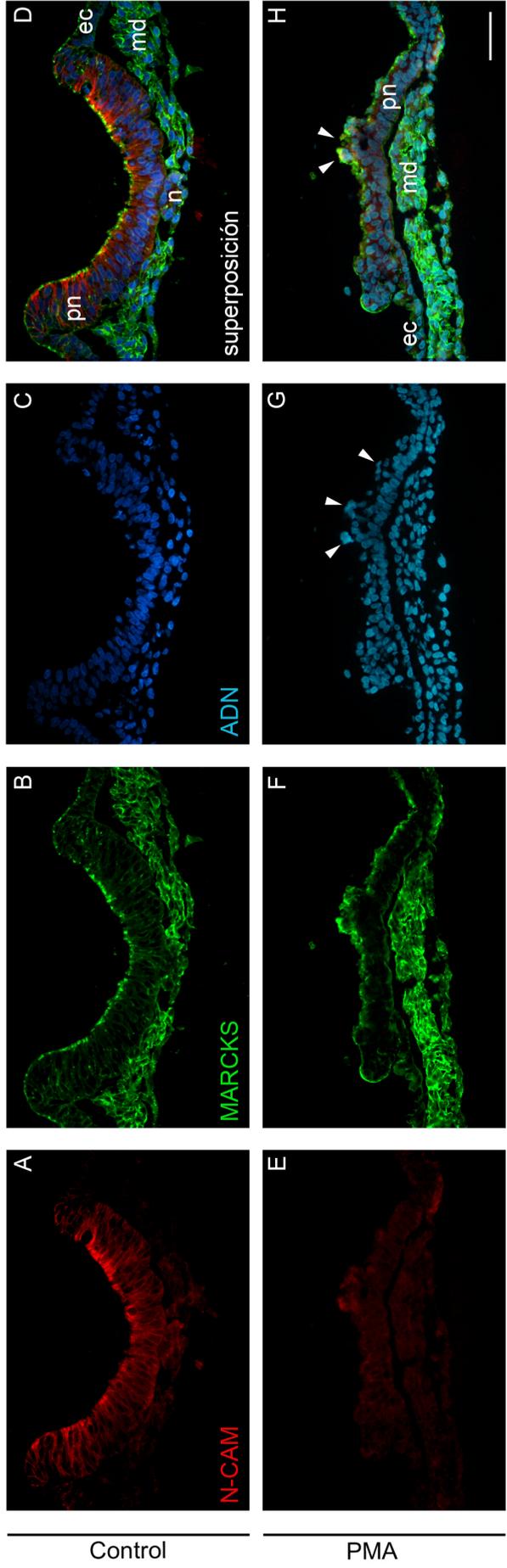
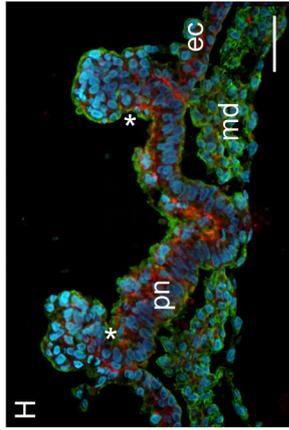
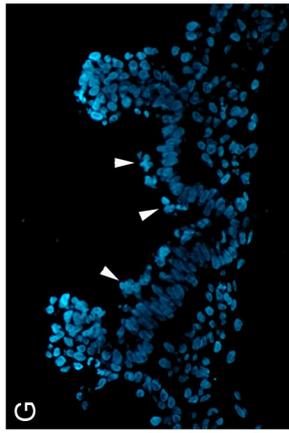
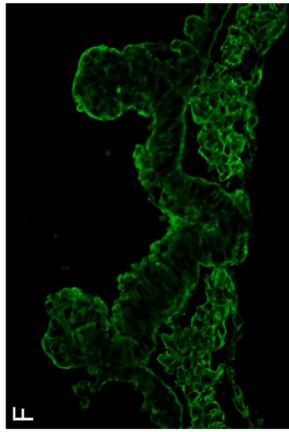
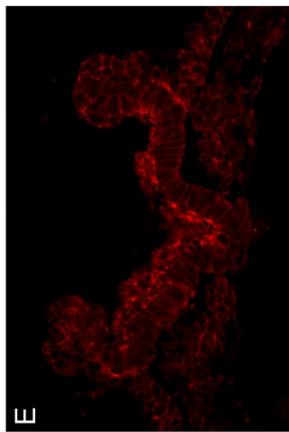
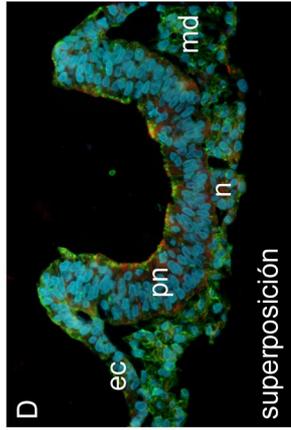
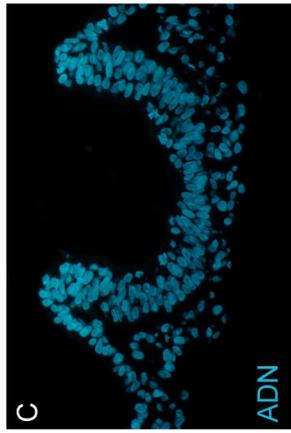
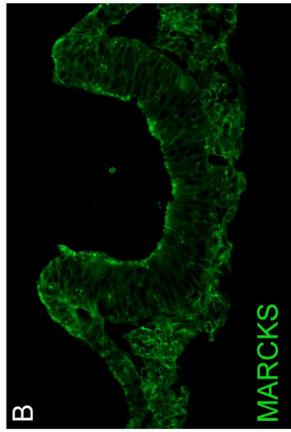
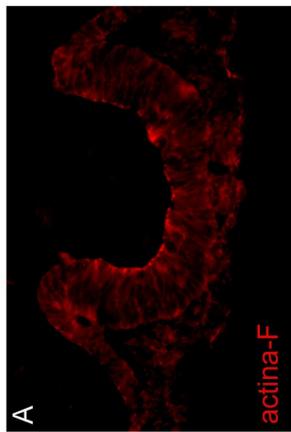


Figura 9. Tratamiento farmacológico con 5 μ M PMA desde HH8 sobre embriones en cultivo por 3 horas. Distribución de MARCKS en la placa neural. **A-D.** Corte transversal de tubo neural de embrión control (DMSO). **A.** Se observa el citoesqueleto de actina utilizando el marcador de actina filamentosa faloidina-TRITC. Se puede apreciar un enriquecimiento en microfilamentos de actina en la región apical de las células de la placa neural. **B.** Inmunomarcado de MARCKS total con el anticuerpo policlonal Polo52. Se observa señal en la placa neural, en especial en la región apical de las células neuroepiteliales y una fuerte señal proveniente del mesodermo. **C.** Marcado fluorescente de núcleos con Hoechst 33342. Se pueden observar los núcleos a distintas alturas con respecto al eje ápico-basal de la placa neural. **D.** Superposición de la señal de MARCKS, N-CAM y ADN. **E-H.** Corte transversal de embrión tratado. **E.** Se aprecian paquetes de filamentos de actina en las células neuroepiteliales y finos filamentos de actina en estrecha asociación con los *blebs* de membrana apical. **F.** Se observa la distribución de MARCKS, enriquecida en los blebs de membrana apical y en la región basal de las células de la placa neural. A su vez, posee una fuerte señal el mesodermo. **G.** Marcaje del ADN Se observan los núcleos concentrados en la región basal de las células y ciertos núcleos ectópicos (puntas de flecha). **H.** Superposición de la señal de MARCKS, ADN y filamentos de actina. Se evidencian los puntos de bisagra dorso-laterales (*). Imágenes tomadas con un microscopio de epifluorescencia. pn: placa neural, md: mesodermo, ec: ectodermo, n: notocorda. Barra: 50 μ m.



Control

PMA

Efecto en la distribución subcelular de MARCKS en células neuroepiteliales bajo tratamiento con PMA

MARCKS se acumula transitoriamente en el borde apical de la placa neural en una íntima relación con el citoesqueleto cortical de actina durante el proceso de formación del tubo neural (Zolessi y Arruti, 2001). Bajo condiciones de cultivo pudimos reproducir la descripción realizada a partir de embriones incubados *in ovo* por Zolessi y Arruti (figura 9).

Los embriones tratados con el agonista de PKC poseen un cambio dramático en la distribución subcelular de MARCKS. De ser una proteína mayoritariamente anclada a la región apical de las células de placa neural, sufre una translocación al citoplasma donde se distribuye en forma de gránulos irregulares (figura 9). Con el objetivo de analizar en mayor detalle la localización subcelular de MARCKS, realizamos cuantificaciones de intensidad de fluorescencia a partir de transectas de placa neural en sentido ápico-basal. Encontramos que MARCKS posee un enriquecimiento en los *blebs* de membrana apical. Sin embargo, una cierta fracción de MARCKS se ve acumulada cerca de los paquetes irregulares de filamentos de actina, de igual modo que la situación control (figura 10). Otra fracción minoritaria se encuentra distribuida en el citoplasma que rodea el núcleo (figura 10).

Con el objetivo de determinar si efectivamente el PMA estaba activando PKC y dicha activación llevaba a una fosforilación de MARCKS, realizamos inmunodetecciones contra la isoforma de MARCKS fosforilada en el dominio efector (p-MARCKS). Encontramos que dicha isoforma es casi indetectable en condiciones normales, salvo por una cierta señal en células mitóticas (que no sabemos si corresponde a MARCKS o a otro antígeno). En los embriones tratados con PMA existe una intensa señal de p-MARCKS en toda la extensión de la placa neural, lo que nos lleva a concluir que existe una activación de PKC por parte del éster de forbol. Al igual que para MARCKS total, su distribución subcelular es citoplasmática granular, enriquecida en los *blebs* de membrana apical. Asimismo, una cierta fracción de p-MARCKS permanece alrededor de la región donde se encuentran los haces irregulares de actina filamentosa (figura 11 y 12).

Figura 10. Tratamiento farmacológico con 5 μ M PMA desde HH8 sobre embriones en cultivo por 3 horas. Localización subcelular de MARCKS. **A-C.** Corte transversal de tubo neural de embrión control (DMSO). **A.** Se observa el citoesqueleto de actina utilizando el marcador de actina filamentosa faloidina-TRITC. Se puede apreciar un enriquecimiento en microfilamentos de actina en la región apical de las células de la placa neural. **B.** Inmunomarcado de MARCKS total con el anticuerpo policlonal Polo52. Se observa señal en la placa neural, en especial en la región apical de las células neuroepiteliales. **C.** Superposición de la señal de MARCKS y de los filamentos de actina. **D-F.** Corte transversal de embrión bajo tratamiento con PMA. **D.** Se observan paquetes de actina filamentosa en la placa neural (puntas de flecha) y finos filamentos de actina en estrecha asociación con los *blebs* de membrana apical. **E.** Se evidencia un enriquecimiento en la señal de MARCKS en la región donde se encuentran los paquetes de filamentos de actina (puntas de flecha), en menor medida se encuentra señal en los *blebs* de membrana apical. A su vez, la señal de MARCKS se encuentra enriquecida en el mesodermo. **F.** Superposición de la señal de MARCKS con el citoesqueleto de actina. Barra: 10 μ m. **G.** Cuantificación de intensidad de fluorescencia de MARCKS a partir de transectas en sentido ápico-basal de placa neural. Se aprecian los perfiles de fluorescencia para embriones control y embriones bajo tratamiento con PMA. **H.** Promedio de intensidad de fluorescencia del citoplasma celular y *blebs* de membrana apical de embriones control y tratados con PMA. Imágenes tomadas a partir de un microscopio confocal. md: mesodermo. Barra: 10 μ m.

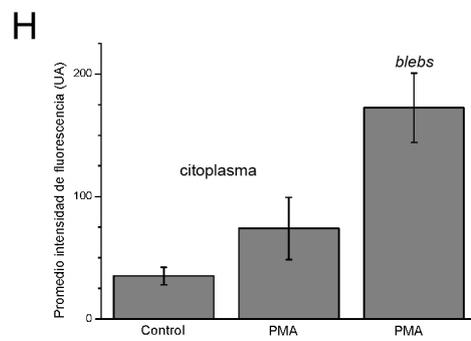
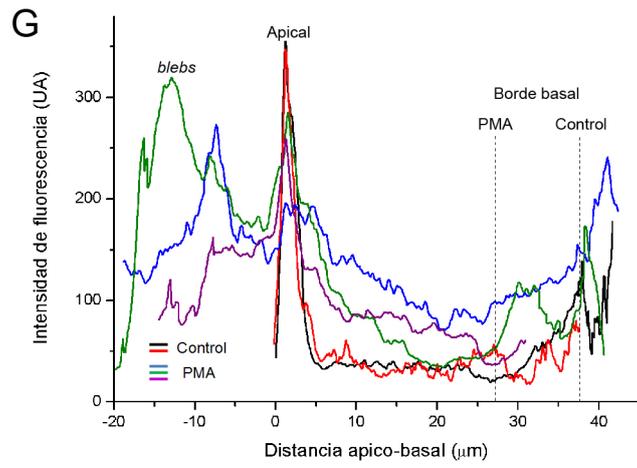
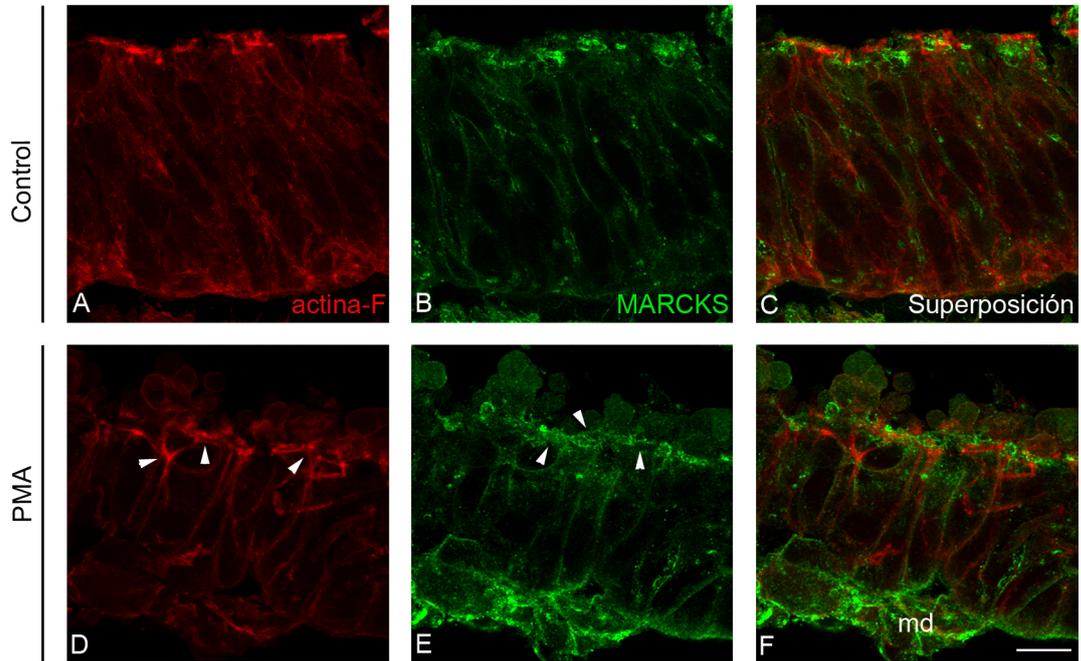


Figura 11. Tratamiento farmacológico con 5 μ M PMA desde HH8 sobre embriones en cultivo por 3 horas. Morfología de la placa neural y localización de MARCKS fosforilada en el ED. **A-D.** Corte transversal de tubo neural de embrión control (DMSO). **A.** Se observa el citoesqueleto de actina utilizando el marcador de actina filamentosa faloidina-TRITC. Se puede apreciar un enriquecimiento en microfilamentos de actina en la región apical de las células de la placa neural. **B.** Inmunomarcado de p-MARCKS con el anticuerpo policlonal anti-fosfo S152-S156 MARCKS. Se observa señal únicamente en las células que están en mitosis. **C.** Marcado fluorescente del ADN con Hoechst 33342. Se pueden observar los núcleos a distintas alturas con respecto al eje ápico-basal de la placa neural. **D.** Superposición de la señal de p-MARCKS, filamentos de actina y núcleos. **E-H.** Corte transversal de embrión bajo tratamiento farmacológico con PMA. **E.** Se aprecian paquetes de actina filamentosa (puntas de flecha) y finos filamentos de actina en estrecha asociación con los *blebs* de membrana apical. **F.** Se aprecia la alta señal de p-MARCKS comparado con la situación control. Se encuentra enriquecida en los *blebs* de membrana apical y en las regiones donde se encuentran los paquetes de actina filamentosa. **G.** Se observan los núcleos concentrados en la región basal de las células y ciertos núcleos ectópicos (puntas de flecha). **H.** Superposición de la señal de p-MARCKS, núcleos y actina filamentosa. Imágenes tomadas con un microscopio de epifluorescencia. pn: placa neural, md: mesodermo, ec: ectodermo, n: notocorda. Barra 50 μ m.

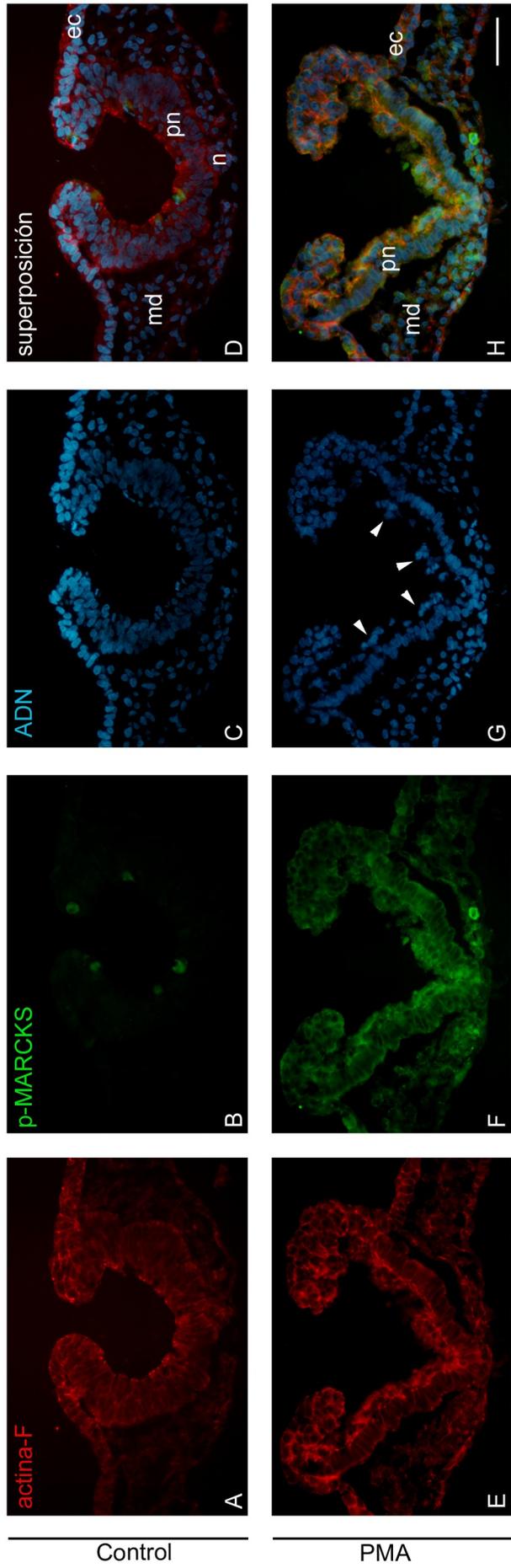
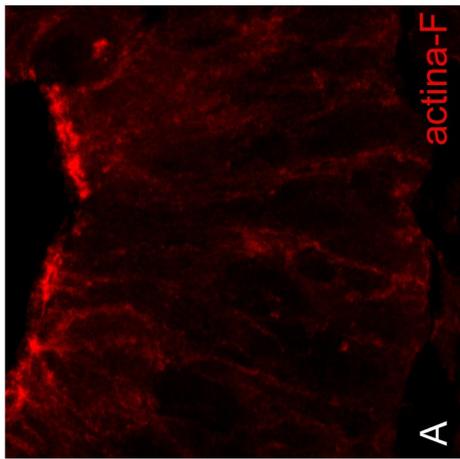
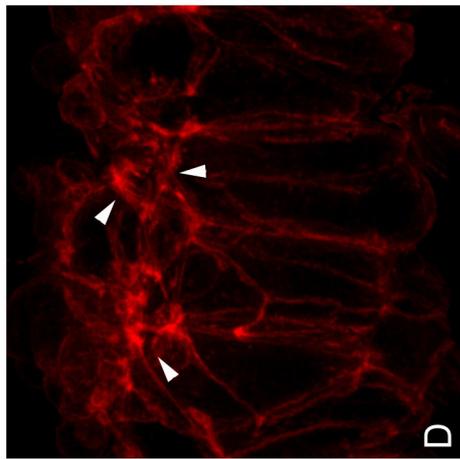
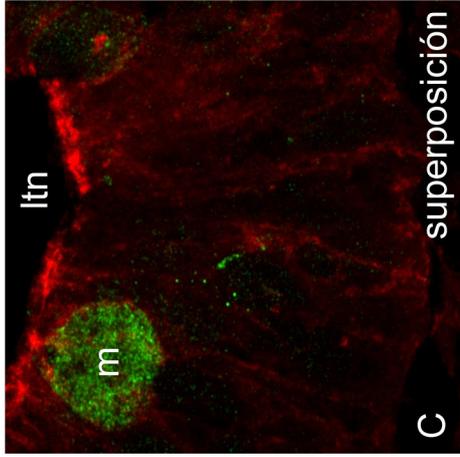
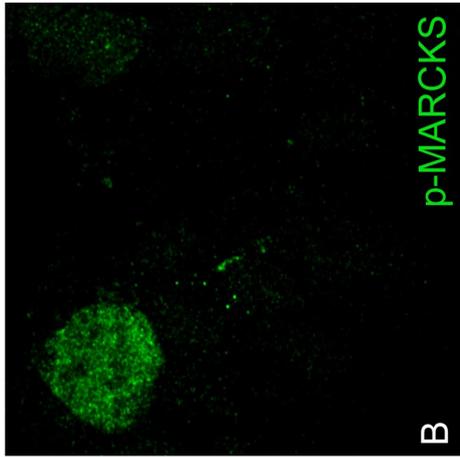


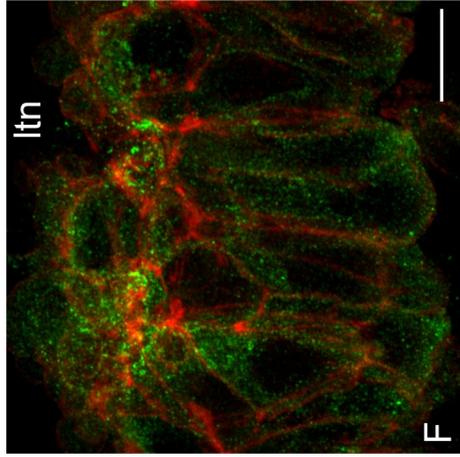
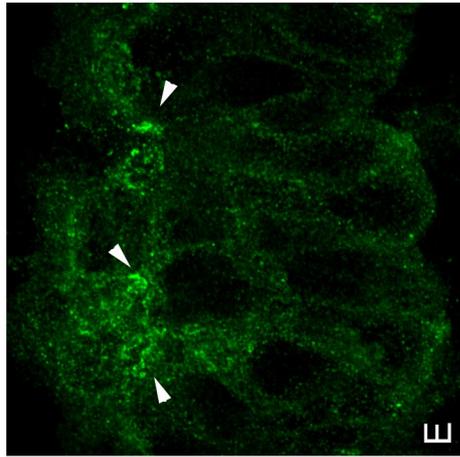
Figura 12. Imágenes de alta resolución de embriones bajo tratamiento farmacológico, localización subcelular de p-MARCKS. **A-C.** Corte transversal de tubo neural de embrión control (DMSO). **A.** Se observa el citoesqueleto de actina utilizando el marcador de actina filamentosa faloidina-TRITC. Se puede apreciar un enriquecimiento en microfilamentos de actina en la región apical de las células de la placa neural. **B.** Inmunomarcado de p-MARCKS. Se observa señal únicamente en las células que están en mitosis. **C.** Superposición de la señal de p-MARCKS y de los filamentos de actina. **D-E.** Corte transversal de embrión bajo tratamiento farmacológico con PMA. **D.** Se aprecian paquetes de actina filamentosa (puntas de flecha) y finos filamentos de actina en estrecha asociación con los *blebs* de membrana apical. **E.** Se aprecia la alta señal de p-MARCKS comparado con la situación control. Se encuentra en forma granular en los *blebs* de membrana apical, en las regiones donde se presentan los paquetes de actina filamentosa (puntas de flecha) y en el citoplasma perinuclear. **F.** Superposición entre los filamentos de actina y p-MARCKS. Imágenes tomadas a partir de un microscopio confocal. ltn: luz del tubo neural, m: célula mitótica. Barra: 10 μm .



Control



PMA



Efecto del tratamiento con PMA sobre los movimientos morfogenéticos de la neurulación

Como se mencionó en la introducción, el cierre del tubo neural se lleva a cabo por fuerzas intrínsecas y extrínsecas al neuroepitelio. Las fuerzas intrínsecas dependerían en mayor medida de la constricción apical de las células de la placa neural en los puntos de bisagra. Por otro lado, las fuerzas extrínsecas son responsabilidad de la tracción generada por la interacción entre el ectodermo y la región de los pliegues neurales. Cuando analizamos cortes transversales de placas neurales bajo tratamiento farmacológico, observamos que los puntos de bisagra mediales mantienen su constricción apical (figura 13), sin embargo los puntos de bisagra dorso-laterales no son evidentes. Como resultado se obtiene una placa neural totalmente abierta como se muestra en la figura 13. El efecto en los puntos de bisagra dorso-laterales difiere dependiendo del grado de avance en la neurulación. Por ejemplo, en la figura 11 se pueden observar defectos en la morfología de la placa neural tratada, pero los puntos de bisagra dorso-laterales permanecen.

Si analizamos los pliegues neurales (región de interacción entre la placa neural y el ectodermo no neural), observamos en la situación control una clara diferenciación entre ambas capas, determinado por las diferencias morfológicas entre los dos tipos celulares. Siendo fusiformes las células neuroepiteliales y cuboidales las células del ectodermo aledaño. Sin embargo, en los embriones con exposición al PMA, existe una reorganización de dicha región, con un cambio en la morfología de las células que lo componen que dificulta diferenciar entre ambos tipos celulares (figura 14). Por último en la figura 15 se presenta la localización de p-MARCKS en el ectodermo lateral no neural próximo a la placa neural. En la situación control se observa una señal muy baja de p-MARCKS, al igual que para las células neuroepiteliales descritas anteriormente. Los embriones bajo tratamiento con PMA presentan un aumento en la señal de p-MARCKS, que se ubica en forma de gránulos citoplásmicos. Sin embargo, el fenotipo es menos severo con respecto a la placa neural, sin la presencia de *blebs* de membrana apical ni acúmulos de actina filamentosa.

Figura 13. Tratamiento farmacológico con PMA 5 μ M desde HH8 sobre embriones en cultivo por 3 horas. Morfología de la placa neural y distribución subcelular de MARCKS. En **A** se puede apreciar la distribución subcelular de MARCKS en la placa neural, y la alta señal en el mesodermo. A su vez, se observa la distribución del citoesqueleto, utilizando el marcador de actina filamentosa faloidina-TRITC. **B.** Corte transversal de embrión tratado. MARCKS se encuentra enriquecida en los *blebs* apicales (puntas de flecha) y en las regiones donde se encuentran los paquetes de actina filamentosa. Se observa la morfología de la placa neural totalmente abierta, manteniéndose la bisagra medial. Imágenes tomadas con un microscopio de epifluorescencia. pn: placa neural, md: mesodermo, ec: ectodermo, n: notocorda. Barra: 50 μ m.

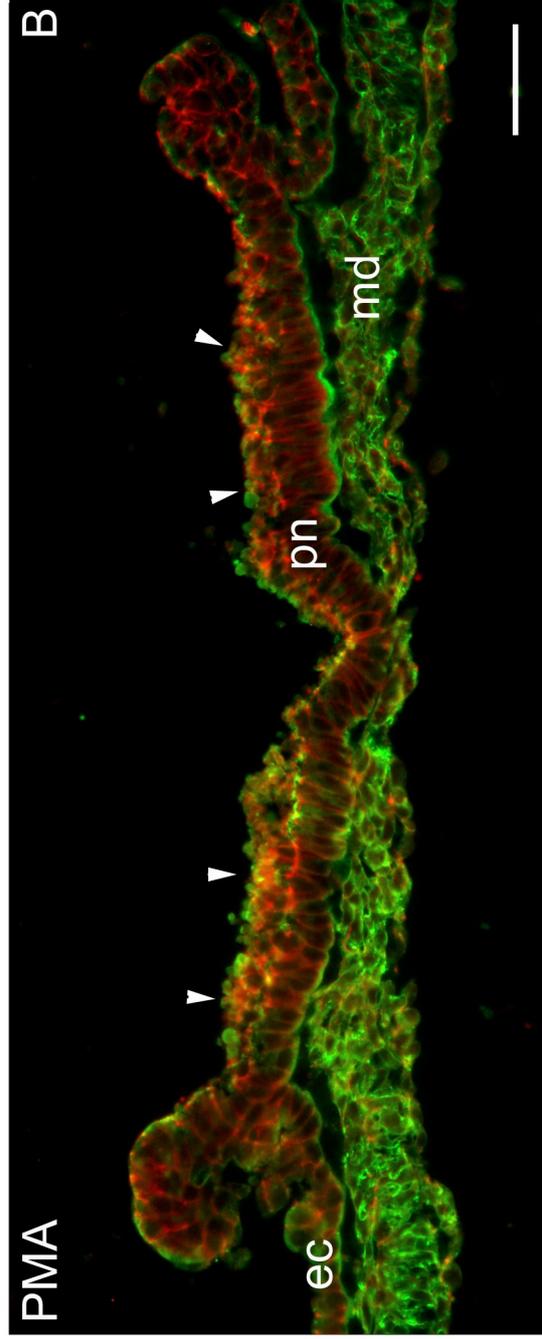
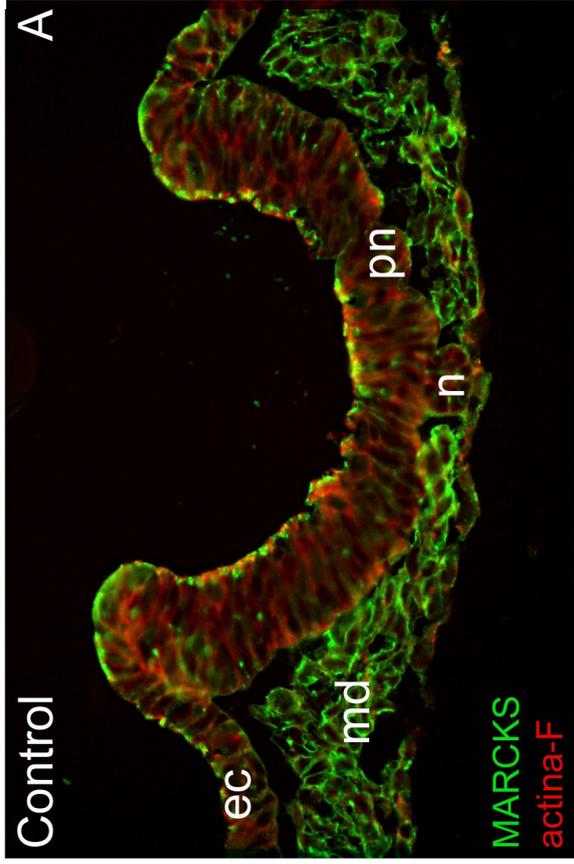
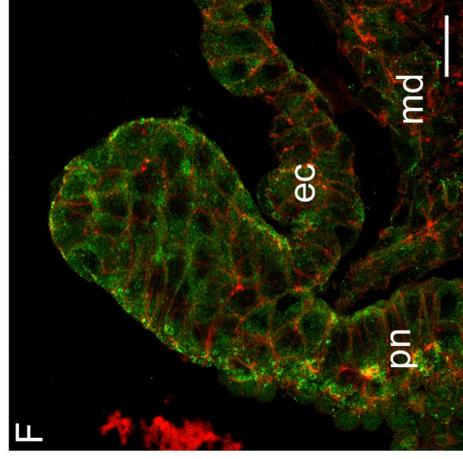
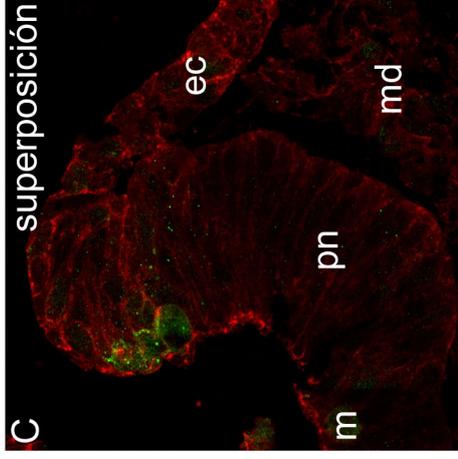
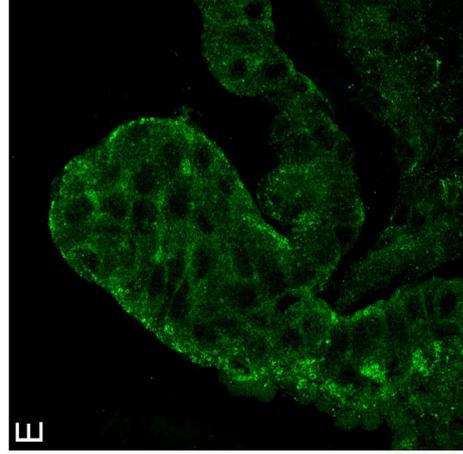
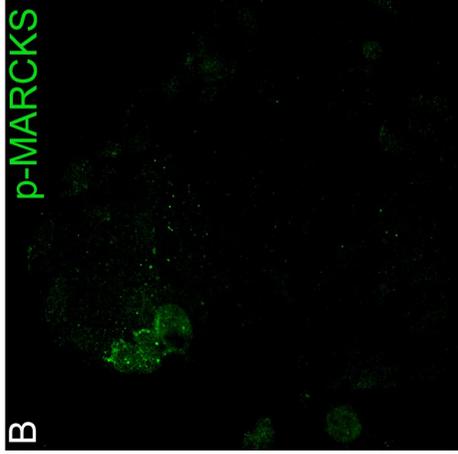
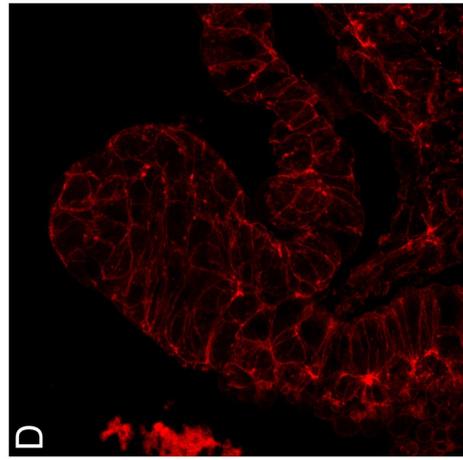
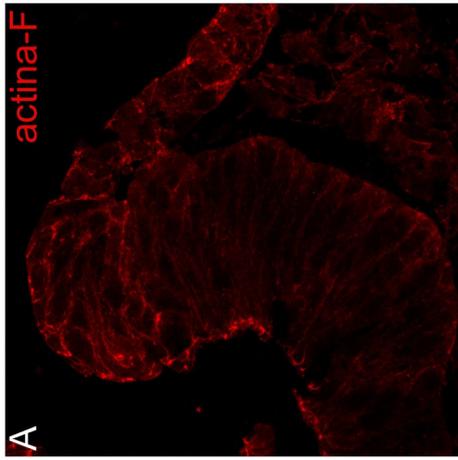


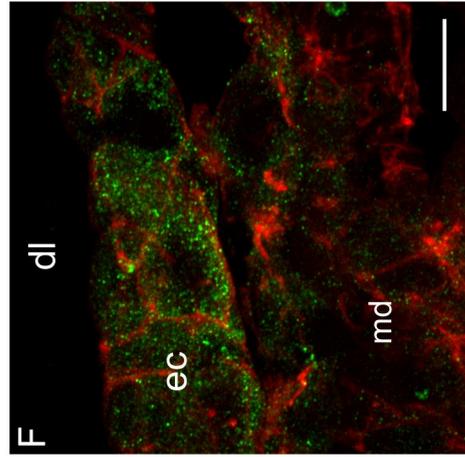
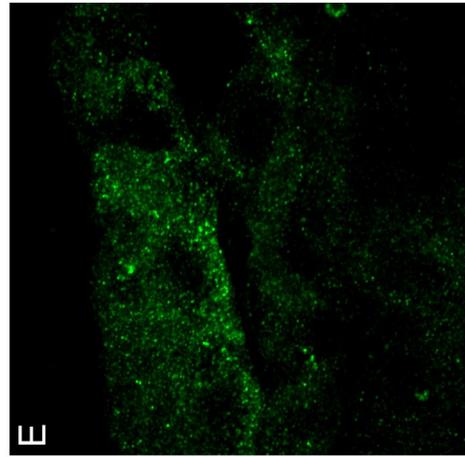
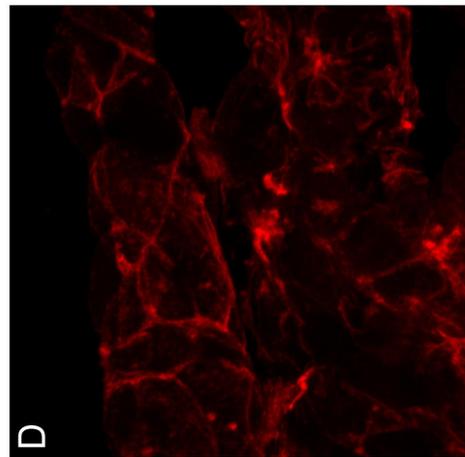
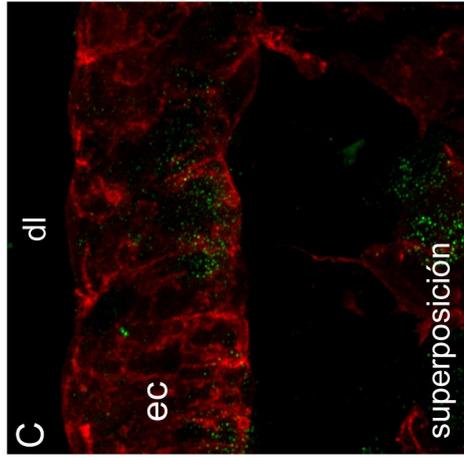
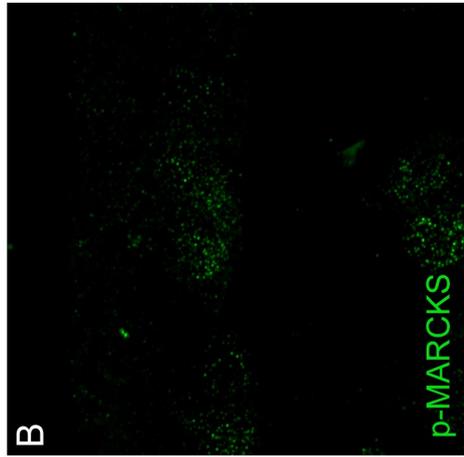
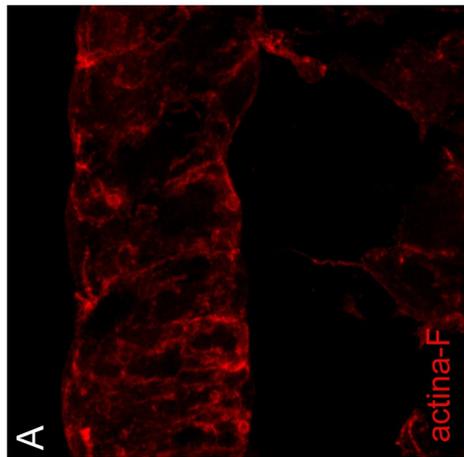
Figura 14. Localización subcelular de p-MARCKS en células del pliegue neural. **A-C.** Cortes transversales de pliegues neurales de embriones control (DMSO). **A.** Se observa el citoesqueleto de actina utilizando el marcador de actina filamentosa faloidina-TRITC. Se puede apreciar la distribución de los microfilamentos de actina en la placa neural y en el ectodermo aledaño. **B.** Inmunomarcado de p-MARCKS. Se observa señal únicamente en las células que están en mitosis. **C.** Superposición de la señal de p-MARCKS y de los filamentos de actina. **D-F.** Corte transversal de embrión bajo tratamiento farmacológico con PMA. **D.** Se aprecian *blebs* de membrana apical y paquetes de filamentos de actina únicamente en las células de la placa neural. **E.** Se observa una intensa señal citoplasmática en las regiones donde se encuentran los paquetes de actina filamentosa, además se encuentra un enriquecimiento en el borde del pliegue neural. **F.** Superposición de la señal de p-MARCKS y de los filamentos de actina. Imágenes tomadas con microscopía confocal. pn: placa neural, md: mesodermo, ec: ectodermo, m: célula mitótica. Barra: 20 μ m.



Control

PMA

Figura 15. Localización subcelular de p-MARCKS en células de ectodermo no neural. **A-C.** Cortes transversales de ectodermo aledaño a la placa neural de embriones control (DMSO). **A.** Se observa el citoesqueleto de actina utilizando el marcador de actina filamentosa faloidina-TRITC. **B.** Inmunomarcado de p-MARCKS. Se observa una leve señal citoplásmica granular en el ectodermo. **C.** Superposición de la señal de actina filamentosa y p-MARCKS. **D-F.** Corte transversal de embrión bajo tratamiento farmacológico con PMA. **D.** Se observa el citoesqueleto de actina, nótese la ausencia de paquetes de filamentos de actina y *blebs* apicales. **E.** Se observa una intensa señal de p-MARCKS citoplásmica granular, y en menor medida en el mesodermo. **F.** Superposición de la señal de p-MARCKS y actina filamentosa. Imágenes tomadas con microscopía confocal. dl: dorsal, md: mesodermo, ec: ectodermo. Barra: 10 μ m.



Control

PMA

Discusión

Tratamiento con PMA en embriones tempranos

Los embriones que sufrieron una exposición a PMA desde estadio HH3 y mantenidos en condiciones de cultivo durante 24 horas presentaron fenotipos muy severos. Dado que los tratamientos farmacológicos fueron iniciados en el estadio de línea primitiva (HH3), momento en que la gastrulación se está llevando a cabo, interpretamos que el fenotipo presentado se debe a una alteración en dicho proceso del desarrollo. Cabe destacar que durante la gastrulación se forman las tres capas germinales: ecto, meso y endodermo. Luego de formada la línea primitiva, las células del epiblasto comienzan a migrar a través de la misma y hacia dentro del blastocele, en donde formarán el endo y mesodermo (Gilbert, 2010). Se desprende, por lo tanto, que durante la gastrulación la migración celular es un proceso clave. Ilioka y colaboradores demostraron, en embriones de *Xenopus*, que MARCKS es necesaria para una correcta gastrulación (Ilioka et al., 2004). Utilizando morfolidos antisentido documentaron que la pérdida de la expresión de MARCKS afecta severamente los movimientos morfogenéticos realizados durante la gastrulación. A su vez, utilizando una construcción de MARCKS no miristilable demostraron que el anclaje a la membrana por medio del miristato es necesario para una correcta gastrulación. Asimismo, evidenciaron que la unión al citoesqueleto de actina es también necesaria para la generación de movimientos morfogenéticos correctos durante la gastrulación, utilizando una construcción pseudofosforilada en el ED que disminuye su afinidad por la actina filamentosa.

Por otro lado, se ha relacionado a MARCKS fosforilada en el ED con un aumento en la motilidad y migración celular en células de melanoma de ratón (Chen y Rotenberg, 2010). Es de particular interés este trabajo, ya que es la primera vez que se le adjudica a p-MARCKS una función en el citoplasma celular, en este caso promoviendo la motilidad y migración celular.

Es claro que movimientos complejos realizados por poblaciones celulares,

como se da en la gastrulación, necesitan de una regulación muy fina del citoesqueleto. En nuestros ensayos, la activación de PKC llevaría a una fosforilación masiva de MARCKS, por lo menos en las poblaciones que están en íntimo contacto con el medio de cultivo en el cual se adicionó la droga. Dadas las características del método de cultivo utilizado, son las células del epiblasto las que están en contacto más directo con el PMA. Una posible explicación para el fenotipo producido sería que la activación de PKC generaría, en las células que ingresarán por la línea primitiva, una desregulación en su capacidad migratoria provocando defectos en la generación de las capas embrionarias.

MARCKS es una de las proteínas más claramente fosforiladas tras el tratamiento con PMA en diversos tipos celulares (Rozengurt et al., 1983; Blackshear et al., 1986). Al analizar la localización subcelular de MARCKS en los embriones bajo tratamiento con PMA, observamos que la señal no era citoplasmática, sino próxima a la membrana plasmática (como en los controles). Sin embargo, al activar PKC esperaríamos encontrar a MARCKS en el citoplasma, según pronostica el modelo de “*switch* electrostático” (Arbuzova et al., 2002). Una posible explicación para este fenómeno es que, en el lapso que va entre la aplicación del PMA y la fijación de los embriones, PKC se inactiva y MARCKS vuelve a su estado natural desfosforilado. Múltiples trabajos han documentado que una exposición prolongada a ésteres de forbol inhibe la actividad de PKC. En fibroblastos 3T3, tratamientos prolongados (24 horas) con ésteres de forbol inhiben la actividad de PKC mediante la degradación de la enzima (vida media de la enzima 6-7 horas) (Rodríguez-Pena y Rozengurt, 1984; Lindner et al., 1991). Por otro lado, en células invasivas de cáncer de vejiga, el tratamiento con PMA lleva a un pico de actividad de PKC a los 20 minutos de comenzado el ensayo, y luego comienza una disminución gradual de la misma (Yokoyama et al., 1998).

Por lo tanto, la activación temprana de PKC en nuestro diseño experimental generaría un pico de actividad solo al comienzo del tratamiento, seguido de una gradual inhibición causada por la degradación de la enzima.

Tratamiento farmacológico sobre embriones en estadio de neurulación: Efecto del PMA sobre el citoesqueleto de actina

Uno de los efectos sobresalientes que causó el tratamiento farmacológico, fue la modificación del citoesqueleto de actina en paquetes irregulares ubicados en el centro de la placa neural, respecto a la polaridad ápico-basal. De las múltiples isoformas de PKC que son activadas por ésteres de forbol, se han documentado dos (mediante análisis de western blot) que están presentes durante la neurulación en embriones de ratón, cPKC- α y nPKC- δ . Sin embargo, únicamente cPKC- α está presente en la placa neural (Blackshear et al., 1996). Se ha demostrado que la activación de cPKC- α fosforila múltiples sustratos que modifican la estructura y dinámica del citoesqueleto de actina. Dentro de éstos, se destacan fascina (Anilkumar et al., 2003), vinculina (Ziegler et al., 2002) y adducina (Matsuoka et al., 1998).

MARCKS es el sustrato mayor de PKC, por lo tanto puede poseer un rol importante en el fenotipo presentado por el citoesqueleto de actina. Como se describe en la Introducción, MARCKS se une directamente a la actina F y presenta una actividad de entrecruzamiento de estos filamentos que es inhibida por la fosforilación por PKC (Hartwig et al., 1992). Además, se ha postulado que MARCKS puede ejercer su efecto sobre los microfilamentos de manera indirecta al secuestrar al segundo mensajero lipídico PIP₂. La separación de MARCKS de la membrana, mediada por la fosforilación a cargo de PKC, determinaría un incremento en la disponibilidad de PIP₂, haciéndolo accesible a enzimas como la fosfolipasa D, o iniciando la reorganización del citoesqueleto por el reclutamiento de proteínas promotoras de la polimerización, el “*treadmilling*”, el anclado a la membrana o el entrecruzamiento de actina (McLaughlin et al., 2002). Teniendo en cuenta la concentración de MARCKS en la célula (2 μ M en fibroblastos y 10 μ M en neuronas) y que cada molécula de MARCKS puede interactuar con 3 moléculas de PIP₂, ésta podría unirse a todo el PIP₂ presente en la membrana plasmática (Sheetz et al., 2006).

De acuerdo a este modelo se abre un abanico enorme de posibles moléculas que, moduladas por MARCKS a través del PIP₂, interactuarían directa o indirectamente

con el citoesqueleto de actina y podrían explicar el fenotipo encontrado. Sin embargo, nuestro diseño experimental no nos permite afirmar que el mismo esté relacionado con la fosforilación de MARCKS, aunque sea éste el mayor sustrato de PKC; no podemos descartar la posibilidad de que PKC esté fosforilando otros sustratos, y que éstos sean responsables en cierta medida de los fenotipos encontrados.

Por último, se conoce que los ésteres de forbol se unen y activan a proteínas sin actividad quinasa que poseen el dominio C1 de las PKC clásicas y noveles (Ron y Kazanietz, 1999) y que son reguladores putativos del citoesqueleto de actina. Entre éstos se incluyen las chimerinas, MRCK (myotonic dystrophy kinase-related Cdc42-binding kinase) y RasGRPs (Larsson, 2006). No podemos descartar que ciertos efectos del PMA sobre el citoesqueleto de actina evidenciados en la placa neural estén mediados por estas moléculas. Sin embargo, estudios farmacológicos en células muestran que el efecto de estas proteínas en la regulación del citoesqueleto es despreciable cuando se lo compara con el de las distintas isoformas de PKC (Larsson, 2006).

Alteraciones en la integridad del neuroepitelio

Una de las alteraciones más evidentes que causó el PMA sobre el neuroepitelio fue la formación de *blebs* de membrana apical. Los *blebs* son protrusiones de membrana cuasi-esféricas que se encuentran asociadas principalmente con el daño celular (Barros et al., 2003). La contracción del citoesqueleto cortical de actina por la proteína motora miosina II causa la contracción de la membrana plasmática, excepto en regiones donde existe poca adhesión del citoesqueleto a la membrana. Dicha debilidad se genera por una falta de proteínas de unión entre ambas estructuras. La combinación entre la contracción del citoesqueleto y la pérdida de adhesiones genera la formación de *blebs* (Mills et al., 1999).

Consistente con este modelo, en la región apical de las células neuroepiteliales se lleva a cabo una intensa contracción apical, dada por el citoesqueleto cortical de

actina y la miosina IIb (Sawyer et al., 2010).

El siguiente requisito para la generación de *blebs* es la pérdida de adhesión entre la membrana y el citoesqueleto. Dado que MARCKS forma puentes entre la membrana plasmática y el citoesqueleto cortical (Arbuzova et al., 2002), podría esperarse que sea una de las proteínas responsables de este fenómeno. Sin embargo, existen otros candidatos posibles. La espectrina es una proteína que desempeña la tarea de unión membrana-citoesqueleto, uniéndose directamente a los lípidos de la membrana y a los filamentos de actina creando puentes de adhesión (Diakowski et al., 1999). Su desprendimiento de la membrana plasmática genera *blebs* (Sheetz et al., 2006). A su vez, se ha documentado que PKC es capaz de fosforilarla, relocalizándola en forma de agregados en el citoplasma en linfocitos (Wang et al., 1999). Por último, ratones “Knock out” para la α II-espectrina presentan defectos en el cierre del tubo neural (Stankewich et al., 2011).

Por todo lo mencionado anteriormente, es posible que la generación de *blebs* en las células neuroepiteliales tratadas con PMA se deba, al menos en parte, a la fosforilación mediada por PKC y subsecuente relocalización de MARCKS y/o espectrina en el citoplasma.

Otro efecto muy evidente del tratamiento con PMA fue una importante alteración en la polaridad ápico-basal del neuroepitelio. Por ejemplo, cuando analizamos la polaridad neuroepitelial usando el marcador apical aPKC, observamos una redistribución de la proteína. Su relocalización no está relacionada con un efecto directo del PMA, ya que aPKC no es activada por ésteres de forbol (Steinberg, 2008). Creemos que su relocalización está relacionada con la reorganización de la morfología general de la célula mediada por el citoesqueleto de actina. Dicho citoesqueleto presentó una alteración en su distribución, presentándose en paquetes irregulares en regiones centrales del neuroepitelio. A su vez, el centrosoma presentó una localización subcelular que podría ser aleatoria (aunque con una aparente tendencia a acumularse en la región central de las células neuroepiteliales). En la misma línea, N-CAM presentó una distribución alterada, localizándose enriquecida en los *blebs* de membrana apical. En suma, estos marcadores evidencian que las células neuroepiteliales de embriones de pollo bajo tratamiento con PMA, sufren una alteración en su polaridad ápico-basal.

Alteraciones aparentemente similares ocurrieron en los tratamientos prolongados con PMA, en los cuales también encontramos una acumulación de filamentos de actina y de aPKC alejada de los bordes epiteliales. Esta relocalización de marcadores de la región apical hacia una región central del tejido, ha sido descrita previamente para algunos mutantes de polaridad en el neuroepitelio de la retina del *zebrafish* (Zolessi et al., 2006). Consideramos que los paquetes de actina filamentosos evidenciados pertenecen a la región apical de las células, mientras que los *blebs* comprenderían una región supra-apical. Basamos esta hipótesis en la localización subcelular de aPKC y MARCKS, en estrecha asociación con los paquetes de actina.

Distribución subcelular de MARCKS

El tratamiento con PMA sobre embriones de estadio HH8 causó una modificación en la distribución subcelular de MARCKS en células neuroepiteliales. Como mencionamos en la introducción, MARCKS se acumula transitoriamente en la región apical de las células neuroepiteliales durante el proceso de cierre del tubo neural (Zolessi y Arruti, 2001). Sin embargo, hasta el momento no se conoce cómo MARCKS permanece enriquecida en la región apical, si es a partir de una interacción con la membrana plasmática apical, con la membrana subapical, con el citoesqueleto de actina o una combinación entre la membrana y el citoesqueleto. Los embriones bajo tratamiento farmacológico presentaron una señal citoplasmática de MARCKS total, del mismo modo que de p-MARCKS, consistente con el modelo de “*switch* electrostático” (Arbuzova et al., 2002). Cuando analizamos las cuantificaciones de perfiles de intensidad de fluorescencia realizadas a partir de transectas en sentido ápico-basal de placa neural, encontramos que la señal de MARCKS total se presentaba enriquecida en la región de *blebs* de membrana apical. A su vez, encontramos un pico de intensidad de fluorescencia en las regiones donde se presentaban los paquetes irregulares de actina filamentosos, del mismo modo que la situación control, aunque en menor intensidad. Cuando analizamos la localización subcelular en las micrografías, encontramos una cierta acumulación de MARCKS y

p-MARCKS (en menor medida) cercana a los paquetes de actina, aunque mayormente no colocalizando. Esto es similar a la encontrada en trabajos previos (Zolessi y Arruti, 2001), en los cuales evidenciaron que no existía colocalización entre MARCKS y el citoesqueleto de actina. Esto nos sugiere que MARCKS no se encuentra asociada a los filamentos de actina en el neuroepitelio, por lo menos no directamente. Una posible interpretación a estos resultados es que MARCKS está anclada a la membrana plasmática apical o subapical, sufre una translocación al citoplasma, pero la formación de los paquetes irregulares de actina impide su completa liberación. El enriquecimiento de MARCKS y p-MARCKS en los *blebs* de membrana apical es consistente con esta hipótesis.

Efecto del PMA en los movimientos morfogenéticos de la neurulación

Teniendo en cuenta los movimientos morfogenéticos necesarios para la formación del tubo neural, podemos inferir que las fuerzas intrínsecas a la placa neural son seriamente afectadas por el tratamiento con PMA. Específicamente, creemos que es afectada la constricción apical llevada a cabo por el citoesqueleto de actina y miosina (Sawyer et al., 2010). Esta interpretación está basada en la observación de la disposición totalmente desplegada de la placa neural y a la ausencia de puntos de bisagra laterales en dichos embriones. Además, la placa neural aparece muy adelgazada (probablemente debido a la generación de *blebs* de membrana apical y a un notorio ensanchamiento de la placa), lo cual también podría explicar por qué los pliegues neurales se enrollan hacia fuera: la resistencia mecánica de la placa neural está probablemente disminuida. Por otra parte, el ectodermo no neural no parece estar afectado ni en su estructura general (no hay *blebs* ni acumulaciones ectópicas de marcadores apicales) ni en su capacidad de generar fuerzas que curvan a la placa neural.

Llamativamente, observamos que en los embriones tratados la región de los pliegues neurales, en la que la placa neural está estrechamente asociada al ectodermo no neural, presenta una disposición plegada en sentido lateral. Esta disposición sugiere que las fuerzas de tracción extrínseca generadas por el

ectodermo (y transferidas a la placa neural a este nivel; Smith y Schoenwolf, 1991), permanecen activas. Sin embargo, las células que conforman los pliegues neurales presentan una organización totalmente distinta con respecto a la situación control. Al estar afectada la organización de los pliegues neurales, la placa neural no podría entonces utilizar la fuerza de tracción ectodérmica para la formación del tubo neural, a pesar de que el ectodermo no parezca estar afectado.

Por lo tanto, las alteraciones del proceso de neurulación causadas por el PMA parecen deberse a un efecto directo sobre el neuroepitelio, afectando la constricción apical y también la cohesión de las células necesarias para el plegamiento. Este efecto del PMA se da seguramente a través de la activación de PKC, y la acción de ésta sobre el citoesqueleto de actina.

Conclusiones

En este trabajo desarrollamos y pusimos a punto un protocolo que nos permitió analizar los efectos de la activación farmacológica de PKC en embriones tempranos de pollo en condiciones de cultivo.

La adición del agonista de PKC, PMA, en estadios tempranos del desarrollo generó defectos muy severos en la morfología general del embrión, probablemente por afectar los movimientos morfogénéticos de la gastrulación.

Nuestros resultados indican que la actividad de PKC durante la neurulación de pollo debe ser finamente regulada para que el cierre del tubo neural ocurra correctamente.

Los defectos generados por la activación de PKC están asociados principalmente a una alteración grave de la polaridad neuroepitelial, evidenciados por la redistribución subcelular de múltiples marcadores de polaridad celular.

La activación de PKC llevó a la fosforilación de MARCKS y su translocación al citoplasma. Curiosamente, encontramos cierto enriquecimiento en regiones próximas a los paquetes irregulares de actina filamentosa.

Apéndice

PBS

- Cloruro de sodio.....8 g
- Cloruro de potasio.....0,2 g
- Fosfato disódico anhidro 0,912 g
- Fosfato monopotásico.....0,2 g
- Agua destiladacsp 1 l

Gelatina Crómica

- Gelatina.....0,5 g
- Alumbre de cromo.....50 mg
- Agua destilada..... csp 100 ml

Diluir el alumbre de cromo en agua y calentar sin superar los 60°C. Agregar suavemente la gelatina en agitación. Una vez se haya disuelto la misma filtrar y guardar a -4 °C.

Paraformaldehido al 3,7%

- Paraformaldehido.....7,4 g
- PBS.....200 ml

Disolver el paraformaldehido en PBS, calentando entre 60 y 80°C sin que supere el límite y agitando continuamente. Cuando se diluye completamente se deja enfriar, luego se enrasa y alcuota. Se mantiene a -20° hasta su utilización.

Glicerol al 50% en PBS

- Glicerol500 µl
- PBS 5X.....200 µl
- Agua bidestilada300 µl

Referencias bibliográficas

Aaku-Saraste E., Hellwig A., Huttner W.B. (1996). Loss of Occludin and functional tight junctions, but not ZO-1, during neural tube closure - remodeling of the neuroepithelium prior to neurogenesis. *Dev Biol* 180:664-679.

Aderem A. (1992). The MARCKS brothers, a family of protein kinase C substrates. *Cell* 71:713-716.

Albert K.A., Walaas S.I., Wang J., Greenard P. (1986). Widespread occurrence of 87 kDa, a major specific substrate for protein kinase. *Procl Natl Acad. Sci* 83:2822-2826.

Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. (2007). *Molecular Biology of the Cell*. 5^{ta} edición, New York, Garland Science.

Anilkumar N., Parsons M., Monk R., Ng T., Adams J.C. (2003). Interaction of fascin and protein kinase Calpha: a novel intersection in cell adhesion and motility. *EMBO J* 22:5390-5402.

Arbuzova A., Schmitz A.P., Vergeres G. (2002). Cross-talk unfolded: MARCKS proteins. *Biochem J* 362:1-12.

Barros L.F., Kanaseki T., Sabirov R., Morishima S., Castro J., Bittner C.X., Maeno E., Ando-Akatsuka Y., Okada Y. (2003). Apoptotic and necrotic blebs in epithelial cells display similar neck diameters but different kinase dependency. *Cell Death Differ* 10:687-697.

Blackshear P.J. (1993). The MARCKS family of protein kinase C substrates. *J Biol Chem* 268:1501-1504.

Blackshear P.J., Lai W.S., Tuttle J.S., Stumpo D.J., Kennington E., Nairn A.C., Sulik K.K. (1996). Developmental expression of MARCKS and protein kinase C in mice in relation to the exencephaly resulting from MARCKS deficiency. *Dev Brain Res* 96:62-75.

Blackshear P.J., Silver J., Nairn A.C., Sulik K.K., Squier M.V., Stumpo D.J., Tuttle J.S. (1997). Widespread Neuronal Ectopia Associated with Secondary Defects in Cerebrocortical Chondroitin Sulfate Proteoglycans and Basal Lamina in MARCKS-Deficient Mice. *Exp Neurol* 145:46-61.

Blackshear P.J., Tuttle J.S., Oakey, R.J., Seldin M.F., Chery M., Philippe C., Stumpo D.J. (1992). Chromosomal mapping of the human (MACS) and mouse (Macs) genes encoding the MARCKS protein. *Genomics* 14:168-174.

Blackshear P.J., Wen L., Glynn B.P., Witters L.A. (1986). Protein kinase C-stimulated phosphorylation in vitro of a Mr 80,000 protein phosphorylated in response to phorbol esters and growth factors in intact fibroblasts. Distinction from protein kinase C and prominence in brain. *J Biol Chem* 261:1459-1469.

Chapman S.C., Collignon J., Schoenwolf G.C., Lumsden A. (2001). Improved Method for Chick Whole-Embryo Culture Using a Filter Paper Carrier. *Dev Dyn* 220:284-289.

Chen X., Rotenberg S.A. (2010). PhosphoMARCKS drives motility of mouse melanoma cells. *Cell Signal* 22:1097-1103.

Chenn A., Zhang Y.A, Chang B.T., McConnell S.K. (1998). Intrinsic Polarity of Mammalian Neuroepithelial Cells. *Mol Cell Neurosci* 11:183-193.

Colas J.F., Schoenwolf G.C. (2001). Towards a Cellular and Molecular Understanding of Neurulation. *Dev Dyn* 221:117-145.

Delaune E., Lemaire P., Kodjabachian L. (2005). Neural induction in *Xenopus* requires early FGF signalling in addition to BMP inhibition. *Development* 132:299-310.

De Robertis E.M., Kuroda H. (2004). Dorsal-Ventral Patterning and Neural Induction in *Xenopus* Embryos. *Annu Rev Cell Dev Biol* 20:285-308.

Diakowski W., Prychidny A., Swistak M., Nietubyc M., Bialkowska K. (1999). Brain spectrin (fodrin) interacts with phospholipids as revealed by intrinsic fluorescence quenching and monolayer experiments. *Biochem J* 338:83–90.

Geldmacher-Voss B., Reugels A.M., Pauls S., Campos-Ortega J.A. (2003). A 90° rotation of the mitotic spindle changes the orientation of mitoses of zebrafish neuroepithelial cells. *Development* 130:3767-3780.

Gilbert S.F. (2010). *Developmental biology*. 9^{na} edición, Sunderland, Sinauer Associates.

Graff J.M., Stumpo D.J., Blackshear P.J. (1989). Molecular cloning, sequence and expression of a cDNA encoding the chicken Myristoylated Alanine-Rich C Kinase Substrate (MARCKS). *Mol Endo* 3:1903-1906.

Graff J.M., Rajan R., Randall R., Nairn A.C., Blackshear P.J. (1991). Protein kinase C substrate and inhibitor characteristics of peptides derived from the Myristoylated Alanine-rich C Kinase Substrate (MARCKS) protein phosphorylation site domain. *J Biol Chem* 266:14390-14398.

Griep E., Robbins E. (1983). Epithelium. En: Weiss L. *Histology Cell and Tissue Biology*. New York, Elsevier Science Publishing Co. p.109-138.

Hamburger V., Hamilton H.L., (1951). A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J Morphol* 88:49-92.

Hartwig J.H., Thelen M., Rosen A., Janmey P.A., Nairn A.C., Aderem A. (1992). MARCKS is an actin filament crosslinking protein regulated by protein kinase C and calcium-calmodulin. *Nature* 356:618-22.

Heo W.D., Inoue T., Park W.S., Kim M.L., Park B.O., Wandless T.J., Meyer T. (2006). PI(3,4,5)P3 and PI(4,5)P2 lipids target proteins with polybasic clusters to the plasma membrane. *Science* 314:1458-1461.

Hildebrand J.D. (2005). Shroom regulates epithelial cell shape via the apical positioning of an actomyosin network . *J Cell Sci* 118:5191-5203.

Iioka H., Ueno N., Kinoshita N. (2004). Essential role of MARCKS in cortical actin dynamics during gastrulation movements. *J Cell Biol* 164:169-174.

Kinoshita N., Sasai N., Misaki K., Yonemura S. (2008). Apical accumulation of Rho in the neural plate is important for neural plate cell shape change and neural tube formation. *Mol Biol Cell* 19:2289-2299.

Larsson C. (2006). Protein kinase C and the regulation of the actin cytoskeleton. *Cell Signal* 18:276-284.

Lindner D., Gschwendt M., Marks F. (1991). Down-regulation of protein kinase c in swiss 3T3 fibroblasts independent of its phosphorylating activity. *Biochem Biophys Res Commun* 176:1227-1231.

Linker C., Stern C.D. (2004). Neural induction requires BMP inhibition only as a late step, and involves signals other than FGF and Wnt antagonists. *Development* 131:5671-5681.

- Lowery L.A., Sive H. (2004). Strategies of vertebrate neurulation and a re-evaluation of teleost neural tube formation. *Mech Develop* 121:1189-1197.
- McLaughling S., Wang J., Gaublur A., Murray D. (2002). PIP2 and proteins: interactions, organization, and information flow. *Ann Rev Biophys Biomol Struct* 31:151-175.
- Margolis B., Borg J.P. (2005). Apicobasal polarity complexes. *J Cell Sci* 118:5157-5159.
- Matsuoka Y., Li X., Bennett V. (1998). Adducin is an in vivo substrate for protein kinase C: phosphorylation in the MARCKS-related domain inhibits activity in promoting spectrin-actin complexes and occurs in many cells, including dendritic spines of neurons. *J Cell Biol* 142:485-497.
- Mellor H., Parker P.J. (1998). The extended protein kinase C superfamily. *Biochem J* 332:281-292.
- Mills J.C., Stone N.L., Pittman R.N. (1999). Extranuclear Apoptosis: The Role of the Cytoplasm in the Execution Phase. *J Cell Biol* 146:703-707.
- Moury J.D., Schoenwolf G.C. (1995). Cooperative model of epithelial shaping and bending during avian neurulation: autonomous movements of the neural plate, autonomous movements of the epidermis, and interactions in the neural plate/epidermis transition zone. *Dev Dyn* 204:323-337.
- Nelson W.J. (2003). Adaptation of core mechanisms to generate cell polarity. *Nature* 422:766-774.
- Nishimura T., Takeichi M. (2008). Shroom3-mediated recruitment of Rho kinases to the apical cell junctions regulates epithelial and neuroepithelial planar remodeling.

Development 135:1493-1502.

Nishizuka Y. (1989). The family of protein kinase C for signal transduction. *JAMA* 262:1826-1833.

Nishizuka Y. (1995). Protein kinase C and lipid signaling for sustained cellular responses. *FASEB J* 9:484-496.

Rodriguez-Pena A., Rozengurt E. (1984). Disappearance of Ca²⁺-sensitive, phospholipid-dependent protein kinase activity in phorbol ester-treated 3T3 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 120:1053-1059.

Ron M.G., Kazanietz D. (1999). New insights into the regulation of protein kinase C and novel phorbol ester receptors. *FASEB J* 13:1658-1676.

Rosen A., Keenan K.F., Thelen M., Nairn A.C., Aderem A. (1990). Activation of protein kinase C results in the displacement of its myristoylated, alanine-rich substrate from punctate structures in macrophage filopodia. *J Exp Med* 172:1211-1215.

Rozengurt E., Rodriguez-Pena M., Smith K.A. (1983). Phorbol esters, phospholipase C, and growth factors rapidly stimulate the phosphorylation of a Mr 80,000 protein in intact quiescent 3T3 cells. *Proc Natl Acad Sci* 80:7244-7248.

Sawyer J., Harrell J.R., Shemer G., Sullivan-Brown J., Roh-Johnson M., Goldstein B. (2010). Apical constriction: A cell shape change that can drive morphogenesis. *Dev Biol* 341:5-19.

Scarlett C.O., Blackshear J.P. (2003). Neuroanatomical development in the absence of PKC phosphorylation of the myristoylated alanine-rich C-kinase substrate (MARCKS) protein. *Dev Brain Res* 144:25-42.

Schmitz B., Papan C., Campos-Ortega J.A. (1993). Neurulation in the anterior trunk region of the zebrafish *Brachydanio rerio*. *Roux's Arch Dev Biol* 202:250-259.

Schoenwolf G.C., Folsom D., Moe A. (1988). A Reexamination of the Role of Microfilaments in Neurulation in the Chick Embryo. *Anat Rec* 220:87-102.

Schoenwolf G.C., Powers M.L. (1987). Shaping of the chick neuroepithelium during primary and secondary neurulation: role of cell elongation. *Anat Rec* 218:182-195.

Sheetz M.P., Sable J.E., Dobereiner H.G. (2006). Continuous Membrane-Cytoskeleton Adhesion Requires Continuous Accommodation to Lipid and Cytoskeleton Dynamics. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 35:417-434.

Smith J.L., Schoenwolf G.C. (1988). Role of cell-cycle in regulating neuroepithelial cell shape during bending of the chick neural plate. *Cell Tissue Res* 252:491-500.

Smith J.L., Schoenwolf G.C. (1991). Further Evidence of Extrinsic Forces in Bending of the Neural Plate. *J Comp Neurol* 307:225-236.

Stankewich M.C., Cianci C.D., Stabach P.R., Ji L., Nath A., Morrow J.S. (2011). Cell organization, growth, and neural and cardiac development require α II-spectrin. *J Cell Sci* 124:3956-3966.

Steinberg S. (2008). Structural Basis of Protein Kinase C Isoform Function. *Physiol Rev* 88:1341-1378.

Stern C.D. (1993) Immunocytochemistry of embryonic material. En: Stern C.D., Holland W.H. *Essential developmental biology A practical approach*. New York, Oxford University Press. p.193-212.

Stern C.D. (2006). Neural induction: 10 years on since the "default model". *Curr Opin Cell Biol* 18:692-697.

Stumpo D.J., Bock C.B., Tuttle J.S., Blackshear P.J. (1995). MARCKS deficiency in mice leads to abnormal brain development and perinatal death. *Proc Natl Acad Sci* 92:944-948.

Stumpo D.J., Graff J.M., Albert K.A., Greengard P., Blackshear P.J. (1989). Molecular cloning, characterization, and expression of a cDNA encoding the "80- to 87-kDa" myristoylated alanine-rich C kinase substrate: a major cellular substrate for protein kinase C. *Proc Natl Acad Sci* 86:4012-4016.

Swierczynski S.I., Siddhanti S.R., Tuttle J.S., Blackshear P.J. (1996). Nonmyristoylated MARCKS complements some but not all of the developmental defects associated with MARCKS deficiency in mice. *Dev Biol* 179:135-147.

Thiery J.P., Duband J.L., Rutishauser U., Edelman G.M. (1982). Cell adhesion molecules in early chicken embryogenesis. *Proc Natl Acad Sci* 79:6737-6741.

Towler D.A., Gordo J.I. (1988). The biology and enzymology of eukaryotic protein acylation. *Ann. Rev. Biochem.* 57:69-99.

van Straaten H., Seben I., Hekking J.W. (2002). Multistep role for actin in initial closure of the mesencephalic neural groove in the chick embryo. *Dev Dyn* 224:103-108.

Wallingford J.B. (2005). Neural tube closure and neural tube defects: studies in animal models reveal known knowns and known unknowns. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 35:59-68.

Wallingford J.B., Harland R.M. (2002). Neural tube closure requires Dishevelled-dependent convergent extension of the midline. *Development* 129:5815-5825.

Wang J., Arbuzova A., Hangyas-Mihalyne G., and McLaughlin S. (2001). The effector domain of myristoylated alanine-rich C kinase substrate binds strongly to

phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *J Biol Chem* 276:5012-5019.

Wang X., Ostberg J.R., Repasky E.A. (1999). Effect of Fever-Like Whole-Body Hyperthermia on Lymphocyte Spectrin Distribution, Protein Kinase C Activity, and Uropod Formation. *J Immunol* 162:3378-3387.

Weimer J.M., Yokota Y., Stanco A., Stumpo D.J., Blackshear P.J., Anton E.S. (2009). MARCKS modulates radial progenitor placement, proliferation and organization in the developing cerebral cortex. *Development* 136:2965-2975.

Ybot-Gonzalez P., Copp A.J. (1999). Bending of the Neural Plate During Mouse Spinal Neurulation Is Independent of Actin Microfilaments. *Dev Dyn* 215:273-283.

Yokoyama Y., Ito T., Hanson V., Schwartz G.K., Aderem A., Holland J.F., Tamaya T., Ohnuma T. (1998). PMA-induced reduction in invasiveness is associated with hyperphosphorylation of MARCKS and Talin in invasive bladder cancer cells. *Int J Cancer* 75:774-779.

Ziegler W.H., Tigges U., Zieseniss A., Jockusch B.M. (2002). A lipid-regulated docking site on vinculin for protein kinase C. *J Biol Chem* 277:7396-7404.

Zolessi, F.R. (2009) Vertebrate Neurogenesis: Cell Polarity. En: *Encyclopedia of Life Sciences (ELS)*. John Wiley & Sons.

Zolessi F.R., Arruti C. (2001). Apical accumulation of MARCKS in neural plate cells during neurulation in the chick embryo. *BMC Developmental Biology* 1:7.

Zolessi F.R., Durán R., Engström U., Cerveñansky C., Hellman U., Arruti C. (2004). Identification of the chicken MARCKS phosphorylation site specific for differentiating neurons as ser 25 using a monoclonal antibody and mass spectrometry. *J Proteom Res* 1: 84-90.

Zolessi F.R., Poggi L., Wilkinson C.F., Chien C., Harris W.A. (2006). Polarization and orientation of retinal ganglion cells in vivo. *Neural Dev* 1:2.