



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA  
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA DEL DESARROLLO Y FISIOLÓGIA MOLECULAR

RHO Y LA LOCALIZACIÓN DEL PLASMA GERMINAL DURANTE LA OVOGÉNESIS DE DANIO RERIO

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:

**JAIME CARLOS LÓPEZ RODRÍGUEZ**

TUTOR PRINCIPAL

DRA. DENHÍ SCHNABEL PERAZA  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

DRA. CELINA GARCÍA MELENDREZ  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA, UNAM  
DR. MARIO ENRIQUE ZURITA ORTEGA  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA, UNAM

CUERNAVACA, MOR., SEPTIEMBRE 2021



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## *Agradecimientos*

A la Dra. Denhí Schnabel, mi tutora, que siempre puso su confianza en mí, me guio y contagio de su ánimo en todo momento. Además de que siempre me dedico de su tiempo para enseñarme ella misma a diseñar y realizar experimentos. Por las risas, apoyo y amistad que hemos formado.

A la Dra. Hilda Lomelí por el espacio, reactivos, material y equipo que use en su laboratorio con la confianza que depositaba en mí. Por sus recomendaciones, sus consejos en estos años.

Al Dr. Enrique Salas por sus comentarios, su apoyo, confianza y amistad de todos estos años, que siempre me recibió con una sonrisa.

A la Dra. Celina García y al Dr. Mario Zurita, miembros de mi comité tutor, por permitirme usar equipos y reactivos de sus laboratorios, por sus recomendaciones, sus ideas experimentales y por las discusiones que me orientaron durante mis exámenes tutorales estos dos años.

A mis compañeros y miembros del laboratorio HL que me apoyaron con técnicas, compañía y amistad durante mi maestría Javier, Arlen, Valentina, Max, Laurichan, Dulce, Francisco y Pao.

Al Dr. Gustavo Pedraza Alva, Dr. Enrique Reynaud Garza, Dra. Rosa Navarro González, Dr. Enrique Merino Pérez y Dr. Diego Cortez Quesada por aceptar ser parte de mi jurado, por el tiempo que dedicaron a leer mi tesis y por sus valiosas observaciones, comentarios y correcciones que enriquecieron este trabajo.

A mis papás y a mis hermanos, por su apoyo incondicional para ayudarme a cumplir mis metas y que siempre estuvieron ahí para ayudarme a salir adelante.

A mis amigos del IBT, de la maestría, del club de la tarea, de la sociedad de María, el transporte Nocturno del IBT a cargo del joven Adrián, de LAZEN, por todos los tips y alegrías que compartimos.

El presente trabajo fue realizado en el Departamento de Biología del Desarrollo y Fisiología Molecular del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la asesoría de la Dra. Denhí Schnabel Peraza. Durante la realización de este trabajo se contó con el apoyo de la beca de maestría no. 720438 otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACyT.

Apoyo de proyectos No. 4710 Sistema Nacional de Evaluación Nanotoxicológica (SINANOTOX) y No. IN200618 Uso del pez cebra para evaluar la calidad y seguridad del agua renovada como potencial fuente de recarga del acuífero del Valle de México proyecto.

Se agradece el apoyo brindado a este trabajo a las siguientes instituciones, unidades, laboratorios:

Universidad Nacional autónoma de México.

Instituto de Biotecnología, UNAM.

Laboratorio 15, Instituto de Biotecnología, UNAM. Dra. Hilda Lomelí Buyoli, Dr. Enrique Salas Vidal, Dr. Denhí Schnabel Peraza, M. en C. Javier Méndez Cruz, M. en C. Dulce I. Benítez Pacheco y M. en C. Laura Ramírez Ángeles.

Unidad de Síntesis y Secuenciación del Instituto de Biotecnología, UNAM.

Unidad de Docencia y Formación de Recursos Humanos, Instituto de Biotecnología UNAM. Gloria Villa Herrera, Lic. J. Antonio Bolaños Guillén e Ing. Jalil Saab Hassanille.

Unidad de Biblioteca, Instituto de Biotecnología, UNAM. B.A. Dip.Lib. A.L.A. Shirley Elizabeth Ainsworth y L.I. Jesús Omar Arriaga Pérez

Unidad de Computo, Instituto de Biotecnología, UNAM.

## Índice

Introducción .....	6
El plasma germinal y el cuerpo de Balbiani .....	7
Mecanismos de localización de RNA.....	8
Los gránulos de RNA y el citoesqueleto .....	9
Los elementos Cis de los RNAs .....	11
La localización de RNAs durante la ovogénesis de <i>Xenopus</i> .....	12
El plasma germinal en pez cebra.....	12
Los RNAs mensajeros y las proteínas del plasma germinal en pez cebra .....	14
Las Rho GTPasas.....	16
Antecedentes.....	18
RhoA durante el desarrollo embrionario de pez cebra.....	18
RhoA durante la ovogénesis de pez cebra .....	20
Justificación .....	23
Hipótesis .....	23
Objetivo general.....	23
Objetivos particulares .....	23
Metodología .....	24
Mantenimiento de pez cebra.....	24
Extracción y fijado de ovario .....	24
Cultivo de ovarios .....	24
Inmunofluorescencia en cortes de ovario .....	25
Clonación de fragmentos de RNAm.....	26
Extracción de RNA.....	26
Síntesis de DNA complementario .....	26
PCR .....	27
Clonación del producto de PCR en un plásmido .....	27
Preparación de células competentes y transformación.....	28
Digestión de plásmidos para sondas .....	28
Purificación de digestiones con butanol.....	29
Síntesis de sondas de RNA marcadas con digoxigenina.....	29
Transferencia de gel y comprobación de sonda marcada .....	30
Hibridación <i>in situ</i> de ovocitos .....	30
Resultados.....	33
Señal de localización vegetal de RNAm .....	33
Señal de localización de Cuerpo de Balbiani en RNAm .....	35

Expresión de proteínas efectoras de RhoA durante la ovogénesis de pez cebra.....	37
Inhibición de Rock en cultivo de ovocitos .....	40
Discusión de resultados.....	41
Conclusión .....	44
Perspectivas Bioinformáticas.....	44
Perspectivas Experimentales.....	44
Información Suplementaria .....	45
Tablas Suplementarias. ....	45
Figuras suplementarias.....	49
Anexo programa .....	50
Bibliografía.....	57

## Introducción

En el dogma central de la biología molecular la información genética fluye de los ácidos nucleicos (ADN, RNA hacia proteínas. Las modificaciones epigenéticas ocurren en el ADN genómico y en las histonas para regular la expresión de genes y con ello dirigir la diferenciación celular y el desarrollo (Fu *et al.*, 2014). El RNA tiene un rol decisivo en los sistemas biológicos, no sólo transfiere la información genética del ADN a proteína, sino también regula varios procesos biológicos (Martin and Ephrussi, 2009). Mientras que están ampliamente estudiados el control de la síntesis del RNA por las RNA polimerasas, los factores de transcripción y el estado de la cromatina, poco se ha dilucidado acerca de los mecanismos postranscripcionales (Engel *et al.*, 2020). Un aspecto aún menos entendido de la regulación postranscripcional son los mecanismos de localización del RNAm.

El proceso de localización de RNAm y la regulación de la traducción es un mecanismo ampliamente usado por un conjunto de transcritos que permite restringirlos espacial y temporalmente en sitios discretos dentro de células altamente polarizadas (Martin and Ephrussi, 2009). Esto está conservado desde organismos unicelulares como la levadura, hasta células totalmente especializadas como las neuronas del humano (Figura 1). Durante el desarrollo embrionario, el proceso de segregación de los componentes celulares participa en diferentes procesos como son: la definición de los ejes, migración, adhesión celular, la división asimétrica y en la plasticidad sináptica, entre otros (Martin and Ephrussi, 2009).

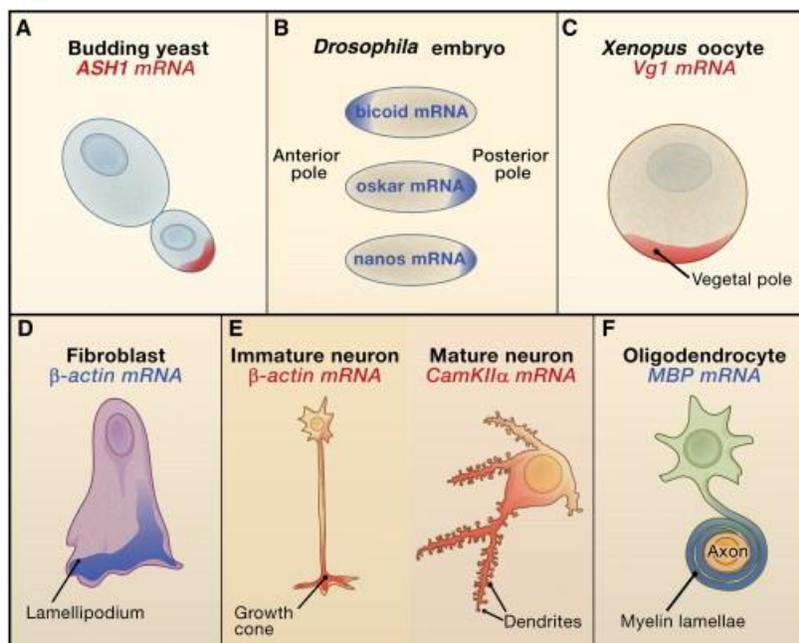


Figura 1. Ejemplos de localización subcelular de RNAm. (A) En la levadura, el RNAm de *ASH1* se localiza en la punta de la yema. (B) En los embriones de *Drosophila*, el RNAm de *bicoid* se localiza en el polo anterior; RNAm *oskar* y *nanos* al polo posterior. (C) En los ovocitos de *Xenopus*, el RNAm de *Vg1* se localiza en el polo vegetal. (D) En fibroblastos de pollos y mamíferos, el RNAm de *β-actina* se localiza en lamelopodios. (E) En el desarrollo de neuronas de mamíferos inmaduros, el RNAm de *β-actina* está presente en los conos de crecimiento distal y en las neuronas piramidales completamente polarizadas y maduras, el RNAm de *CamKIIα* está presente en las dendritas distales. (F) En los oligodendrocitos de mamíferos, el RNAm de la proteína básica de mielina (MBP) se localiza en los procesos mielinizantes que recubren los axones neuronales (Martin and Ephrussi, 2009).

Además, diversos RNAm podrían estar participando en la polarización de una célula u organismo ya que se sabe que se forman consorcios de transcritos que podrían compartir un cierto tiempo y espacio (Engel *et al.*, 2020). Un ejemplo muy característico es un estudio en la larva de *Drosophila*, donde

evaluaron la localización de 3,000 transcritos a alta resolución. De estos transcritos, el 71% tiene una localización subcelular muy particular durante el desarrollo embrionario y existe una muy estrecha correlación entre esta localización y la función de las proteínas para las que codifican (Lécuyer *et al.*, 2007). Sin embargo, el mecanismo por el cual se localiza subcelularmente cada transcrito, es desconocido.

### El plasma germinal y el cuerpo de Balbiani

En 1892, August Weismann cambió la noción de que la línea germinal (células reproductivas) se derivaban del soma (células del cuerpo) (Weismann, 1885). En su lugar, propuso que las células germinales poseían una sustancia inmortal especial llamada "plasma germinal ancestral" que era heredada de las células germinales de una generación a la siguiente en su "teoría de la continuidad del plasma germinal" (Weismann, 1885). En la actualidad se ha demostrado que el plasma germinal es un conjunto de moléculas suministradas por la madre compuesta de RNA, proteínas y organelos que se almacenan en ovocitos y luego se secuestran durante las primeras divisiones embrionarias en unas pocas células que se convertirán en las células germinales primordiales (PGC). La manera en cómo se regula la organización y localización del plasma germinal es poco comprendida.

Hoy en día, la identificación de marcadores específicos conservados evolutivamente de la línea germinal en distintos organismos permitió rastrear los orígenes moleculares de la línea germinal. Así, se pueden seguir las células germinales desde su determinación hasta que llegan a las gónadas, donde se diferencian como gametos masculinos o femeninos (Marlow, 2015). Este trazado de linaje reveló que algunos animales establecen su línea germinal por herencia de factores maternos o por la regulación postranscripcional en el contexto de un genoma silenciado (Leclère *et al.*, 2012). La sobreexpresión de Bucky ball y Oskar tienen la capacidad de generar PGC ectópicas en los animales que utilizan la inducción de la línea germinal (Marlow, 2015). Sin embargo hay algunos ejemplos como en los mamíferos y las salamandras que carecen de plasma germinal materno detectable e inducen a sus células germinales mediante factores de transcripción cigóticos, que en el caso de humano se induce por el factor transcripcional *sox17* para diferenciarse hacia un origen germinal, suprimiendo la expresión de genes somáticos con ayuda de BLIM1 (Irie *et al.*, 2015).

Un elemento muy importante en la organización del plasma germinal ha sido el Cuerpo de Balbiani (CB), que fue identificado hace más de 100 años en ovocitos en una diversidad de animales incluyendo algunos mamíferos (Figura 2) (Marlow, 2015). Este CB es una colección de organelos y moléculas que se ensamblan adyacentes al núcleo de los ovocitos más tempranos en su desarrollo (Guraya, 1979a). En la rana, la mosca, el pez y mamíferos, el CB se encuentra posicionado asimétricamente hacia un polo del ovocito y está compuesto de retículo endoplasmático, mitocondrias, aparato de Golgi, y proteínas (Marlow, 2015); además de estos elementos, está compuesto de RNAs importantes para la especificación del eje dorso ventral y RNAs del plasma germinal. Aunque aún no está claro cómo es que los RNAs son reclutados en el CB, existen mecanismos de localización por los cuales podría llevarse a cabo, utilizando posiblemente más de un mecanismo.

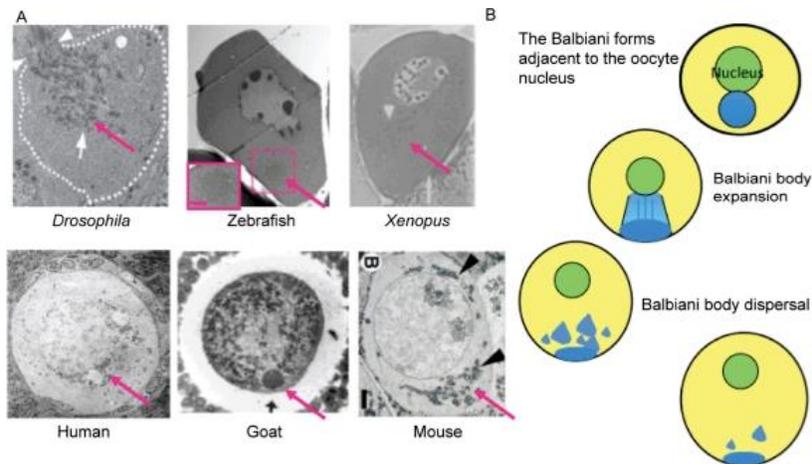


Figura 2. Conservación y dinámica del Cuerpo de Balbiani en los ovocitos de organismos modelo (Marlow, 2010).

### Mecanismos de localización de RNA

Todas las células contienen una gran variedad de regiones restringidas espacial y temporalmente, que son importantes para llevar a cabo funciones especializadas dentro de ellas (Martin and Ephrussi, 2009; Engel *et al.*, 2020). Con frecuencia estos subcompartimentos celulares contienen transcriptomas especializados que facilitan las funciones celulares o permiten una rápida respuesta ante los cambios celulares ambientales, traduciendo estos transcritos localmente y así, mantener la fisiología celular (Engel *et al.*, 2020).

Existen diversos mecanismos de localización del RNA dependiendo del tipo celular, estos se dividen en transporte activo y pasivo (Martin and Ephrussi, 2009). El transporte activo de RNA puede llevarse a cabo en dos maneras: por complejos ribonucleoproteicos (RNP) que forman gránulos o por RNAs individuales; en ambos casos se utiliza un andamiaje en el citoesqueleto para ser transportados (De Heredia and Jansen, 2004). Para el transporte de RNAs a largas distancias se ha visto que los RNAs utilizan como andamiaje a los microtúbulos en conjunto con dineínas y kinesinas; mientras que el transporte en distancias cortas se lleva a cabo a través de la miosina en los microfilamentos de actina (Farris *et al.*, 2014). Adicionalmente, el transporte pasivo se realiza a través de la difusión del RNAm y su anclaje en regiones subcelulares donde es protegido de la degradación, estableciendo un gradiente a través de toda la célula (Kugler *et al.*, 2009). Estos mecanismos no son excluyentes, y un RNA podría obtener su localización subcelular como resultado de una combinación de varios mecanismos. Por lo cual, se vuelve crítico identificar cuáles son las proteínas interactúan con los RNAs para facilitar su localización (Farris *et al.*, 2014).

El transporte de un RNAm individual es energéticamente eficiente ya que éste mismo puede usarse para sintetizar múltiples copias de una proteína (Lipshitz and Smibert, 2000). Se sabe que aquellos RNAs que colocalizan suelen codificar para proteínas que forman parte de complejos proteicos, lo que incrementa la tasa de formación de complejos específicos y disminuye la formación de complejos inespecíficos no funcionales (Williams and Dichtl, 2018). Los RNAm pueden traducirse en cuanto llegan a su destino, pero también pueden localizarse y permanecer en una forma traducionalmente silenciada como es el caso de los RNAs del plasma germinal y algunos de los RNAs de herencia materna (McGrew *et al.*, 1989; Farley and Ryder, 2008; Dallaire, Frédérick and Simard, 2018). Existe evidencia de que no sólo los RNAm llegan a tener localizaciones subcelulares particulares, incluso se han descrito en RNAs no codificantes (miRNAs y lncRNAs), que por sí mismos llevan a cabo funciones específicas (Crerar *et al.*, 2019).

## Los gránulos de RNA y el citoesqueleto

Se han visto microscópicamente agregados de RNAm y proteínas que están involucrados en un amplio rango de procesos postranscripcionales, incluyendo degradación y represión de los RNAm (Anderson and Kedersha, 2009). Existe un grado de interacción entre diversos tipos de agregados ribonucleoproteicos (RNP), sugiriendo comunicación y transferencia entre ellos de RNAs y proteínas. Algunos de estos eventos tienen propiedades dinámicas incluyendo movimientos espacio-temporales, integridad estructural y eventos de fusión coordinados con el citoesqueleto (Rajgor and Shanahan, 2014).

La F-actina, pero particularmente los microtúbulos, han sido reconocidos como las plataformas de andamiaje de los gránulos de RNA que son transportados como RNPs. Existe una amplia gama de estos complejos macromoleculares, pero los más estudiados son los cuerpos P (en inglés P-bodies), los gránulos de estrés (GS) y los gránulos neuronales (GN) ya que tienen papeles muy importantes tanto en enfermedades como en el desarrollo (Rajgor and Shanahan, 2014).

Los cuerpos P o cuerpos de procesamiento se encuentran conservados evolutivamente, contienen componentes de la degradación de RNA y microRNAs que modulan la represión traduccional (Eulalio *et al.*, 2007). En algunos casos, estos agregados no son necesarios para la degradación y/o represión, pero funcionan como centros organizadores del transporte de RNAm dentro de las células (Pauley *et al.*, 2006). Estos macrocomplejos son muy sensibles, en especial en condiciones bajo estrés donde se favorece su formación por la actividad de elementos del citoesqueleto. Se piensa que su función es promover la degradación de varios RNAm y así generar una traducción preferencial de las proteínas heat-shock, enzimas de reparación y otros factores que ayuden a lidiar contra el estrés inducido por daño (Balagopal and Parker, 2009).

Los cuerpos P cuando están en movimiento se encuentran preferencialmente asociados con microtúbulos, y se considera que en estas condiciones están en un estado “activo”, mientras que cuando están en asociación con filamentos de actina se encuentran en un modo estático también llamado estado “no activo” (Rajgor and Shanahan, 2014). Los cuerpos P se translocan sobre los microtúbulos a lugares distales de la célula y pueden cambiar sus trayectorias, como se puede ver en la Figura 3, para lo cual se sugiere un papel muy importante de las proteínas motoras o de los organelos celulares que tienen anclados microtúbulos (i.e. las mitocondrias) (Aizer *et al.*, 2008; Huang *et al.*, 2011).

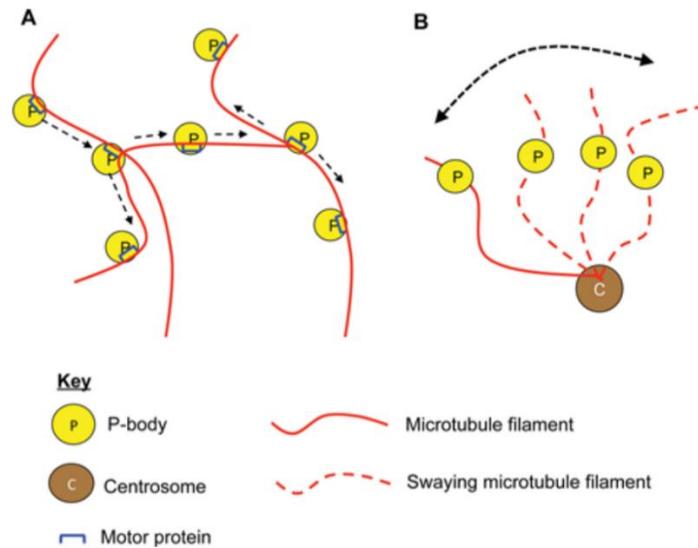


Figura 3. Movimiento de los P-bodies. A) Movimiento activo. B) Movimiento no activo (Rajgor and Shanahan, 2014).

La Miosina-Va es uno de los linkers de P-bodies en estado “no activo”, y la sobreexpresión de una mutación dominante negativa en células HeLa desacopla los agregados de los microtúbulos y retrasa su movimiento (Lindsay and McCaffrey, 2011). Otro linker que ha sido identificado para los gránulos es la Nesprina-1, que forma parte de los P-bodies para unirlos a los microtúbulos (Rajgor *et al.*, 2014).

Los gránulos de estrés (GS) son muy distintos a los P-bodies. La forma de los P-bodies es esférica, mientras que los GS es una forma alargada e irregulares en apariencia. También, los componentes de los GS son distintos; las proteínas específicas de los P-bodies son Dcp1a y Hedls y en los GS se encuentran TIA-1 y PABP (Proteínas de unión a PolyA) (Kedersha and Anderson, 2009). Los GS contienen RNAm poliadenilado además de subunidades ribosomales como 40S y muchos factores iniciadores de la traducción tales como el EIF3 (Kimball *et al.*, 2003). Estas diferencias implican que los RNAm en los GS son transcripcionalmente reprimidos, pero no dirigidos a degradación, mientras que en los P-bodies si están potencialmente listos para degradarse. Sin embargo, se ha demostrado en levadura que los P-bodies durante estrés se asocian con polisomas para que los RNAs puedan traducirse una vez que las condiciones cambian sugiriendo un papel también de almacenaje y no sólo de degradación (Bregues, Teixeira and Parker, 2005). Las proteínas motoras han sido previamente asociadas al ensamblaje y al movimiento de los P-bodies como de los GS. El knock-down de dineína y kinesina dan evidencia a un movimiento opuesto dirigido por estas proteínas motoras que también determina el ensamblaje y desensamblaje de los P-bodies y de los GS (Loschi *et al.*, 2009).

Los gránulos neuronales (GN) son agregados proteicos encargados de dirigir los RNAm a sitios distales celulares como dendritas y sitios de sinapsis donde son traducidos y tienen un efecto en el mecanismo de memoria, aprendizaje y mantenimiento de la plasticidad neuronal (Rajgor and Shanahan, 2014). La sobreexpresión de la kinesina aumenta la localización de RNAm en localizaciones distales de las dendritas y esta localización se encuentra reducida con el knock-down de este gen (Krichevsky and Kosik, 2001). Ahora sabemos que el transporte de los GN se lleva a cabo por el extremo C-terminal de la kinesina asociándose a Dcp1a de los P-bodies en neuronas hipocampales y cuando se lleva a cabo la activación neuronal incrementa la liberación de *Nd1* y *Arp2* RNAm que codifican para proteínas involucradas en la dinámica del citoesqueleto (Oh *et al.*, 2013).

Los gránulos de ribonucleoproteínas (RNP) tienden a tener una composición heterogénea dentro de la célula, complicando el estudio de sus componentes, ya que diferentes RNP pueden interactuar con un mismo RNA y de manera inversa, un mismo RNP puede reconocer diferentes marcas de múltiples RNAs de los cuales pocos han sido descritos (Engel *et al.*, 2020).

### Los elementos Cis de los RNAs

Los mecanismos de localización antes descritos recaen en muchos componentes, especialmente en el RNA y las proteínas que se les unen. Para que se lleve a cabo la localización correcta de los RNAs es necesario que se reconozca una señal de localización presente en un RNA (Barbarese *et al.*, 1988). Los elementos “Cis” dentro de los RNAs, frecuentemente acuñados como un tipo de “código postal” o “zipcode” en inglés, “marcan” el RNA para que sea llevado a un destino en particular. Estas marcas pueden ser tanto secuencias lineales o estructura secundaria de RNA (Engel *et al.*, 2020). Estas características facilitan la interacción entre el RNA y los elementos “trans”, que serían las proteínas que se asocian a los RNAs mediante sus dominios de unión especializados (Buxbaum, Haimovich and Singer, 2015). También, se asocian con proteínas del citoesqueleto (Gagnon and Mowry, 2011) que crean una red de interacciones, regulan los patrones de localización subcelular de los RNAs e incluso forman estructuras más complejas de tipo granular. Estos elementos Cis pueden variar en longitud desde unos cuantos pares de bases hasta alcanzar las kilobases. Aunque cientos de miles de RNAs son conocidos por ser transportados a regiones subcelulares particulares, las secuencias que regulan el transporte de estos transcritos han sido identificadas solo en un rango de unas pocas docenas de transcritos (Engel *et al.*, 2020).

La mayoría de los elementos reguladores de localización se encuentran en el 3’UTR de los RNAs, aunque algunos se localizan también en el 5’UTR, regiones codificantes y secuencias intrónicas (Meer *et al.*, 2012). Adicionalmente, los elementos de localización, o elementos Cis, se podrían encontrar no solo de manera única en el RNA, sino repetidos y redundantes. Estas repeticiones podrían permitir que muchas secuencias con baja afinidad actúen en conjunto para alcanzar la especificidad. Gracias a experimentos de mutación dirigida y transcritos reporteros se han descubierto un número pequeño de elementos Cis o zipcodes, mientras que por métodos bioquímicos se han descubierto zipcodes que dependen tanto de la estructura primaria y/o secundaria del RNA para su función (Jambhekar and Derisi, 2007). Algunos elementos Cis son necesarios, pero no suficientes para llevar a cabo la localización subcelular adecuadamente, sugiriendo que las secuencias vecinas en el RNA pueden ser importantes en el contexto del reconocimiento de los elementos Cis (Engel *et al.*, 2020). Por ejemplo, el RNA de *xcat2* en ovocitos de *Xenopus* localiza en el polo vegetal usando 6 repeticiones relativamente cercanas una de otra de un pequeño motivo UGCAC, presentes en su 3’UTR (Bubunenko *et al.*, 2002).

Muchos de los elementos Cis dependen de la estructura secundaria o terciaria de los RNA, p. e. los stem loops, para el reconocimiento de los factores trans (Buxbaum, Haimovich and Singer, 2015). Por ejemplo, los stem loops del 3’UTR del RNA de *bicoid* son reconocido por Staufen (STAU) para localizarse en el polo anterior del embrión (Ferrandon *et al.*, 1994; Macdonald and Kerr, 1997). Este tipo de elementos Cis estructurales de los RNA han sido los más difíciles de definir e identificar computacionalmente que los motivos de secuencias lineales.

### La localización de RNAs durante la ovogénesis de *Xenopus*

Se han descrito 2 vías por las cuales algunos RNAm de *Xenopus* se localizan en el córtex vegetal al final de la ovogénesis. Una de estas vías llamada METRO (por las siglas en inglés de message transport organizer) es encargada de localizar los RNAm de *Xlirts*, *Xcat2* y *Xwnt11* en una nube mitocondrial o Cuerpo de Balbiani durante los estadios tempranos de la ovogénesis, y que, además, cada transcrito exhibe un patrón de localización distinto mientras se aproximan al córtex vegetal (Kloc, Larabell and Etkin, 1996). Esta vía también llamada vía temprana (early pathway) involucra 3 pasos: el transporte de los RNAm a la nube mitocondrial, la clasificación de los RNAm en regiones específicas y la localización y anclaje en el polo vegetal. La otra vía de localización también llamada vía tardía es usada por otros RNAs como *Vg1* que, durante los estadios tempranos de la ovogénesis se encuentra disperso en el citoplasma, pero más tarde en la ovogénesis se transloca al polo vegetal, superponiendo su localización con los RNAs de *Xlirt*, *Xcat2* y *Xwnt11* que ya están anclados (Kloc, Larabell and Etkin, 1996). Estas dos vías son dependientes de los filamentos de actina, mientras que son independientes de los microtúbulos y participan en el establecimiento de los ejes y la línea germinal (Kloc and Etkin, 1995).

En *Xenopus* como en muchos otros organismos, la formación de la línea germinal depende del plasma germinal, que en esta especie contiene agregados de RNAm, proteínas y mitocondrias que se anclan al polo vegetal y después son heredados por los blastómeros vegetales que se convertirán más tarde en las células primordiales germinales. Uno de los RNAs de este plasma germinal es el represor traduccional *Nanos1*, también llamado *Xcat2*, el cual reprime la transcripción en los blastómeros que heredan el plasma germinal protegiéndolos de la diferenciación somática (Lai *et al.*, 2011). Hermes es una proteína que se sabe que reconoce al RNAm de *Nanos1* con ayuda de su motivo de unión a RNA. Hermes, además, tiene un homólogo en pez cebra presente en su plasma germinal llamado *Rbpms2*. Al inyectar el RNAm de *Rbpms2* en ovocitos tempranos en la ovogénesis de *Xenopus*, esta proteína homóloga es capaz de reconocer el RNAm de *Nanos1* de *Xenopus* (Nijjar and Woodland, 2013) lo que sugiere que tanto los componentes del plasma germinal, como los mecanismos de reconocimiento de señales de localización se han conservado evolutivamente.

### El plasma germinal en pez cebra

El plasma germinal en pez cebra está compuesto por una nube mitocondrial, así como proteínas y RNAs. Estos componentes son depositados durante la ovogénesis temprana en una localización perinuclear en lo que es llamado "Cuerpo de Balbiani". La ovogénesis del pez cebra está dividida en cinco etapas definidas por criterios bioquímicos y morfológicos (Tabla 1). En las primeras cuatro etapas, las principales características del ovocito son la gran actividad transcripcional, la enorme cantidad de nucleolos y de actividad endocítica, y que están orientados al crecimiento y la acumulación de RNAs, proteínas y lípidos con el propósito de convertirse en un óvulo maduro, de 750  $\mu\text{m}$  de diámetro con una rica organización interna, capaz de contender con el estrés osmótico y dar lugar a un nuevo organismo (Lessman, 2009).

Etapas	Diámetro $\mu$ m	Características
IA Crecimiento primario (fase pre-folículo)	7 - 20	Acumulación de nucleolos alrededor de la vesícula germinal (núcleo).
IB Crecimiento primario (fase de folículo)	20 -140	Aparición de cromosomas descondensados y aumento en la actividad transcripcional. Ovocito transparente. Formación del cuerpo de balbiani o nube mitocondrial adyacente a la vesícula germinal
II Alveolos corticales	140 - 340	Se observan hasta 1500 nucleolos involucrados en la síntesis de RNA ribosomal. Aparición de alveolos corticales, agregados de proteínas y carbohidratos, que opacan la vesícula germinal
III Vitelogénesis	340-690	Alveolos corticales se mueven a la periferia. Acumulación de vitelogenina y lípidos
IV Maduración	690-730	Migración de la vesícula germinal al polo vegetal del ovocito y liberación del primer cuerpo polar (meiosis)
V Óvulo	730-750	Liberación del óvulo maduro

Tabla 1 Etapas de la ovogénesis en pez cebra.

En contacto con el agua, el óvulo se activa y cambia su organización interna. Contracciones de los microfilamentos de actina provocan el transporte del ooplasma por medio de corrientes axiales con dirección al polo animal para formar el primer blastómero. Gracias a las corrientes axiales, los RNAs del plasma germinal, que se encontraban anclados en el polo vegetal del ovocito, ya se encuentran en el polo animal antes de comenzar las primeras divisiones celulares (Figura 4)(Pelegri, 2003).

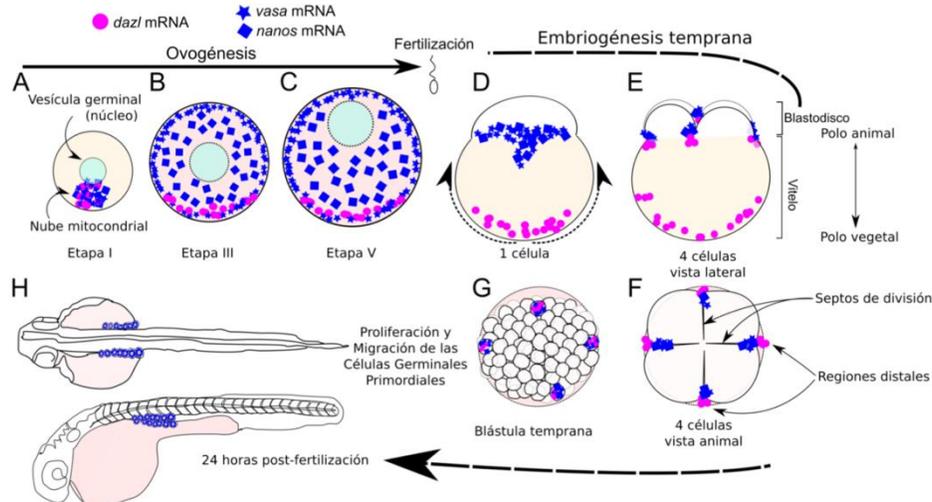


Figura 4. Esquema de la migración del plasma germinal durante la ovogénesis y la embriogénesis temprana. Etapa I se ensambla en el cuerpo de Balbiani una nube mitocondrial y RNAm del plasma germinal (A). A partir de la etapa III (B) y hasta la etapa V (C), los mensajeros de *vasa* (estrellas azules) y *dazl* (círculos rosas) se asocian a la corteza, en el caso de este último, de manera asimétrica concentrándose sólo en el polo vegetal. *nanos*, cuyo RNAm está representado como cuadrados azules, se distribuye homogéneamente por el citoplasma. Luego de la fertilización, los RNAm germinales del polo animal (*vasa* y *nanos*, entre otros) se translocan a la primera célula (D), distinguiéndose de *dazl*, representante del plasma germinal vegetal, cuya translocación es tardía. Durante las primeras dos divisiones ambos grupos convergen por vías distintas a los septos de división (E y F). Más adelante en el desarrollo, los agregados del plasma germinal se internalizan a los blastómeros que se convertirán en las CGP (G y H) (Miranda Rodríguez, 2018).

Durante las siguientes divisiones celulares, los agregados del plasma germinal se internalizan a 4 de los blastómeros que se mantienen relativamente inmóviles, cerca del margen del blastodisco (Figura 4). Alrededor de las 3 horas post-fertilización, las células que heredaron el plasma germinal se especifican como CGP, coincidiendo más o menos en el tiempo con la transición de la blástula media y la activación de la transcripción cigótica en las células somáticas. Posteriormente, aproximadamente en el inicio de la gastrulación, las CGP del pez adquieren movilidad y migran hacia la línea media en formación,

siguiendo señales específicas de atracción. De este modo, 24 horas después de la fertilización, se pueden encontrar dos grupos de CGP a ambos lados de la línea media del embrión, en la que será su posición definitiva dentro de las futuras gónadas (Figura 4) (Raz, 2003; Blaser, 2005).

### Los RNAs mensajeros y las proteínas del plasma germinal en pez cebra

Los RNAs del plasma germinal más caracterizados son *vasa*, *dazl* y *nanos*, que son llevados junto con el CB al polo vegetal del ovocito, formando un gradiente. Al final de la ovogénesis, *dazl* se localiza únicamente en el polo vegetal, mientras que *vasa* se localiza en todo el córtex del ovocito y *nanos* disperso en todo el ovocito durante la maduración hasta que se lleva a cabo la fertilización (Figura 5)(Kosaka *et al.*, 2007). Esta localización diferencial es interesante ya que sugiere una regulación muy fina de los componentes del plasma germinal durante la ovogénesis; haciendo al modelo de pez cebra ideal para el estudio de la localización de diferentes RNAs durante el proceso de segregación.

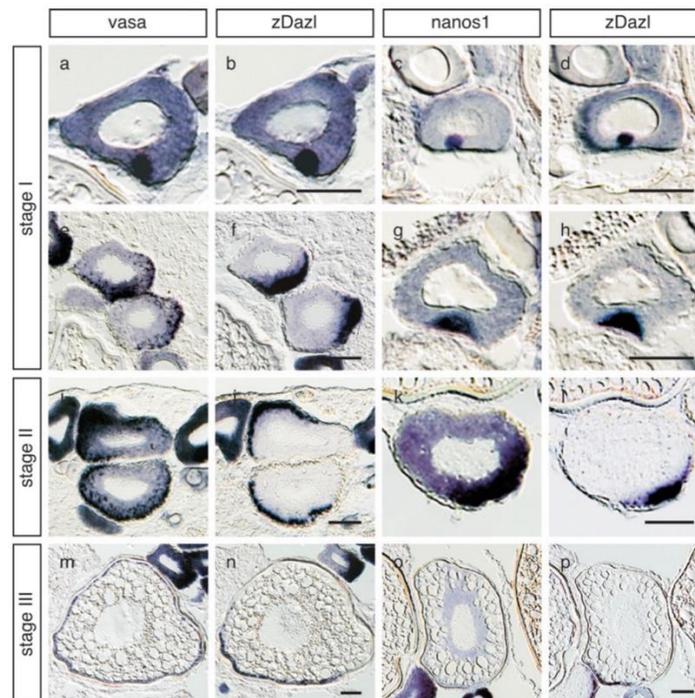


Figura 5. Distribución del plasma germinal durante la ovogénesis. Hibridación *in situ* de cortes seriados de ovocitos tempranos de pez cebra. Distribución comparativa de RNAm de *vasa* y *dazl* (a, b, e, f, i, j, m, n) y *nanos1* y *vasa* RNAm (c, d, g, h, k, l, o, p) en ovocitos en estadios I (a–h), II (i–j), y III (m–p). Los cortes tienen un grosor de 10µm. La barra de escala es de 50µm (Kosaka *et al.*, 2007).

El componente clave para el ensamblaje del cuerpo de Balbiani de pez cebra es Bucky Ball (Buc), una proteína la cual no tiene dominios reconocidos y de la cual no se tiene aún su estructura cristalográfica, pero su secuencia aminoacídica está muy conservada con dominios intrínsecamente desordenados. Cuando Buc se encuentra mutado para una pérdida de función, los ovocitos pierden la polaridad animal-vegetal y los elementos del plasma germinal no se agregan en el cuerpo de Balbiani, quedando dispersos, como se puede ver en la Figura 6, sin alterar la expresión de los componentes. Sin embargo, la sobreexpresión de Buc hace que por lo menos una tercera parte de los embriones se desarrollen teniendo un fenotipo con defectos en el eje dorsoventral a las 24 horas post fertilización (hpf) y los ovocitos generan más de un cuerpo de Balbiani (Figura 7) (Heim *et al.*, 2014).

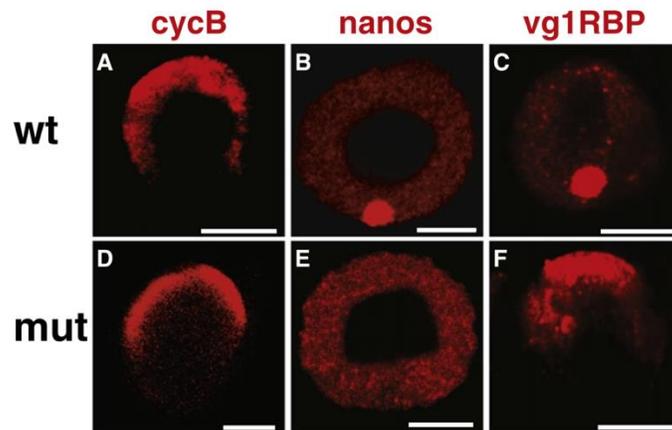


Figura 6. Pérdida de función de *buc* altera la localización de los RNAs de plasma germinal. Hibridación *in situ* de ovocitos tempranos en Ib. que muestran RNAm (rojo) de *ciclina B* (A y D), *nanos* (B y E) y *vg1RBP* (C y F) en tipo silvestre (A– C) y ovocitos mutantes de *buc* (D – F). La localización de los RNAm de *nanos* y *vg1RBP* en el cuerpo de Balbiani se pierde en los mutantes (E y F), pero los RNAm de *cyclinB* y *vg1RBP* todavía muestran una localización polarizada (D y F). Polo animal hasta arriba. Barra de escala representa 25 mm (Bontems *et al.*, 2009).

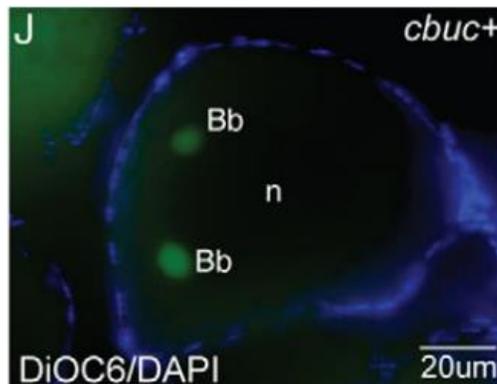


Figura 7. Cuerpos de Balbiani ectópicos en ovocitos de pez cebra hembra con sobreexpresión de Bucky ball. Tinción con DiOC6 de ovocitos seccionados revelando cuerpos de Balbiani y cotinción con DAPI para visualizar núcleos. Imagen modificada de Heim *et al.*, 2014.

Existen otras proteínas involucradas en definir la arquitectura del cuerpo de Balbiani, como lo son *Tdrd6a* y *Rbpms2b*. *Tdrd6a* es una proteína que tiene multidominios capaces de reconocer la marca sDMA (dimetilación de las argininas) en las proteínas Piwi, cuyo papel es crítico en el desarrollo de células germinales, incluyendo *Drosophila* y mamíferos (Liu *et al.*, 2010; Siomi, Mannen and Siomi, 2010). *Tdrd6a* interactúa con Bucky ball afectando su capacidad de agregación, tanto en el cuerpo de Balbiani, como en las partículas germinales en los primeros dos septos de división del embrión, afectando también el desarrollo de la línea germinal (Roovers *et al.*, 2018). *Rbpms2b* es una proteína que posee un dominio de unión a RNA con el cual puede reconocer sus RNAs blanco, agregarse dentro de estructuras granulares ribonucleoproteicas y que además interactúa con moléculas esenciales para el destino germinal, como lo es Bucky ball. Sin embargo, los ovocitos mutantes para esta proteína, *Rbpms2b*, llegan a tener inclusiones citoplasmáticas en el Cuerpo de Balbiani si su dominio de unión a RNA tiene alguna mutación, que no es debido a la acumulación aberrante mitocondrial o de *Buc*. Aquellos embriones mutantes que se recuperan de un edema característico del fenotipo de estos peces mutantes para *Rbpms2b* presente a los 3dpf, se desarrollan sólo como machos adultos fértiles (Kaufman *et al.*, 2018).

Así como existen elementos importantes para el ensamblaje y formación del Cuerpo de Balbiani, se han demostrado que también existen elementos indispensables para su desensamble y migración al polo

vegetal. Esto fue demostrado en ovocitos tempranos de pez cebra mutantes en la proteína Macf1a (microtubule-actin crosslinking factor 1) los cuales presentaban un cuerpo de Balbiani anormalmente agrandado que no migra hacia el polo vegetal, ni es capaz de desensamblarse (Figura 8). Macf1 tiene dominios de unión, tanto a microfilamentos, como a microtúbulos, lo cual apoya la idea de que la migración y el ensamblaje del cuerpo de Balbiani dependen de la correcta coordinación entre la actina y la tubulina (Escobar-Aguirre *et al.*, 2017).

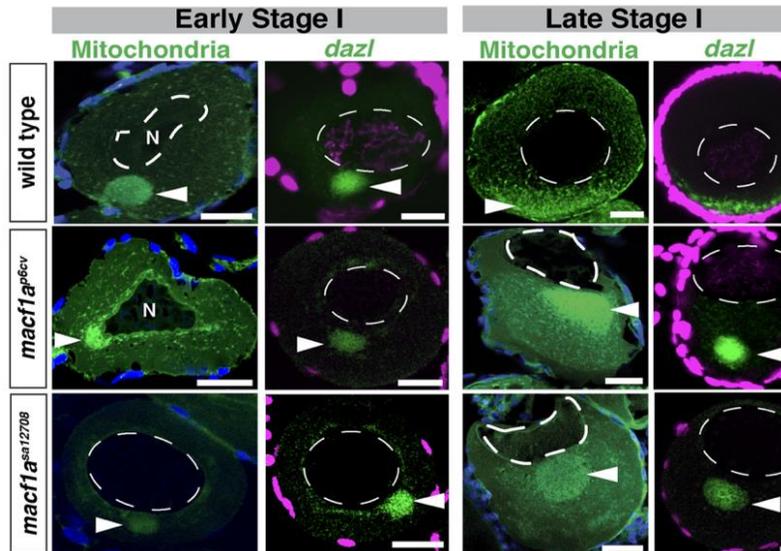


Figura 8. Macf1 es indispensable para el desensamblaje del cuerpo de Balbiani y la correcta localización nuclear. Se puede diferenciar la dinámica de la migración del cuerpo de Balbiani hacia el polo vegetal con dos indicadores, las mitocondrias teñidas con DiOC6 y el RNAm de *dazl* (Escobar-Aguirre *et al.*, 2017).

Una vez que ocurre la fertilización gracias a la participación de la Kinesina-1, es posible que las partículas germinales (GP) puedan migrar del polo vegetal, al polo animal del embrión. Estas partículas germinales usan de andamio a la proteína motora Kinesina-1, la cual los transporta a la parte más distal de los primeros dos septos de división del embrión (Campbell *et al.*, 2015).

Por lo anterior, es evidente que la localización correcta y la organización del plasma germinal es facilitada tanto por proteínas interconectoras, proteínas motoras, elementos del citoesqueleto, así como sus proteínas reguladoras, que comúnmente son miembros de la familia de las Rho-GTPasas.

### Las Rho GTPasas

Las Rho GTPasas son una familia de proteínas que participan en vías de señalización que regulan una gran variedad de procesos celulares, algunos ejemplos son: la polarización, la adhesión célula-célula, la adhesión célula-matriz extracelular, el tráfico de membrana, la regulación de la dinámica del citoesqueleto y la regulación de la transcripción de diversos genes (Boettner and Van Aelst, 2002). Las Rho GTPasas funcionan como interruptores moleculares, que en su estado activo están unidas a GTP y en su estado inactivo están unidas a GDP (Jaffe, 2005). La conversión al estado activo se produce por factores de intercambio de guanidín nucleótidos (GEFs, por sus siglas en inglés). De forma contraria su inactivación es promovida por proteínas activadoras de la actividad de GTPasa (Boettner and Van Aelst, 2002). En su estado activo, las Rho GTPasas son capaces de unirse a proteínas efectoras para remodelar el citoesqueleto. La caracterización de las funciones biológicas de varias de las Rho GTPasas han sido analizadas principalmente en las células en el cultivo participando en procesos muy distintos cada una de ellas en un mismo tipo celular (Figura 9) (Boettner and Van Aelst, 2002).

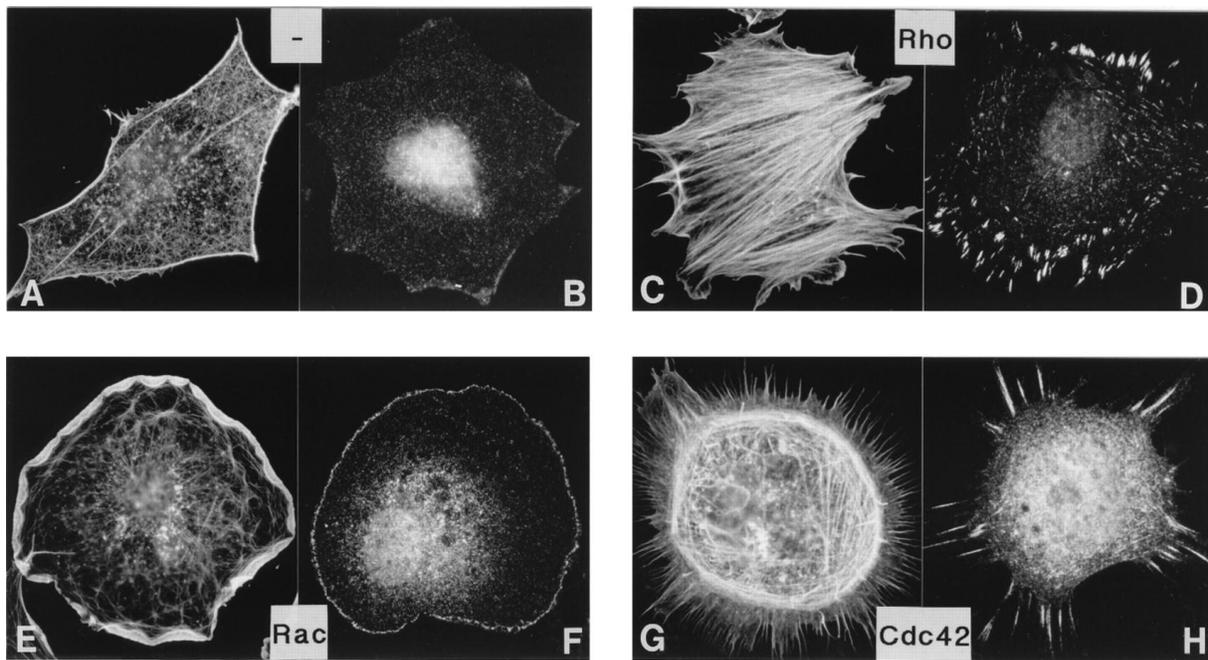


Figura 9. Rho, Rac, y Cdc42 controlan el ensamblaje y organización del citoesqueleto de actina. Activación de Rho, Rac o Cdc42 en fibroblastos Swiss 3T3. En (A), (C), (E) y (G), los filamentos de actina se visualizaron con faloidina rodamina; en (B), (D), (F) y (H), los complejos de adhesión se visualizaron con un anticuerpo contra la vinculina. Escala: 1 cm = 25  $\mu$ m. (Hall, 1998)

Existe evidencia del papel de las Rho GTPasas para la localización del RNAm de  $\beta$ -actina en fibroblastos embrionarios de pollo donde la vía de RhoA y su proteína efectora Rock pareciera ser fundamental para lograr la asimetría de este transcrito en la lamela de fibroblastos una vez que Rock ha fosforilado a la cadena ligera de la miosina IIb (Latham *et al.*, 2001). No obstante, también existe evidencia de que el RNAm de la proteína efectora de RhoA, *dia1*, se localiza perinuclearmente en fibroblastos embrionarios de pollo debido a una interacción de RhoA con el péptido nascente de esta proteína efectora independientemente de un zipcode en su RNA (Liao, Ma and Liu, 2011). En células tumorales se ha visto que la localización de los RNAm en las proyecciones celulares es regulada también por ROCK sin afectar el recambio de actina, lo que lleva a una traducción restringida en esta región subcelular (Stuart *et al.*, 2008).

## Antecedentes

### RhoA durante el desarrollo embrionario de pez cebra

La localización del plasma germinal durante las primeras divisiones celulares en el desarrollo embrionario de pez cebra está determinada en buena parte por la acción del citoesqueleto (Pelegri *et al.*, 1999; Kishimoto *et al.*, 2004; Urven, Yabe and Pelegri, 2006), por lo cual se decidió estudiar el papel de las Rho-GTPasas, los reguladores maestros del citoesqueleto, durante la localización de los RNAs del plasma germinal el desarrollo temprano del pez cebra.

En la tesis de maestría de Jerónimo Miranda, bajo la tutoría de la Dra. Denhí Schnabel Peraza, del Instituto de Biotecnología-UNAM, se descubrió que sólo RhoA se encuentra localizada en los primeros dos septos de la división celular (Figura 10) (Miranda-Rodríguez, 2012). Cdc42 parece estar enriquecido muy levemente en uno de los septos alrededor de vesículas próximas a la parte más central de los septos de división y Rac1 muestra una señal débil muy homogénea por todo el embrión (Figura 10 A-C). También se encontró que RhoA antecede la localización de los RNAm del plasma germinal, funcionando como una cremallera que permite la localización distal en el septo de división celular (Figura 10 D y E). Debido a la ausencia de una señal de Rac1 y Cdc42 en los primeros dos septos de división en el desarrollo temprano de pez cebra, se decidió tomar como objeto de estudio el papel de las proteínas las RhoA durante el proceso de la ovogénesis.

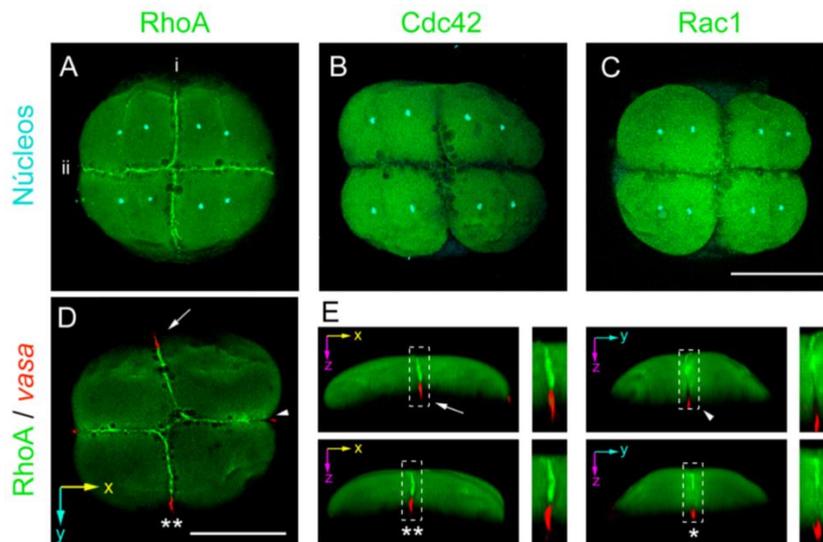


Figura 10. Localización de RhoGTPasas durante las primeras divisiones de la embriogénesis de pez cebra. Localización de RhoA (A) Cdc42 (B) y Rac1 (C) en la etapa de cuatro células. RhoA, a diferencia de Cdc42 y Rac1, se enriquece claramente en ambos septos de división (i y ii marcan la posición del primer y segundo septo, respectivamente). Cdc42 parece tener una leve localización a uno de los septos (B, asterisco), mientras que Rac1 tiene una localización completamente homogénea. (D) Co-tinción de RhoA y el mensajero de *vasa*. (E) Vistas laterales y detalles de los cuatro septos a partir de la rotación de una reconstrucción en 3D de (D). Barras: 100  $\mu$ m (Miranda-Rodríguez *et al.*, 2017).

Con la finalidad de estudiar la función de la actividad de RhoA en la localización del plasma germinal se decidió inyectar el inhibidor de RhoA, Rhosin en embriones recién fertilizados. Este inhibidor se une a la región de unión al intercambiador de nucleótido (GEF) generando un impedimento estérico entre RhoA y la proteína GEF. Después de haber inyectado el inhibidor se puede observar la pérdida de la señal de RhoA en los primeros dos septos de división. Cabe resaltar que la formación de los septos no se afectó, pero si se afectó la localización del plasma germinal; localizándose ahora más hacia la parte central de los primeros dos septos de división del embrión comparado con los embriones controles. De

manera interesante, está perdida en la localización coincide con la pérdida de la señal de RhoA en los primeros dos septos de división (Miranda-Rodríguez *et al.*, 2017) (Figura 11).

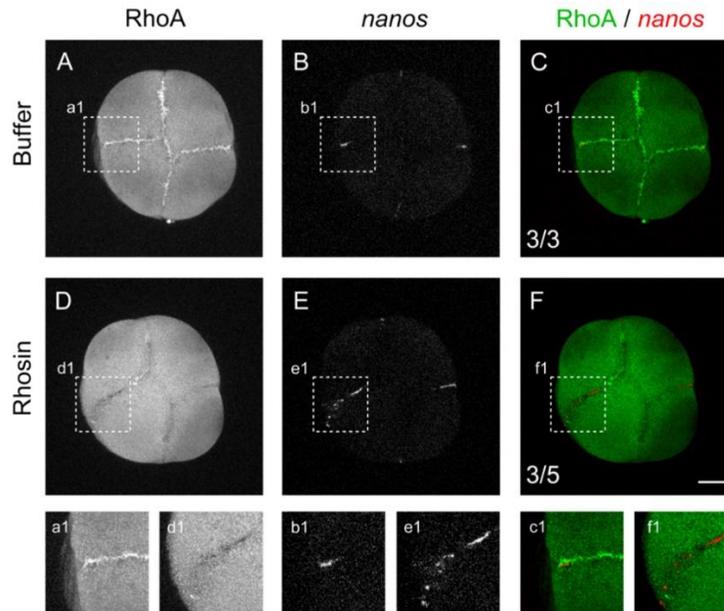


Figura 11. Deslocalización del plasma germinal con la inhibición de Rho en las primeras divisiones del embrión de pez cebra (A, a1, B, b1, C, c1). La inyección de Rhosin afecta la cantidad de RhoA en el septo de división (D, d1) acompañada de deslocalización del plasma germinal por falta de compactación a la región distal (E, e1). Barra: 100µm (Miranda-Rodríguez *et al.*, 2017).

Para saber si el efecto en la localización del plasma germinal en la embriogénesis temprana del pez cebra derivado de la inhibición de RhoA tenía efectos en la formación de células primordiales germinales, los embriones inyectados con el inhibidor Rhosin se dejaron desarrollar hasta las 24hpf y se observó la disminución o desaparición de las células primordiales germinales (Figura 12) (Miranda-Rodríguez *et al.*, 2017).

Asimismo, para conocer la vía de señalización implicada en la localización correcta del plasma germinal, se llevó a cabo la misma metodología, pero ahora inhibiendo a Rock, uno de los principales efectores de RhoA, observándose el mismo efecto tanto en la localización del plasma germinal en el estadio de 4 células, como a las 24 horas. Se demostró así que la vía RhoA/Rock es necesaria para la correcta localización de los RNAs del plasma germinal durante el desarrollo temprano del pez cebra (Miranda-Rodríguez *et al.*, 2017). De manera interesante, el efecto de estos dos inhibidores reveló un papel no convencional en la dinámica de los microtúbulos, mientras que no se observó ningún efecto en los filamentos de actina.

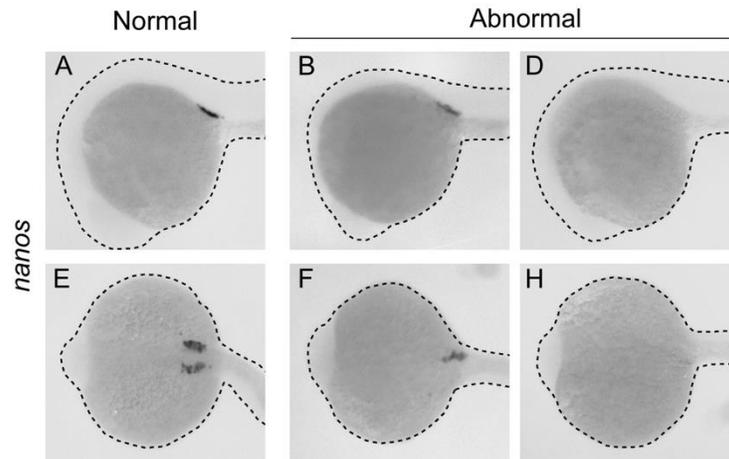


Figura 12. Inhibición de Rhoa en el desarrollo temprano de pez cebra disminuye significativamente la cantidad de células progenitoras germinales (Miranda-Rodríguez *et al.*, 2017).

### RhoA durante la ovogénesis de pez cebra

Se han descrito 32 homólogos de las Rho-GTPasas (Salas-Vidal *et al.*, 2005) y se ha demostrado que se expresan tanto en el desarrollo como en el animal adulto. De estos homólogos, sólo 5 genes son homólogos para genes RHO de humano: *rhoaa*, *rhoab*, *rhoac*, *rhoca* y *rhocb*. Para saber si estos genes también se expresaban en ovario, órgano en el cual durante el desarrollo los ovocitos tienen un dinamismo en la localización del plasma germinal (Kosaka *et al.*, 2007), se procedió a realizar experimentos de RT-PCR para *rhoaa*, *rhoab*, *rhoac*, *rhoca* y *rhocb* y solo para 4 de ellos se identificó la presencia del transcrito por esta técnica (*rhoaa*, *rhoac*, *rhoca* y *rhocb*) (Miranda Rodríguez, 2018). Mediante estudios preliminares de hibridación *in situ* para se corroboró la presencia o ausencia de los transcritos en los diferentes estadios de la ovogénesis, mostrando patrones de expresión muy diferentes para cada gen (Figura 13) (Miranda Rodríguez, 2018).

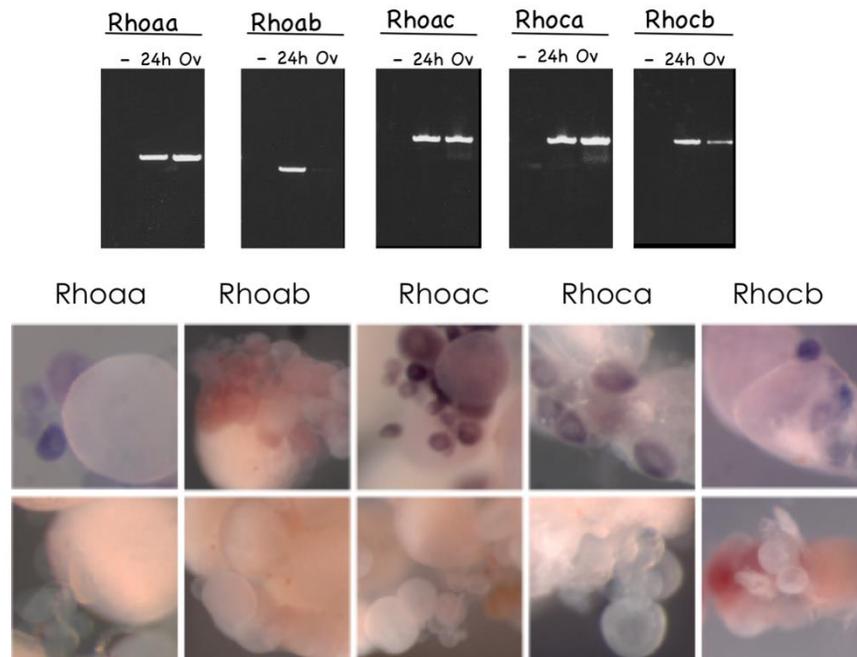


Figura 13. RT-PCR e hibridación *in situ* de los 5 parálogos de *rho* en pez cebra (Miranda Rodríguez, 2018).

Para dilucidar si la proteína RhoA podría tener un patrón similar o colocación con el plasma germinal que sugiera una relación entre ellos, en el trabajo de maestría de Miranda en 2012 se realizó la inmunofluorescencia de RhoA en cortes de ovocitos. Se distinguió tanto señal en la periferia celular en ovocitos tardíos como un gradiente de la proteína que podría estar orientada hacia el polo vegetal del ovocito (Figura 14) (Miranda-Rodríguez, 2012), que es donde migra el plasma germinal y que además es muy parecido a varios patrones de expresión de estos RNAm involucrados como lo son *vasa*, *dazl* y *nanos3*, descritos por Kosaka en 2007 (Kosaka *et al.*, 2007).

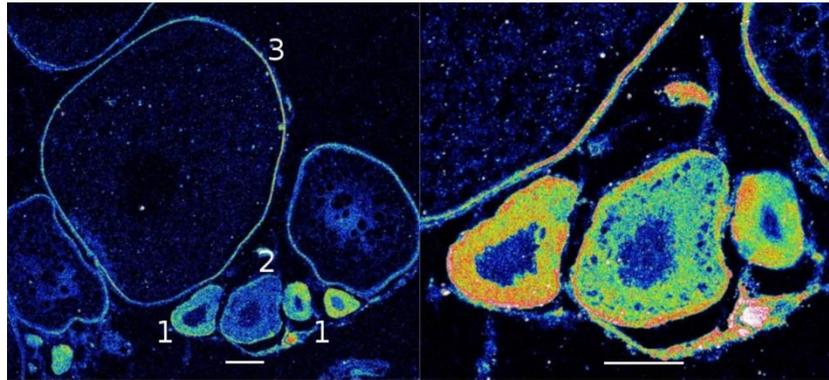


Figura 14. La expresión de RhoA en ovocitos sugiere un gradiente. a) Corte de ovario que muestra ovocitos en diferentes etapas de maduración. b) Imagen en fluorescencia del mismo corte. c) La misma imagen con los píxeles codificados según su intensidad: los píxeles de mayor intensidad en los colores cálidos y los píxeles menos intensos en azul. La etapa de desarrollo de los ovocitos está marcada con números arábigos por claridad. d) Imagen de los mismos ovocitos en etapas I y II tomada con un mayor aumento, con colores falsos para mostrar más claramente el grado de intensidad de fluorescencia. Barras: 100  $\mu\text{m}$  (Miranda-Rodríguez, 2012).

Se corroboró a mayor detalle la localización de RhoA en los estadios más tempranos. Se realizó una co-tinción de la actina y RhoA, donde la actina reveló la localización de la nube mitocondrial característica del cuerpo de Balbiani y se observó que colocalizaba con la señal de RhoA en los ovocitos del pez cebra en etapa 1a (Figura 15) (Miranda-Rodríguez, 2012). Esto nos indica que RhoA podría tener un papel fundamental no solo en el desarrollo embrionario, sino que su función podría estar regulando la localización del plasma germinal desde la ovogénesis.

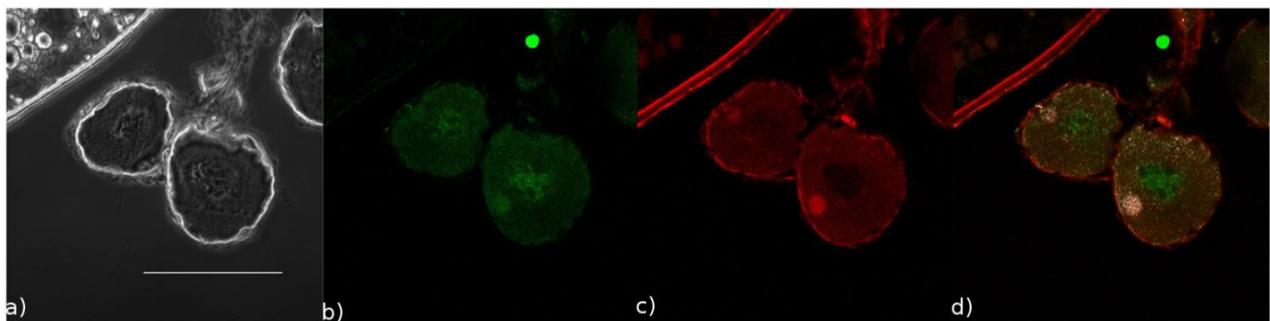


Figura 15. Colocalización del plasma germinal y RhoA en ovocitos. a) Corte donde se observan dos ovocitos en etapa Ib.) Inmunofluorescencia contra RhoA. c) Tinción de filamentos de actina utilizando faloidina fluorescente. d) Sobrelape de b) y c) donde se han resaltado en blanco los píxeles co-localizados que tienen una mayor intensidad en ambas imágenes. Barra: 100  $\mu\text{m}$  (Miranda-Rodríguez, 2012).

Para evaluar el papel de RhoA durante la ovogénesis, se realizaron cultivos utilizando al inhibidor Rhosin. Los resultados mostraron después de 12 horas de cultivo múltiples Cuerpos de Balbiani o su ausencia en los ovocitos en estadio Ia (Figura 16); resultado muy similar a lo que pasa con la sobreexpresión de Bucky ball y los ovocitos mutantes para este gen. Por el contrario, se observó la permanencia del cuerpo de Balbiani en los ovocitos de estadio Ib-II tratados con el inhibidor (Figura 17);

resultado muy similar a lo que les ocurre a los ovocitos mutantes para *Macf1a* y la pérdida del gradiente en algunos otros. Esta evidencia sugiere que RhoA podría estar participando en el ensamblaje y desensamblaje del plasma germinal en el Cuerpo de Balbiani.



Figura 16. Múltiples cuerpos de Balbiani por inhibición de Rho. Hibridación *in situ* de *dazl* de ovocitos en estadio Ia cultivados con el inhibidor Rhosin presentando un único (A) o múltiples cuerpos de Balbiani (B).

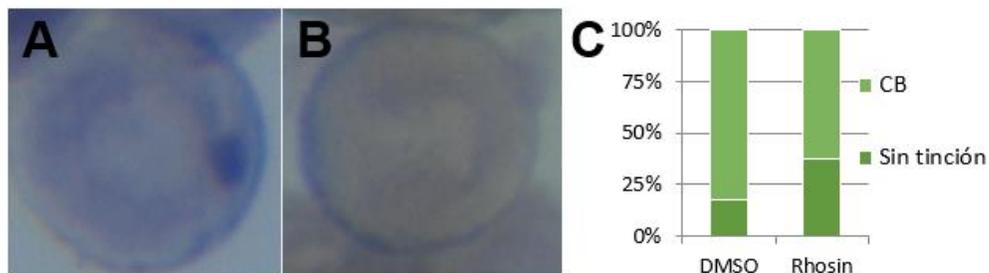


Figura 17. Inhibición de Rho altera la localización del plasma germinal. Hibridación *in situ* de *dazl* de ovocitos en estadio Ib-II cultivados con el inhibidor Rhosin presentando aún un cuerpo de Balbiani (A) o sin presentar tinción (B). Cuantificación (C).

Rock fue la primera proteína efectora descrita de la vía de RhoA (Leung *et al.*, 1996), conserva una actividad serin/treonin cinasa que sirve para fosforilar la cadena ligera de la miosina-II y participar en la contracción celular (Riento and Ridley, 2003), formación de fibras de estrés y adhesiones focales (Somlyo and Somlyo, 2000). Seguido de su dominio de actividad cinasa tiene una región coiled-coil, dentro de la cual se encuentra un dominio de unión a Rho y plectrina que son considerados parte de la región autoinhibitoria reduciendo la actividad cinasa de esta proteína (Amano *et al.*, 1999).

Otra de las proteínas efectoras participes en la vía de RhoA son las forminas, que son una familia muy extensa de proteínas que participan de forma dimérica promoviendo la polimerización de los filamentos de actina (Grikscheit and Grosse, 2016). El dominio FH2 es necesario para la dimerización de las forminas y la nucleación de los primeros 2-3 monómeros de actina, un paso esencial y energéticamente muy costoso y limitante de la velocidad para la polimerización de actina (Otomo *et al.*, 2005). El dímero FH2 rodea y permanece adherido al extremo que se encuentra en crecimiento de F-actina, adicionando cientos de monómeros de G-actina (Kovar and Pollard, 2004). Las subfamilias DIAPH, DAAM, FMNL, y FHOD tienen en la región N-terminal un dominio de unión a GTPasas (GBD) y un dominio de inhibición (DID, diaphanous inhibitory domain), el cual se une al dominio de autorregulación (DAD) que se encuentra en el extremo C-terminal, resultando una conformación autoinhibitoria (Kühn and Geyer, 2014). La ruptura de esta interacción de los dominios DID y DAD es debido a la unión de las proteínas Rho, las cuales liberan a la formina de su estado autoinhibitorio, activando la polimerización de actina (Goode and Eck, 2007). A pesar del amplio número de miembros de las forminas, muchas de ellas comparten funciones en la regulación del citoesqueleto, y otras, roles celulares diferentes. Dentro de las funciones más estudiadas se encuentran la formación de filopodios, lamelopodios, fibras de estrés, anillos contráctiles para la citocinesis, y tráfico de vesículas y organelos (Fernandez-Borja *et al.*, 2005).

## Justificación

Los RNAm del plasma germinal se localizan de manera diferencial durante la ovogénesis en pez cebra. Para que se lleve a cabo la localización correcta de los RNAm es necesario el reconocimiento de elementos en Cis por la maquinaria de localización de los RNAs. Durante la embriogénesis temprana se sabe que la vía de RhoA/ROCK es importante para la localización de los RNAs del plasma germinal. RhoA tiene una localización similar a los componentes del plasma germinal durante la ovogénesis de pez cebra; lo que sugiere que puede estar involucrado en la localización de los RNAs del plasma germinal. Existen resultados preliminares que muestran que cuando se inhibe la actividad de RhoA durante el desarrollo de ovocitos se observa un efecto en la formación del cuerpo de Balbiani. Por lo tanto, la localización de los RNAs del plasma germinal puede estar regulada por la vía de RhoA.

## Hipótesis

La vía de RhoA está involucrada en la dinámica de localización del plasma germinal de *Danio rerio*.

## Objetivo general

Estudiar los mecanismos que regulan la localización de los RNAs del plasma germinal durante la ovogénesis del pez cebra.

## Objetivos particulares

Predecir elementos Cis en los RNAm de pez cebra que podrían dirigir su localización subcelular al Cuerpo de Balbiani o al polo vegetal del ovocito.

Comprobar la presencia de transcritos de los efectores de la vía de Rho tanto de la familia de Rock como de las forminas durante la ovogénesis

Evaluar la posible función de Rock durante la ovogénesis del pez cebra.

## Metodología

### Mantenimiento de pez cebra

En el bioterio contamos un sistema de recirculación de agua de la marca Aquatic Habitats donde se mantienen los peces adultos a una temperatura de 28 °C, un pH de 7 y 400  $\mu$ S de conductividad y en un ciclo de 14 horas luz, 10 horas de oscuridad (Westerfield, 2007).

### Extracción y fijado de ovario

Se adormece el ejemplar con agua de acuario con hielo, posteriormente a la pérdida de motilidad que debe perderse en menos de medio minuto, se pone el ejemplar en una superficie plana y limpia sujetando con agujas para cortar la cabeza y seguido de eso se le hace una cirugía cortando el tejido ventral desde la parte pectoral a la caudal para poder extraer el ovario.

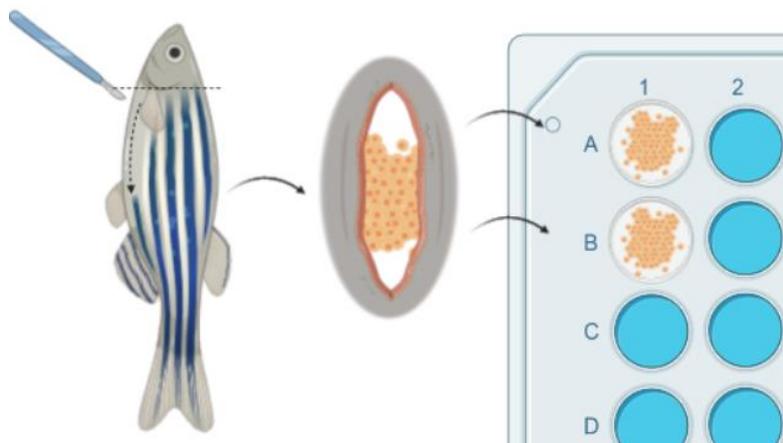


Figura 18. Extracción y cultivo de ovocitos.

Para fijar el tejido se utiliza solución MEMFA para inmunotinciones o PFA 4% para hibridaciones *in situ* y se deja incubando toda la noche a 4°C.

### Soluciones

- Agua de acuario: 4.2 gr de  $\text{NaHCO}_3$ , 3 gr de Instant Ocean en 80 L de agua.
- MEMFA: MOPS (USB) 2.08 g, EGTA 400  $\mu$ L de Stock 0.5M,  $\text{MgSO}_4$  (Sigma®) 24 mg, Formalina (Sigma) 10 mL stock 37% en 100 mL de  $\text{H}_2\text{O}$  (Modificado de Klymkowsky, 2018).
- Paraformaldehído 4%: Se preparó en campana de flujo. Se calentaron 450ml de  $\text{H}_2\text{O}$  a 60 °C. Se agregaron 20 gramos de paraformaldehído (Sigma®) y se mantuvo en agitación y a 60°C. Se adicionaron 5 gotas de NaOH 2N (1 gota por cada 100ml). La solución se volvió clara en un par de minutos (hay partículas finas que no desaparecen). No se debe calentar a más de 70 °C porque el paraformaldehído se degrada. Se retiró y se adicionaron 50 ml de PBS 10X. Posteriormente, se ajustó el pH a 7.2 utilizando HCl cuando fue necesario. Finalmente, se filtró y se almacenó a -20 °C.

### Cultivo de ovarios

Se extrae el ovario y se disgregan los ovocitos en medio Cortland y se incuban a 28 °C en cajas de 48 pozos de fondo plano (NEST) con un mililitro de medio Cortland con o sin inhibidor. La concentración final del inhibidor de Rock H-1152 en el medio Cortland fue de 25  $\mu$ M.

Medio Cortland: 100 mL de agua destilada, 1.45 gr de NaCl (124.1 mM), 76 mg de KCl (5.1 mM), 82 mg de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (2.9 mM), 380 mg MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O (1.9mM), 32 mg de CaCl<sub>2</sub> 2H<sub>2</sub>O (1.4 mM), 200 mg de NaHCO<sub>3</sub> (11.9 mM), 8 gr Polyvinilpyrrolidone (PVP 4%), 2mg USP units Heparin. Se filtra la solución, se esteriliza y guarda a 4 °C (Modificado de Wolf, 1963).

### Inmunofluorescencia en cortes de ovario

El procedimiento es el siguiente:

- Los ovarios se fijan con solución MEMFA durante al menos 12 horas a 4 °C.
- Se pasan a gradientes sucesivamente mayores de sacarosa hasta llegar a sacarosa al 30 %, con el fin de protegerlos del daño por el frío extremo.
- Se incluyen en Tissue-tek (Sakura Finetek®) y después se colocan en hielo seco hasta que se congelen, la resina que se vuelve sólida a -20 °C y que permite hacer cortes en el microtomo crióstato (Leica® CM 1850).
- Los cortes se adhieren a un cubreobjetos (Corning®) cubierto con Poly-L-Lisina y se secan en una campana de vacío durante media hora. Pueden guardarse a -20°C.
- Para proseguir con el experimento, los cortes se permeabilizan bañándolos en acetona durante 20 minutos.
- Se dejan en solución de bloqueo durante 2 horas a temperatura ambiente.
- Posteriormente se agrega el anticuerpo primario diluido 1/500 vol./vol. en la misma solución de bloqueo, donde se incuba a 4 °C durante toda la noche. Para el control negativo se omite la incubación con anticuerpo primario.
- Antes de agregar el anticuerpo secundario se lavan tres veces con PBS para quitar el exceso de anticuerpo primario.
- El anticuerpo secundario está acoplado al fluoróforo alexa 488. Se agrega diluido 1/500 vol./vol. en solución de bloqueo.
- Los cortes se montan con glicerol para su observación en el microscopio confocal.

### Soluciones Inmunofluorescencia en cortes de ovario

- MEMFA: MOPS (USB®) 2.08 g, EGTA 400 µL de Stock 0.5M, MgSO<sub>4</sub> (Sigma) 24 mg, Formalina (Sigma®) 10 mL stock 37% en 100 mL de H<sub>2</sub>O.
- PBS stock 20x: Disolvente NaCl (J.T. Baker®) 80 g, KCl (USB®) 2 g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> heptahidratado (J.T. Baker®) 26.8 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (J.T. Baker®) 2.4 g, en 800 mL de H<sub>2</sub>O; ajustar el pH a 7.4 con HCl 1M; ajustar el volumen a 1L de H<sub>2</sub>O.
- Soluciones de bloqueo:
  - Solución de albumina de suero bovino, fracción V (USBiológica®) 3 %, suero de cabra en PBS 1x.
  - Solución de albumina de suero bovino, fracción V (USBiologica®) 1 %, Tritón X - 100 (Sigma®) al 0.5 % y gelatina de pescado al 0.45 % (Sigma®) en PBS 1X.
- 0.05 % de Poli-L-Lisina para cubrir portaobjetos lavados en ácido nítrico y enjuagados 3 veces en agua destilada estéril y después en solución de Poli-L-Lisina y dejar reposar toda una noche a temperatura ambiente.

## Clonación de fragmentos de RNAm

### Extracción de RNA

Para la extracción de RNA se utilizó del reactivo TRIzol (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante.

- El ovario de pez cebra se homogeniza dentro de un tubo de ensayo de 1.5 mL y se le agrega 1 mL de TRIzol (Invitrogen).
- El ovario se pipetea con una jeringa hasta disolverlo. El homogeneizado se centrifuga a 12,000 x g por 10 minutos a 4 °C para deshacerse del material insoluble. Esto da como resultado un sobrenadante nítido que contiene al RNA y que se transfiere a un tubo nuevo.
- Para permitir la disociación de complejos ribonucleoproteicos se incuba el homogeneizado por 5 minutos de 15 a 30 °C.
- Se añaden 0.2 ml de cloroformo por 1 mL de TRIzol (Invitrogen).
- El tubo se agita vigorosamente con la mano por 15 segundos y se incuba a 25 °C de 2 a 3 minutos.
- Se centrifuga la muestra a 12,000 x g por 15 minutos a 4 °C.
- Luego de la centrifugación, la mezcla se separa en una fase orgánica de color rosa y una fase acuosa incolora en la parte superior, donde reside el RNA.
- La fase acuosa se transfiere a un nuevo tubo donde se precipitará el RNA, para conseguirlo se mezcla con 0.5 mL de isopropanol por cada mL de TRIzol usado en la homogenización inicial.
- Se incuban las muestras de 25 °C por 10 minutos y se centrifugan a 12,000 x g por 10 minutos a 4 °C.
- Se retira el sobrenadante y el material sedimentado se lava con etanol al 75 %, mezclándolo con ayuda del vórtex y centrifugando a no más de 7,500 x g por 5 minutos a 4 °C.
- Para resuspender el RNA se deja secar brevemente el etanol evitando la pérdida completa de humedad pues esto disminuye la solubilidad del RNA. El RNA se solubiliza con agua libre de RNAsas con ayuda de un poco de pipeteo y una incubación a 60 °C por 10 minutos.

### Síntesis de DNA complementario

Para la síntesis de DNA complementario (cDNA) se utilizó el kit de la transcriptasa reversa M-MLV de Invitrogen.

- 1 µL oligo dT (Invitrogen) (500µg/mL)
- 50-250 ng de random primers (Invitrogen®)
- 2 µg de RNA total
- 1 µL de dNTP mix 10 nM

Aforar a 12 µL con agua estéril y calentar la mezcla por 5 minutos a 65 °C y enfriarlas en hielo rápidamente.

Agregar:

- 4 µL de 5X First-Strand buffer (Invitrogen®)
- 2 µL 0.1M DTT
- 0.3 µL RNaseOUT inhibidor de ribonucleasa recombinante (Invitrogen®)
- 1 µL de M-MLV transcriptasa reversa (Invitrogen®) e incubar a 25 °C.

Incubar a 37 °C por 3hrs.

## PCR

Para una reacción de PCR se coloca en un tubo lo siguiente:

- Buffer 10x: 1.5 µL
- Mg Cl2: 0.75 µL
- dNTP's: 0.25 µL
- Primer antisentido y Primer sentido (ver Tabla): 0.1 µL de cada uno
- H2O: 10.5 µL
- Taq polimerasa (Invitrogen®): 0.1µL
- cDNA: 1.5 µL

El programa de PCR utilizado es el siguiente:

- 95 °C 7 minutos
- 40 ciclos: 95 °C 30s, Tm °C (ver Tabla 4.2) 30s, 72 °C 30s
- 72 °C 10 minutos
- 12 °C 10 minutos

Gen	Forward	Reverse	Tm (°C)	Producto (pb)
<i>fmnl1a</i>	CAGATCCAGGCCTATTTGGA	TCCAGGCTTCCAGAGACTGT	55	440
<i>fmnl1b</i>	AGAGCGTCCTCATCCTCAA	CACGAGTGCTGCTTTATCCA	60	305
<i>fmnl2a</i>	CCAGGACTAAGGCTCTGGTG	CAGAGCTCCGACATCAAACA	62	365
<i>fmnl2b</i>	CGAGATCATCCTTGCTGCT	TTTTGGTCTCTGCGTCTCT	60.3	326
<i>fmnl3</i>	CCCCAAAAGTACCCTAAT	GAATGGACGTCAATGGAAGG	53	451
<i>daam1a</i>	CGGTTCAAGCACAATGCACA	ACTCCCGCCAACAAGGAAA	53	515
<i>daam1b</i>	AAACACACTGGCCCAGAAAC	GGGCTGCGGGTTGCTTATTT	62	498
<i>daam2</i>	GCTGAAAAGCAGGCTCTGGC	GGCTTCCCTGTTCTTGTCAGT	53	509
<i>rock1</i>	ACCCCAAAAATGTCCCAGGAA	GTGTCGTCCGAACAGAACAG	60.5	350
<i>rock2a</i>	CACCGTCTCTCCTAGAGT	TGGTGTGTTGCTCTACCGTC	60.5	442
<i>rock2b</i>	CGGCTGCTCAAGAGGGTTC	CTGTTCTTGCTGGAGGGCTG	60.5	200
<i>dazl</i>	GCGGTCGATTATGTGCATC	ATCAATACCGCCGACGAA	62	493
<i>nanos</i>	ACAACGGCGAGACTGAGG	CCTGTAGCGAGCTGCTG	60	452
<i>vasa</i>	GCGTGTCCACCTGCTACC	TTCATCACGGGAGCCACT	64	402

Tabla 2. Listado de oligonucleótidos con su respectiva Tm.

## Clonación del producto de PCR en un plásmido

Los productos de PCR se insertaron en el plásmido pCR4-TOPO (Invitrogen), siguiendo las instrucciones del proveedor. Este plásmido contiene en cada lado sitios de restricción únicos para varias enzimas y dos promotores opuestos lo cual permite linearizar el plásmido y transcribir la secuencia insertada en ambas direcciones.

Preparación de una reacción de ligación:

- Producto fresco de PCR 4 µL
- 10X Buffer de ligación 1 µL

- Vector pCRII-TOPO (Invitrogen®) 1 µL

### Preparación de células competentes y transformación

Preparación de células de *Escherichia coli* DH5-α (Inoue et al., 1990):

- Inocular una colonia de una caja Petri fresca en 5 mL de medio LB en un matraz y dejar crecer durante toda la noche a 37 °C
- Inocular 200 mL de SOB a un matraz con 1 mL del precultivo.
- Crecer las células con agitación vigorosa (200 - 250 rpm) a 18 °C hasta una OD<sub>600</sub> de 0.6.
- Pre-enfriar el rotor a 4 °C. Colocar todos los materiales de plástico y de vidrio en el cuarto frío.
- Colocar en hielo el cultivo y tubos Falcon de 50 mL por 10 minutos.
- Transferir el cultivo a 4 tubos de 50 mL pre-enfriados y centrifugar a 3000 rpm por 10 minutos a 4 °C.

Todas las manipulaciones deben llevarse a cabo en el cuarto frío

- Retirar el sobrenadante y resuspender con delicadeza el sedimento en buffer de transformación frío en un volumen de 1/3 del volumen original. Incubar por 10 minutos a 4 °C.
- Centrifugar las células a 3000 rpm y resuspenderlas con delicadeza en amortiguador de transformación frío en 1/12 del volumen original. Añadir DMSO a una concentración final de 7 % e incubar en hielo por 10 minutos.
- Dividir en alícuotas de 200 µL en tubos Eppendorf enfriados y congelar inmediatamente en nitrógeno líquido para su almacenamiento a -70 °C.

Transformación:

- Incubar en hielo por 30 minutos 50 µL de células competentes junto con 4 µL de reacción de ligación o plásmido.
- Calentar las células a 42 °C por 45 s sin agitar y transferir inmediatamente de vuelta al hielo.
- Agregar 200 µL de medio LB a temperatura ambiente. Agitar horizontalmente durante una hora a 225 rpm en un agitador horizontal a 37 °C.
- Platear 200 µL de células transformadas en cajas con medio LB sólido con ampicilina (100 µg/mL).
- Incubar las cajas a 37 °C toda la noche.
- Se seleccionaron varias colonias de cada caja y por medio de digestiones con EcoRI se comprobó la presencia de insertos del tamaño deseado. Algunas de estas colonias se seleccionaron para cultivarse de nuevo en medio LB con ampicilina, de este cultivo se extrajo el plásmido con un kit de Gene Jet MiniPrep Plasmid Extraction (Thermo Scientific) y se mandó a secuenciar. Las secuencias de DNA obtenidas correspondieron con los genes clonados y también nos permitieron ver la orientación en que insertaron.

### Digestión de plásmidos para sondas

El plásmido con el fragmento para cada sonda se digiere con 2 enzimas por separado una para la sonda antisentido y otra enzima para la sonda sentido.

Gen	Sentido		Antisentido	
	Enzima Digestión	Enzima Transcripción	Enzima Digestión	Enzima Transcripción
<i>fmnl1a</i>	<i>XhoI</i>	SP6	<i>BamHI</i>	T7
<i>fmnl1b</i>	<i>PstI</i>	T7	<i>NotI</i>	T3
<i>fmnl2a</i>	<i>XhoI</i>	SP6	<i>BamHI</i>	T7
<i>fmnl2b</i>	<i>XhoI</i>	SP6	<i>BamHI</i>	T7
<i>fmnl3</i>	<i>BamHI</i>	T7	<i>XhoI</i>	SP6
<i>daam1a</i>	<i>XhoI</i>	SP6	<i>BamHI</i>	T7
<i>daam1b</i>	<i>PstI</i>	T7	<i>NotI</i>	T3
<i>daam2</i>	<i>XhoI</i>	SP6	<i>BamHI</i>	T7
<i>rock1</i>	<i>BamHI</i>	T7	<i>XhoI</i>	SP6
<i>rock2a</i>	<i>XhoI</i>	SP6	<i>BamHI</i>	T7
<i>rock2b</i>	<i>BamHI</i>	T7	<i>XhoI</i>	SP6
<i>dazl</i>	<i>XhoI</i>	SP6	<i>BamHI</i>	T7
<i>nanos</i>	<i>XhoI</i>	SP6	<i>BamHI</i>	T7
<i>vasa</i>	<i>XhoI</i>	SP6	<i>BamHI</i>	T7

Tabla 3. Estrategia para transcripción de sondas marcadas con DIG.

#### Purificación de digestiones con butanol

Se pusieron 500 µl de Butanol grado Biología Molecular a la reacción con la digestión. Se vortexeó. Se centrifugó a 13,000 rpm durante 7 minutos. o hasta que se vio el precipitado. Se quitó el sobrenadante y se limpió el pellet con 500 µl de Etanol absoluto. Se centrifugó 10 minutos. a 13,000 rpm y se removió el sobrenadante. Se lavó con 500 µl de Etanol al 70% y se centrifugó 10 minutos a 13,000 rpm. Se desechó el sobrenadante y se dejó evaporar. Finalmente, se resuspendió en 20 µl de H<sub>2</sub>O.

#### Síntesis de sondas de RNA marcadas con digoxigenina

Este protocolo está basado en la hoja técnica del reactivo “DIG RNA LabelingMix” (Roche®). En un tubo Eppendorf de 1.5 ml se colocaron:

- 2 µl Buffer de transcripción 10X
- 2 µl “DIG RNA Labelling mix” (Roche®)
- 1 µl RNaseOUT® (Invitrogen®)
- 500 ng DNA linealizado
- Polimerasa SP6 3µl/T7 1 µl
- H<sub>2</sub>O libre de RNAsas para 20 µl

Se incubó toda la noche a 37 °C. Después de esto deben purificarse las sondas sintetizadas, para ello se utilizó el equipo NucAway™ SpinColumns (Applied Biosystems | Ambion®), siguiendo el protocolo especificado por la compañía. Brevemente: Se llevó el gel seco al fondo de la columna. Se hidrató la columna con 650 µl de agua libre de RNAsas. Se tapó, se vortexeó y se quitaron todas las burbujas. Se hidrató a temperatura ambiente de 5 a 15 minutos. Se colocó la columna en un tubo de colecta de 2 ml. y se centrifugó a 7500 xg (3000 rpm centrifuga Eppendorff® 5415R) por 2 minutos. Se descartó el tubo de colecta y se aplicó inmediatamente la muestra (20-100 µl) al centro del gel hasta arriba de la

columna sin tocar la superficie del gel ni los lados de la columna con la pipeta. Se colocó la columna en un tubo de elución de 1.5 ml y este en el rotor, manteniendo la orientación de la primera centrifugación.

Se centrifugó a 750 xg por 2 minutos. La muestra ahora se encuentra purificada en el tubo de elución.

### Transferencia de gel y comprobación de sonda marcada

Se coloca el gel con los siguientes aditamentos:

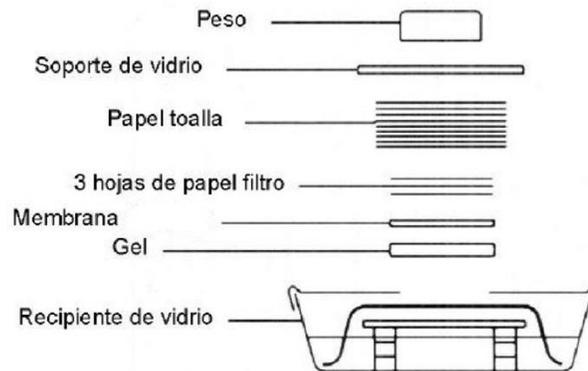


Figura 19. Diagrama del sistema de transferencia Southern blot (Modificado de Yañez, 2015).

Se dejó transfiriendo toda la noche usando SSC 20X. Se fijó por “crosslinking” (se utilizó Stratalinker modelo 2400 en modo “Autocrosslink” fijando cada lado de la membrana). Se colocó la membrana en DIG1 por 15 minutos en agitación. Después, se colocó en DIG 2 por 30 minutos en agitación (Se calentó DIG1 antes de poner el “Blocking Reagent”). Se colocó el anticuerpo anti-DIG por 30 minutos en una dilución 1:5000. Se lavó 2 veces por 10 minutos en DIG1. Se colocó DIG3 por 5 minutos. Finalmente se reveló la membrana con BCIP/NBT en DIG3 cubriendo de la luz.

Soluciones:

- SSC 20X: 175.3 gr de NaCl y 88.2 gr de ácido cítrico, sal disódica disuelto en 1 litro de agua
- DIG1: 100mM Tris pH 7.5, 150mM NaCl
- DIG 2: DIG1 al 0.5% de “Blocking Reagent” (Roche®)
- DIG3: 100mM de Tris pH 9.5, 100mM de NaCl, 50mM de MgCl<sub>2</sub>

### Hibridación *in situ* de ovocitos

Protocolo modificado (Thisse and Thisse, 2007).

Se colecta el ovario y se deja en paraformaldehído al 4 % durante toda una noche. Al día siguiente se le quita el PFA lavando 3 veces con PBST, 10 minutos cada lavado. Los ovarios se deshidratan lavando con diluciones sucesivas de metanol PBST: 10 minutos metanol 25% (vol./vol.); 10 minutos metanol 50 % (vol./vol.); 10 minutos metanol 75 % (vol./vol.). Se lavan 4 veces, 5 minutos por lavado en metanol al 100 %. Estos ovarios se pueden mantener en metano a -20 °C.

Se rehidratan los embriones cambiando la solución en diluciones sucesivas de metanol en PBST: 5min metanol 75 % (vol./vol.); 5 minutos metanol 50 % (vol./vol.); 5 minutos metanol 25 % (vol./vol.). Se lava 4 veces, 5 minutos por lavado en PBST al 100%. Se permeabilizan los ovarios por digestión con proteinasa K (10 µg/mL) a temperatura ambiente durante 30 segundos. Se detiene la digestión de

proteinas K incubando los ovarios por 20 minutos en paraformaldehído al 4%. Se lavaron 4 veces, 5 minutos por lavado, en PBST para remover el paraformaldehído. Se prehibridaron los ovarios con 1 ml de la solución MH por 5 horas en un horno a 70 °C. Se quitó la solución MH y se agregaron 500 µl de solución MH que contenía 100-200 ng de sonda de RNA marcada con DIG. Se hibridizan toda la noche a 70°C.

Las soluciones MH, SSC 2X y SSC 0.2X, se precalentaron a 70°C antes de usarse como se describe a continuación. Se reemplazó la solución MH con sonda por 1ml de solución MH sin sonda, sin RNAt y sin heparina, se dejó a 70°C por 10 minutos. Se hicieron cambios graduales de MH a SSC 2X a través de una serie de lavados de 10 minutos a 70°C en MH diluido con SSC 2X. Se lavó una vez en cada uno: 75 % MH, 50 % MH, 25 % MH y SSC 2X 100 %. Se hicieron los lavados a 70 °C. (Este MH no contenía RNAt ni heparina). Se lavó 2 veces, 30 minutos por lavado, en SSC 0.2X a 70 °C. Se reemplazó progresivamente el SSC 0.2X con PBST a través de una serie de lavados de 10 minutos a temperatura ambiente en SSC 0.2X diluido con PBST en 1 ml de las siguientes soluciones: 75 % SSC 0.2X; 50 % SSC 0.2X, 25 % SSC 0.2X y PBST 100 %. Se incubaron los embriones de 3 a 4 horas en buffer de bloqueo. Después, se incubaron los ovarios en 500 µl de anticuerpo anti-DIG diluido 1/10,000 en buffer de bloqueo durante toda la noche a 4°C con agitación suave.

Se desechó la solución de anticuerpo y se lavaron los ovarios brevemente en PBST. Posteriormente, se lavaron 6 veces, 15 minutos por lavado, en PBST a temperatura ambiente con agitación suave. En seguida se lavaron dos veces, 5 minutos por lavado, con la solución AP-. Se incubaron los ovarios a temperatura ambiente lavando 3 veces, 5 minutos por lavado, en la solución AP+ con agitación suave. Se reemplazó la solución AP+ con 500 µl de solución de tinción recién preparada y se cubrieron los ovarios de la luz. Se monitoreó la reacción de color periódicamente (se expuso a los ovarios el menor tiempo posible a la luz) y, una vez que se alcanzó la intensidad de tinción deseada, se detuvo la reacción descartando en lo posible la solución de tinción y lavando 3 veces, 15 minutos por lavado, en solución stop con agitación suave. Los ovarios se incubaron 5 minutos en PBST pH 3.0 para prevenir la reacción fotosensible del vitelo. Los ovarios teñidos pueden guardarse en la oscuridad en solución stop a 4 °C por varios meses.

Soluciones:

Todas las soluciones se hacen con agua tratada con DEPC al 0.1 % y esterilizadas por autoclave.

- Paraformaldehído 4 %: Se preparó en campana de flujo. Se calentaron 450ml de H<sub>2</sub>O a 60 °C. Se agregaron 20 gramos de paraformaldehído (Sigma®) y se mantuvo en agitación y a 60 °C. Se adicionaron 5 gotas de NaOH 2 N (1 gota por cada 100 ml). La solución se volvió clara en un par de minutos (hay partículas finas que no desaparecen). No se debe calentar a más de 70 °C porque el paraformaldehído se degrada. Se retiró y se adicionaron 50 ml de PBS 10X. Posteriormente, se ajustó el pH a 7.2 utilizando HCl cuando fue necesario. Finalmente, se filtró y se almacenó a -20 °C.
- PBS 10X (pH 5.5): 10.8 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 65 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 80 g. NaCl, 2 g KCl, disueltos en 1 litro de agua.
- PBST: PBS 1X, 0.1% Tween® 20 (vol./vol.) (Sigma®)
- MH (Mezcla de hibridación): 50% Formamida (Invitrogen®), SSC 5X, 0.1 % Tween® 20, 50 µg/ml heparina (Sigma®), 50 µg/ml de RNAt (Sigma®) libre de ribonucleasas, 10mM ácido cítrico pH 6.0.

- SSC 20X: 175.3 g. NaCl y 88.2 g. de ácido cítrico, sal trisódica disueltos en 1 litro de agua.
- Buffer de bloqueo: PBST 1X, 2 % suero de oveja (v/v) (Rockland®), 2 mg/ml BSA (Roche®).
- AP-: 100 mM Tris HCl pH 9.5, 100 mM NaCl, 0.1 % Tween® 20.
- AP+: 50 mM MgCl<sub>2</sub> disuelto en AP-.
- Solución de tinción: 225 µl NBT (Roche®), 175 µl BCIP (Roche®), 50 ml de AP+.
- Solución stop PBS 1X, 1 mM EDTA, 0.1 % Tween® 20.
- Proteínasa K: Solución para almacenar, 10 mg (Roche®) /ml en PBST y guardar a -20°C en alícuotas de 100 ml.

## Resultados

### Señal de localización vegetal de RNAm

En *Xenopus* se había llevado a cabo un análisis bioinformático comparativo a nivel secuencia primaria de dos RNAs mensajeros que comparten espacio temporalmente su localización vegetal durante el desarrollo del ovocito, situándolos al final de la ovogénesis en el córtex vegetal. Estos son Vg1 y VegT y se encontró que ambos transcritos tenían una región rica en motivos llamados E2 (UUCAC, UUGCAC, AUCAC, UUCAU, UCCAC, UUCAG) y MV1(UUUCU, CUUCU, UCUCU, UUUUCC, UCCUCC, CUUUU) en su respectivo 3'UTR. Se corroboró experimentalmente que estas regiones ricas en motivos E2 MV1 eran el zipcode de estos transcritos para dirigir su localización al polo vegetal del ovocito, sugiriendo que comparten la misma maquinaria de reconocimiento de estas señales de localización y podría encontrarse presente en otros transcritos también (Figura 20) (Bubunenko *et al.*, 2002).

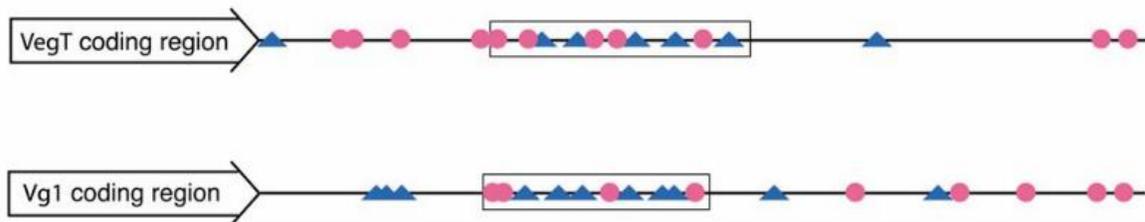


Figura 20. Clústers de motivos E2 MV1 regulan la localización del RNAm de VegT y Vg1. Representación esquemática de los clústers (cuadrado negro) de motivos E2 (triángulos en azul) y MV1(círculos rosas) en el 3'UTR de VegT y Vg1 el cual es suficiente para dirigir su localización hacia el polo vegetal del ovocito. Imagen modificada de (Bubunenko *et al.*, 2002).

Para determinar si los RNAs del plasma germinal del pez cebra conservaban las secuencias consenso E2 MV1 de *Xenopus* que se encontraban redundantes en clústers en las regiones 3'UTR de los RNAm (Bubunenko *et al.*, 2002), nos propusimos identificar estos mismos motivos que podrían ser secuencias señal determinantes para la localización de transcritos de genes del plasma germinal en la parte vegetal del ovocito de pez cebra.

Como primer paso, recopilamos mediante un algoritmo en lenguaje Python la localización de los motivos E2 MV1 (Anexo programa) en los RNAs mensajeros de VegT y Vg1 de *Xenopus*, determinando que para considerar un clúster de estos motivos con misma similitud que los transcritos *vegT* y *vg1* de *Xenopus*, deberían considerarse clústers mayores a 9 motivos separados unos de otros por no más de 80 nucleótidos.

Se creó una base de secuencias con los RNAm de pez cebra conteniendo genes documentados del plasma germinal, del ovocito y genes de la vía de RhoA, incluidos sus efectores Rock y forminas (Tabla Suplementaria 2). Como controles se seleccionaron RNAs que se sabe que no se localizan en el polo animal. De los genes de la vía de RhoA ya contábamos con evidencia en el laboratorio de su localización en el plasma germinal durante la ovogénesis por hibridación *in situ* y mediante la detección de las proteínas por inmunodetección, así como su posible participación en la regulación de la organización del plasma germinal en cultivo de ovocitos. En pez cebra existen solo 3 homólogos de Rock que son *rock1*, *rock2a* y *rock2b* también se incluyeron los RNAm de las familias de forminas, *dia*, *fmnl* y *daam*.

En esta base de datos se analizó cada secuencia buscando los motivos E2 MV1 e identificando clústers con las características previamente descritas de 9 motivos separados unos de otros por no más de 80 nucleótidos. Como resultado se muestran gráficos a escala tomando en cuenta el tamaño de los transcritos mostrado en una línea continua azul y con puntos de colores la localización de los motivos

E2 MV1. En puntos color amarillo se encuentran localizados los motivos E2 MV1 en el 5'UTR, en color verde si se ubican en la región codificante y en color rojo si se ubican en la región 3'UTR. Particularmente si dentro de estos transcritos los motivos E2 MV1 forman un clúster como los reportados para los transcritos *vegT* y *vg1* de *Xenopus* adquieren un sombreado negro detrás de estos clústers.

Como primer hallazgo encontramos que los transcritos que se conocen con localización en el polo vegetal (*brul*, *dazl*, *dnd*, *grip2a*, *macf1a*, *magoh*) tenían al menos un clúster de los motivos E2 MV1 que se encuentran resaltados con sombreado negro en alguna parte del transcrito sin restringirse solo a la región 3'UTR (Figura 21). De manera interesante, *wnt8* un gen importante para la especificación del eje dorsal del cual se sabe que se localiza en el polo vegetal (Campbell *et al.*, 2015) también contenía un clúster, por lo cual posiblemente los RNAs que especifican el lado dorsal requieran primeramente el anclaje al polo vegetal del ovocito para después rotar al futuro lado dorsal del embrión una vez que se lleva a cabo la fertilización. Para el transcrito de la proteína *Rbpms2b* que se conoce como componente del ensamblaje del cuerpo de Balbiani no se detectó ningún clúster de los motivos E2 MV1. Resulta interesante que el transcrito de *vasa* no contienen este tipo de clúster de motivos E2 MV1, a pesar de ser componente del plasma germinal, se sabe que no se localizan en la región vegetal (Kosaka *et al.*, 2007) lo cual nos permite tener confiabilidad de que los sitios escogidos podrían condicionar de alguna forma la localización en el polo vegetal del ovocito (Figura 21).

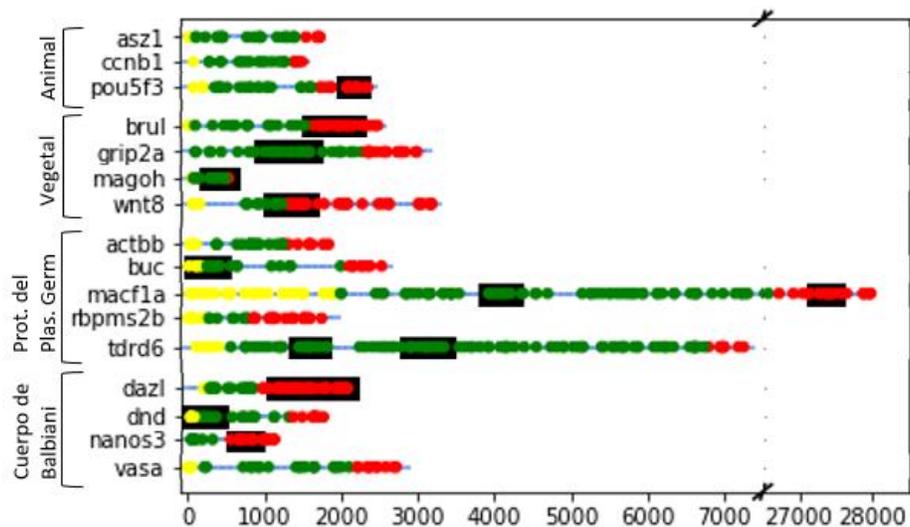


Figura 21. Presencia de clústers de motivos E2 MV1 en RNAm de pez cebra podría correlacionar con su localización en el polo vegetal. Esquematización de los motivos E2 MV1 en transcritos de *D. rerio* del polo Animal (*asz1*, *ccnb1*, *pou5f3*), transcritos del polo Vegetal (*brul*, *grip2a*, *magoh*, *wnt8*), transcritos de proteínas del plasma germinal (*actbb*, *buc*, *macf1a*, *rbpms2b*, *tdrd6*) y transcritos del cuerpo de Balbiani (*dazl*, *dnd*, *nanos3*, *vasa*) resaltando su localización en el 5'UTR en círculos color amarillo, en círculos color verde en la región codificante y en rojo en la región 3'UTR. Los clústers de los motivos E2 MV1 tienen una sombra en color negro.

Para los transcritos de la vía de RhoA se encontró que *rhoac*, *rhoca*, *rhocb*, *rock1*, *rock2a*, *daam1a*, *daam1b*, *diaph2* y *fmnl2b* poseían un clúster de los sitios E2 MV1 en la región 3'UTR, mientras que otros transcritos como *daam2*, *fmnl1a*, *fmnl1b*, *fmnl2a* tenían estos clústers en la región codificante y aún más interesante *fmnl1a* y *rock2b* contenían un clúster de estos motivos en la región 5'UTR del transcrito, de los cuales se conocen muy pocos elementos Cis situados en esta región del transcrito (Figura 22).

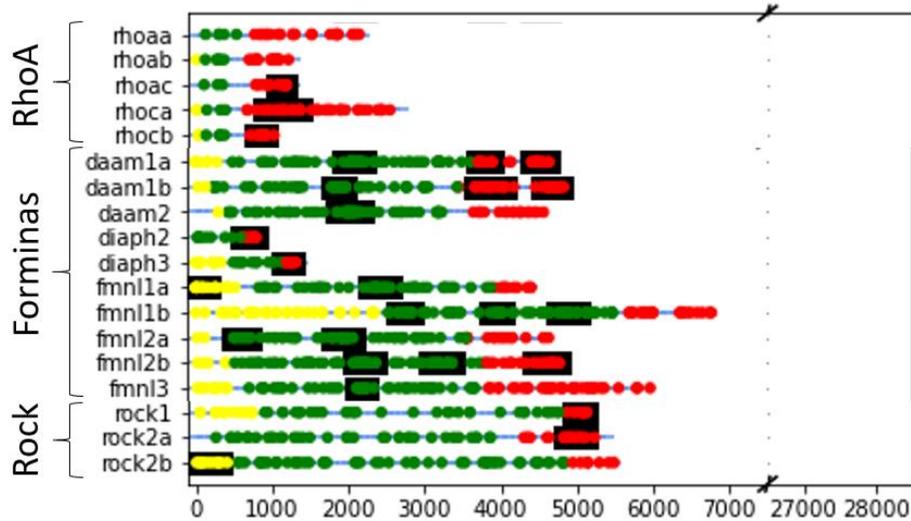


Figura 22. RNAm del a vía de Rho en pez cebra presentan clústers de motivos E2 MV1 que podrían dirigir su localización al polo vegetal. Esquematación de los motivos E2 MV1 en transcritos de *D. rerio* de la vía de RhoA y sus proteínas efectoras resaltando su localización en el 5'UTR en círculos color amarillo, en círculos color verde en la región codificante y en rojo en la región 3'UTR. Los clústers de los motivos E2 MV1 tienen una sombra en color negro.

### Señal de localización de Cuerpo de Balbiani en RNAm

Para determinar si existía un elemento Cis que permitiera la localización en los RNAm en el Cuerpo de Balbiani primeramente se hizo un análisis comparativo de secuencia (blastn) entre los 3'UTR de los transcritos de *dazl*, *nanos3*, *vasa* y *dnd* debido a que la mayoría de los elementos Cis para la localización de los RNAm se encuentra en esta parte del transcrito y entre ellos deberían compartir esta señal de localización que los ubique en este microdominio celular. Las secuencias conservadas se muestran en la Tabla 4.

Gen 1	Gen 2	Sec. Gen 1	Sec. Gen 2
3'UTR <i>dazl</i>	3'UTR <i>vasa</i>	TATTTATATTTTATTTGT	TATTTTTATTTTATTTGT
3'UTR <i>dazl</i>	3'UTR <i>nanos3</i>	GTTTGATTTTG	GTTTGATTTTG
3'UTR <i>dnd</i>	3'UTR <i>nanos3</i>	AATGTCAGATT	AATGTCAGATT
3'UTR <i>nanos3</i>	3'UTR <i>vasa</i>	TGTTGTATTTA	TGTTGTATTTA
3'UTR <i>dazl</i>	3'UTR <i>nanos3</i>	TGTGTTTTTCAC	TGTGTTTTTCAC

Tabla 4. Análisis blastn de los 3'UTR de los transcritos del Cuerpo de Balbiani.

Después, siguiendo la misma lógica para la determinación de los clústers de los motivos E2 MV1 en el polo vegetal de *Xenopus* (Bubunenko *et al.*, 2002) tendríamos que fragmentar nuestras secuencias conservadas en k-meros de 5 a 6 nucleótidos y en base a su distribución y abundancia en las distintas partes del transcrito, elegir aquellos k-meros que se encuentren más abundantes en el 3'UTR y que además formen clústers. Sin embargo, recientemente se desarrolló una base de datos llamada oRNAm (Benoit Bouvrette *et al.*, 2020), la cual predice sitios de unión de ribonucleoproteínas descritos en 5 organismos modelos. Tomando estos datos en cuenta y el tamaño de los sitios para los cuales ellos determinan un consenso de un k-mero de 7 nucleótidos, nosotros decidimos fragmentar nuestras secuencias conservadas y analizar su distribución para poder elegir secuencias que podrían ser señales de localización del Cuerpo de Balbiani. De los k-meros resultantes de la fragmentación de las secuencias conservadas solamente 4 k-meros se localizan en los 3'UTR de los RNAm del Cuerpo de Balbiani (y no en algún otro RNAm del polo vegetal, ni del polo animal) GUAUUUA, GUCAGAU,

UUGAUUU, y UUUGAUU y solo 2 de ellos GUAUUUA y UUGAUUU están descritos en la base de datos de oRNment a los cuales se le podría unir una proteína específica RBMS2 para el sitio GUAUUUA y ELAVL1 para el sitio UUGAUUU que posiblemente reconocería también al otro sitio UUUGAUU ya que la secuencia es prácticamente idéntica.

Se hizo el análisis de la localización de estos 3 k-meros (GUAUUUA, UUGAUUU y UUUGAUU) con nuestra base de datos de la misma forma como fueron representados esquemáticamente la ubicación de los motivos E2 MV1 (Tabla Suplementaria 3). Se verificó la localización de estos sitios para los transcritos de *D. rerio* que se localizan en el cuerpo de Balbiani *dazl*, *dnd*, *nanos3* y *vasa* lo que llamaríamos señales de localización de Cuerpo de Balbiani, presentes en el 3'UTR como ya era de esperarse. También pudimos encontrar señales de localización en casi todos los transcritos de las proteínas del plasma germinal que teníamos en la base de datos *buc*, *macf1a* y *tdrd6* exceptuando a *rbpms2b* del cual existe evidencia que su RNAm tiene también localización en el Cuerpo de Balbiani (Figura 23).

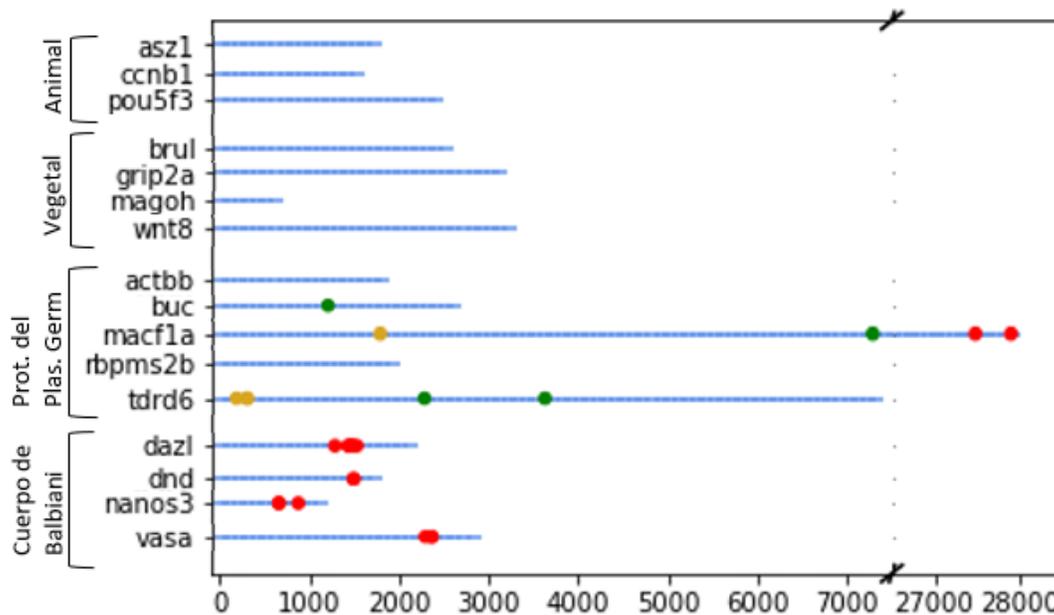


Figura 23. RNAm del Cuerpo de Balbiani y RNAm de proteínas del plasma germinal comparten la posible señal de localización del cuerpo de Balbiani. Esquematización de las señales de localización de Cuerpo de Balbiani en transcritos de *D. rerio* del polo Animal (*asz1*, *ccnb1*, *cpeb1b*, *pou5f3*), Vegetal (*brul*, *grimp2a*, *magoh*, *wnt8*), Proteínas del plasma germinal (*actbb*, *buc*, *macf1a*, *rbpms2b*, *tdrd6*) y transcritos del cuerpo de Balbiani (*dazl*, *dnd*, *nanos3*, *vasa*) resaltando su localización en el 5'UTR en círculos color amarillo, en círculos color verde en la región codificante y en rojo en la región 3'UTR.

En los transcritos de *D. rerio* para la vía de RhoA los RNAm que tienen señales de localización del Cuerpo de Balbiani en el 3'UTR son *daam1a*, *fmnl2a*, *rhoaa*, *rhoab* y *rock2a*. Interesantemente *fmnl1b*, *fmnl2b* tienen esta señal en la región codificante y *daam2* y *rock2b* los poseen en el 5'UTR (Figura 24). Haría falta demostrar mediante hibridaciones *in situ* que estas predicciones sean correctas.

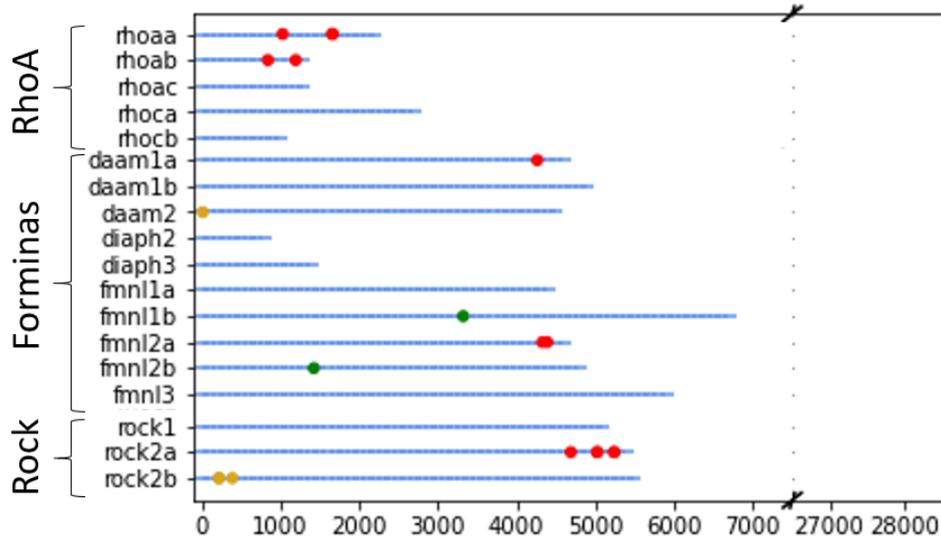


Figura 24. RNAm de la vía de Rho podrían localizarse en el cuerpo de Balbiani por la presencia de posibles señales de localización. Esquematización de las señales de localización de Cuerpo de Balbiani en transcritos de *D. rerio* de la vía de RhoA resaltando su localización en el 5'UTR en círculos color amarillo, en círculos color verde en la región codificante y en rojo en la región 3'UTR.

### Expresión de proteínas efectoras de RhoA durante la ovogénesis de pez cebra

Experimentos realizados previamente en el laboratorio mostraron que todas las forminas se expresan en el extracto de RNA total de ovario y mediante hibridaciones *in situ* realizadas por Fernando Ferrusca durante su estancia profesional bajo la dirección de la Dra. Denhí Schnabel en el Instituto de Biotecnología. Se pudo observar la expresión de algunas de estas forminas en estadios particulares con regiones subcelulares donde pareciera ser una mayor concentración del transcrito (Figura 25). Sin embargo, no sabemos si no se observó en la mayoría de los casos tinción en los ovocitos más maduros por un problema técnico de la hibridación. Dando lo anterior se pretende abordar el tiempo de tinción, así como cortes de estos ovocitos para dilucidar mejor el patrón de expresión.

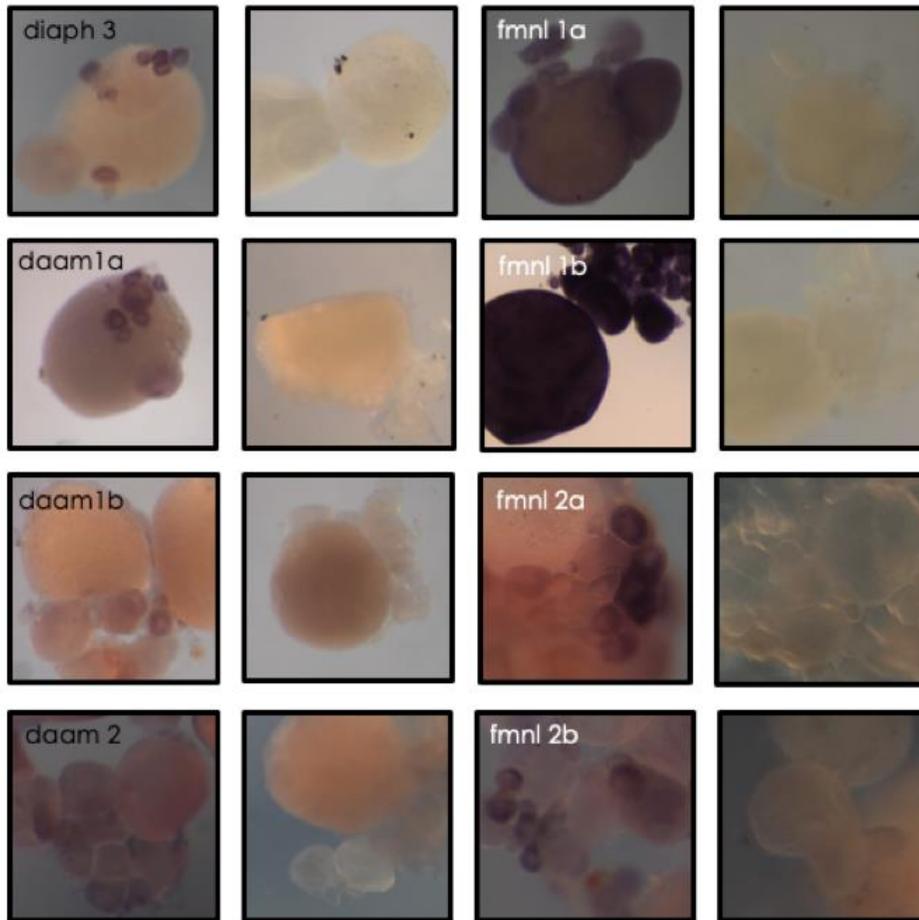


Figura 25. La familia de las forminas se expresa de manera diferencial durante la ovogénesis. Hibridación *in situ* de los genes de las forminas en fragmentos de ovario de pez cebra donde parecieran tener una expresión particular de estadios más tempranos donde inclusive para algunos genes como *diap3* y *fmnl2b* pareciera tener una distribución asimétrica de la señal para estos transcritos utilizando la sonda antisentido a la izquierda de cada panel. Control de sonda sentido del lado derecho de cada panel. (Realizado por Fernando Ferrusca)

Para poder dilucidar la expresión temporal de las forminas y de los genes Rock durante los 4 estadios más evidentes morfológicamente de la ovogénesis se llevó a cabo la técnica de RT-PCR para cada uno de los genes con cDNA de cada estadio. Primeramente, se extrajo el ovario del pez cebra hembra, se disgregó manualmente, se clasificaron los ovocitos por su tamaño (Figura 26) y después a estos grupos por estadio se les extrajo RNA total para sintetizar cDNA y posteriormente realizar la técnica de RT-PCR para comprobar la presencia de los transcritos. Es importante resaltar que, para la mayoría de los genes, el diseño del par de oligonucleótidos involucró la exclusión de amplificación de DNA genómico, debido a que los oligos se encontraban en exones diferentes (Figura Suplementaria 1 Tabla Suplementaria 4).



Figura 26. Estadios de la ovogénesis del pez cebra. Los distintos estadios se seleccionan a partir del tamaño para después ser procesados para extraerles y purificar RNA por el método de TRIzol-Fenol-Cloroformo, y poder llevar a cabo la síntesis de cDNA para evaluar la presencia de transcritos por la técnica de PCR.

Mediante la técnica de RT-PCR pudimos ver que los genes Rock están presentes durante toda la ovogénesis, y además por este primer ensayo nos sugiere que posiblemente *rock2a* disminuye su expresión en el estadio IV, pero haría falta repetir los ensayos (Figura 27). Para la familia de la forminas los resultados del RT-PCR exhiben una expresión diferencial durante la ovogénesis, en el estadio I no detectamos la presencia del transcrito de *fmnl1a*, *fmnl2a*, *fmnl3*, *daam1a* y *daam1b*, para el estadio II ya podemos detectar la presencia del transcrito de *fmnl1a*, *fmnl2a* y en los estadios III y IV ya podemos encontrar la presencia del transcrito de todas las forminas analizadas (Figura 27).

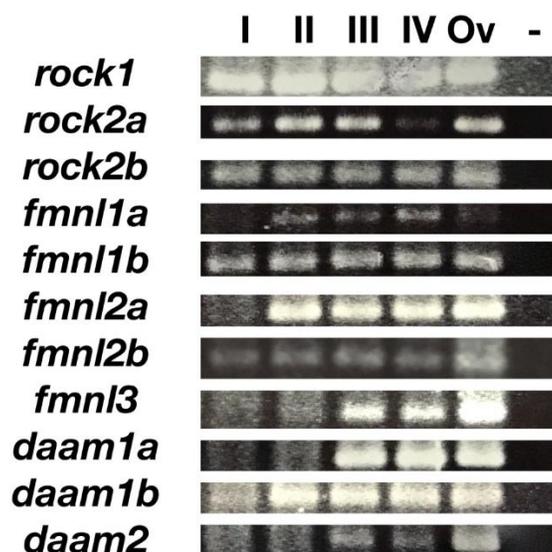


Figura 27. Efectores de la vía de RhoA se encuentra expresados de manera constitutiva durante la ovogénesis de pez cebra. Se extrajo RNA de ovocitos clasificados por estadio (I, II, III, IV) y ovario completo como control positivo (Ov), se realizó la técnica de retro-transcripción con 2 mg de RNA para obtener cDNA y se llevó a cabo la técnica de PCR punto final. Se observa la presencia de las dos familias de efectores de manera general durante toda la ovogénesis, pero en algunos genes como *fmnl1a*, *fmnl3*, *daam1a* y *daam2* parecen no estar presentes o podrían encontrarse mínimamente expresados. Control negativo sin cDNA.

Para dilucidar ahora la localización de los transcritos de los genes Rock realizamos hibridaciones *in situ* de *rock1*, *rock2a* y *rock2b* (Figura 28) en los primeros estadios de la ovogénesis. *rock1* aparece más

difusa mientras que *rock2a* parece tener una localización en el cuerpo de Balbiani y en gradiente; *rock2b* se observa en gradiente en los ovocitos de estadio II.

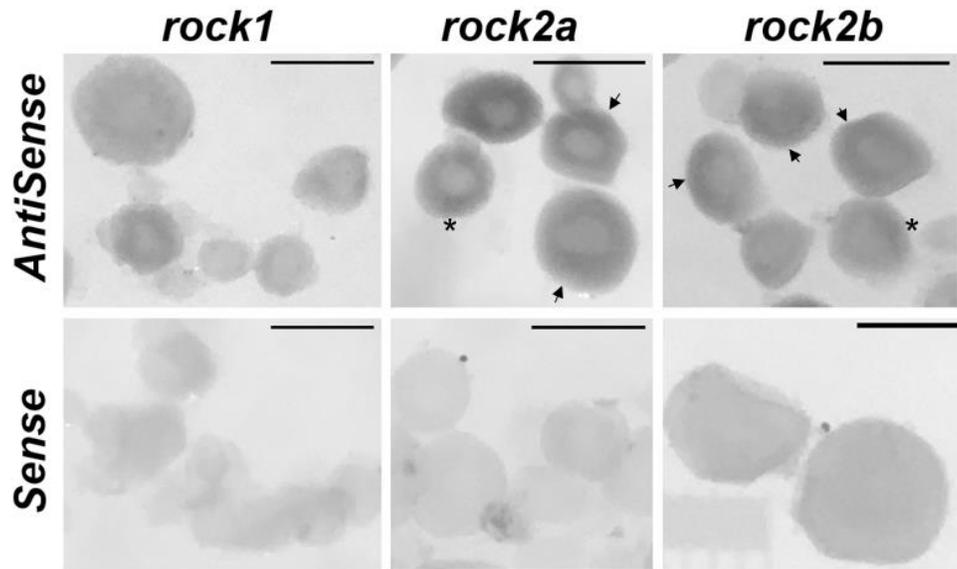


Figura 28. Patrón de expresión de los transcritos de los genes Rock revela posible distribución similar al plasma germinal. Hibridaciones *in situ* para los transcritos de *rock1*, *rock2a* y *rock2b*. Las sondas antisentido en los 3 paneles superiores. Los controles para las sondas sentido en los 3 paneles inferiores. En asterisco (\*) se muestra lo que posiblemente sea el Cuerpo de Balbiani y la flecha indica hacia que lado del ovocito es más intenso el gradiente. Barra de escala de 200µm.

### Inhibición de Rock en cultivo de ovocitos

Previamente se había demostrado que la inhibición de RhoA genera que se formen varios cuerpos de Balbiani en los ovocitos en cultivo parecido a lo observado con la sobreexpresión de Bucky ball (Riemer *et al.*, 2015). Para saber si la localización del plasma germinal estaba mediada por la vía RhoA/Rock se realizó el cultivo de ovocitos por 12 horas con el inhibidor de Rock H1152 en medio Cortland y después se fijaron. Posteriormente dicho cultivo fue sometido a la técnica de hibridación *in situ* con la sonda de *dazl*, con la cual pudimos ver en los ovocitos I-II más de un Cuerpo de Balbiani; similar a lo que observamos al inhibir la actividad de RhoA sugiriendo que esta vía está implicada en la formación de esta estructura subcelular (Figura 29).

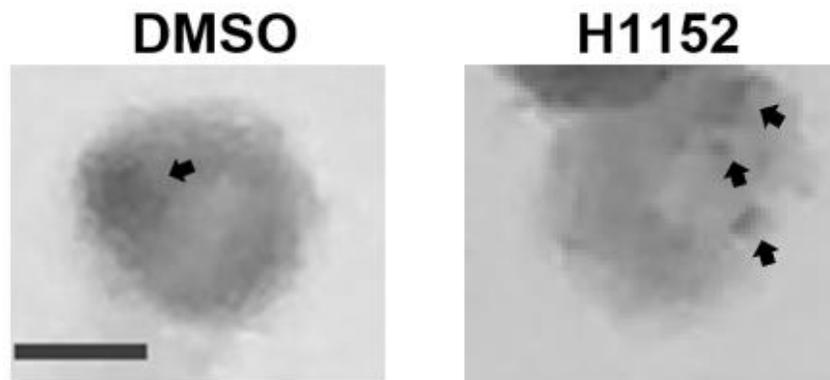


Figura 29. Inhibición de Rock deriva en la disgregación del plasma germinal en la ovogénesis de pez cebra. Hibridación *in situ* para el transcrito *dazl* en ovocitos en cultivo en medio Cortland durante 12 horas tratados con los inhibidores de Rock H-1152 muestra la dispersión del cuerpo de Balbiani con señal en diferentes partes del citoplasma del ovocito. Las flechas indican la localización de la señal de *dazl* en ovocitos en estadio 1a. Tratamiento control con DMSO. Barra de escala de 50µm.

## Discusión de resultados

Los resultados mostrados en este trabajo sugieren que posiblemente el mecanismo de localización de los RNAs del plasma germinal durante la ovogénesis podría estar regulado en 3 procesos: la expresión génica, el reconocimiento de los elementos Cis del RNA para localizarlos subcelularmente y el transporte de agregados macromoleculares de carácter granular. Dichos procesos podrían llevarse a cabo tanto de manera simultánea, como de manera redundante espacio-temporalmente.

En el inicio de la ovogénesis es muy característica la alta actividad transcripcional, y aunque sean cientos de genes los que se encuentren transcribiéndose tal parece que se expresan familias de genes simultáneamente como comúnmente ocurre (Williams and Dichtl, 2018). Nuestros resultados sugieren que es un evento orquestado con expresión de genes discretas, es decir, se encuentra bastante bien delimitado en que tiempo inicia y termina la expresión de un gen o familia de genes. Otro fenómeno interesante es que en ningún estadio de la ovogénesis podemos ver la ausencia de total de una familia de genes, donde a pesar de que en el primer estadio de la ovogénesis vemos solo algunos miembros por familia, para los estadios subsecuentes ya se encuentran presentes el resto de los miembros, sugiriendo un requerimiento mayor de la actividad de esta familia de genes (Figura 27). Por ejemplo, en la familia de los efectores Rock parecen tener expresión durante todos los estadios de la ovogénesis, pero para la familia de las forminas Fmnl encontramos ausente solo en el estadio 1 los genes *fmdl1a* y *fmdl2a*, pero a partir del estadio 2 se encuentran presentes los demás miembros de la familia. En el caso de la familia de las Daam los 3 genes parecieran estar ausentes tanto en el estadio I como en el estadio II a excepción de *daam1b*, coincidiendo la presencia de la familia completa hasta el estadio III. Lo que no sabemos es, si una vez que inició la expresión de un gen, esta transcripción fue reprimida en cierto momento de la ovogénesis y los RNAm permanecieron en estado de silenciamiento como suele ocurrir con ciertos transcritos asociados a complejos ribonucleoproteicos (Eulalio *et al.*, 2007) que podría ser nuestro caso si formaran parte del Cuerpo de Balbiani. También suele ocurrir este silenciamiento con los transcritos del plasma germinal (Dallaire, Frédérick and Simard, 2018), que por otro lado podrían tener una actividad transcripcional continua debido a la demanda de la función que desarrollaría la proteína para la que codifica ya, sea cinasa o nucleadoras de filamentos de actina. Para el caso de *rock2b*, *daam1a* y *daam2b* convendría diseñar otros oligos ya que el tamaño es idéntico o muy similar para la amplificación tanto por DNA genómico o cDNA, o agregar un tratamiento de DNAsa a la extracción de RNA.

Una vez que es exportado el transcrito a la parte citosólica de la célula, este puede difundir o ser reconocido por ribonucleoproteínas que, con ayuda del andamiaje en el citoesqueleto, podrían facilitar el transporte a regiones subcelulares distales para ser ahí un reservorio de transcritos, como para llevar a cabo una traducción localizada. Nosotros pudimos observar por la técnica de hibridación *in situ* para los genes de la vía de RhoA, es que tienen patrones de expresión muy similares a los patrones de expresión de los RNAm del plasma germinal (Kosaka *et al.*, 2007), inclusive algunos parecieran localizarse en el Cuerpo de Balbiani (Figura 13, Figura 28, Figura 25). Esta localización subcelular podría estar relacionada con elementos Cis dentro de los RNAs, marcas que nosotros proponemos se encontrarían conservadas en su secuencia lineal y requeridas para el reconocimiento y organización de estos transcritos tanto en el Cuerpo de Balbiani (sICB) (Figura 23, Figura 24) y/o anclaje en el polo vegetal del ovocito (sIV) (Figura 21, Figura 22). Así nosotros encontramos que los transcritos de la familia Rhoa *rhoaa* y *rhoab* tienen una posible sICB, e inversamente el resto de la familia tanto *rhoac*, *rhoca* y *rhoab* tienen un clúster de sIV lo que posiblemente indicaría papeles distintos para esta familia durante la ovogénesis. Para la familia de las Rock, *rock2a* y *rock2b* tienen posibles sICB, pero los tres

genes tienen clústers de sIV que se vuelve muy interesante, porque la presencia de esta cinasa para la que codifican podría participar en la estabilización del cuerpo de Balbiani, pero posiblemente se requiera de mayor actividad cinasa para migrar este microdominio por lo cual se podría reclutarse a *rock1*. En la familia de las forminas *daam1a*, *daam2*, *fmnl1b*, *fmnl2a* y *fmn2b* contienen posibles sICB para lo cual se ha descrito una acumulación de fibras de actina en el cuerpo de Balbiani, pero seguramente para el rearrreglo del citoesqueleto durante la migración del plasma germinal a la parte vegetal es requerida la función de toda esta familia, donde todos los miembros cuentan con al menos un clúster de sIV.

En base a lo que se observó con el cultivo de ovocitos en presencia tanto del inhibidor de RhoA como de Rock, pareciera que la vía RhoA/Rock participa no solo en el confinamiento sitio específico del plasma germinal en los septos de división durante la embriogénesis temprana (Miranda-Rodríguez *et al.*, 2017), sino también, en la dinámica del ensamblaje y desensamblaje del Cuerpo de Balbiani. Este proceso, mediado por RhoA/Rock es un ejemplo más de localización-función desde nivel de transcrito de algunos de sus homólogos de los cuales también predijimos bioinformáticamente la presencia de elementos Cis específicos para localización en este macrocomplejo granular por reconocimiento del homólogo de Hermes en esta especie, la proteína Rbpms2 cuyo sitio de unión es muy similar al reportado en la base de datos de oRNAmnt (Benoit Bouvrette *et al.*, 2020) y que esta proteína podría ser no solo capaz de reconocer RNAs del plasma germinal (Nijjar and Woodland, 2013) sino reconocer RNAs de proteínas que faciliten el transporte del plasma germinal. La presencia activa de RhoA en el Cuerpo de Balbiani adquiere sentido cuando, a pesar de tener claro que es una estructura granular, se conceptualiza con los fragmentos de Retículo Endoplasmático del cual se tiene reporte que puede anclarse (Liao, Ma and Liu, 2011) junto con la nube mitocondrial que serían las membranas a las cuales podría unirse y regular a sus proteínas efectoras. Al parecer estos organelos celulares son de los componentes más conservados en este tipo de estructura (Guraya, 1979b; Marlow, 2015).

Para que se lleve a cabo la correcta formación y estabilidad del Cuerpo de Balbiani posiblemente estén participando 2 mecanismos simultáneamente. El primer mecanismo propuesto es la acumulación de fibras de actina en este microdominio, cuya nucleación podría ser efectuada por la actividad enzimática de la familia de las forminas, de los cuales varios de sus miembros presentan una localización de su transcrito para el Cuerpo de Balbiani y que nosotros hemos predicho bioinformáticamente con el análisis de su secuencia lineal. Se sabe que la asociación de los gránulos de RNA con filamentos de actina les confiere la capacidad de mantenerse de forma estática temporalmente (Rajgor and Shanahan, 2014). Por otro lado, el segundo mecanismo podría estar ligado a la estabilidad de estructuras granulares mediado por fosforilación de proteínas con dominio intrínsecamente desordenados, como los de la proteína Bucky ball. Se ha demostrado que este tipo de proteínas requieren ser fosforiladas por proteínas con actividad cinasa para mantener estabilidad de complejos granulares (Wang *et al.*, 2014). Los resultados obtenidos en el presente trabajo sugieren que Rock2a podría ser una cinasa responsable de este proceso ya que presenta predichas para una localización de su transcrito en el Cuerpo de Balbiani, y el patrón de expresión por hibridación *in situ* también revela que la localización del transcrito en el Cuerpo de Balbiani. Por lo tanto, Rock podría traducirse localmente y fosforilar varios sustratos. Cabe resaltar que otro sustrato de Rock es la cadena ligera de la miosina a la cual también se le ha atribuido un papel importante para la localización de los RNAs (Latham *et al.*, 2001). Por lo tanto, Rock2a podría estar fosforilando a Bucky ball durante el ensamblaje del Cuerpo de Balbiani que después quedaría estabilizado por las fibras de actina, lo que sugeriría un papel directo en la localización de RNAs mediada por fosforilación de proteínas intrínsecamente desordenadas indispensables para la

formación de estructuras granulares, así como su movimiento por el espacio intracelular. Existe la posibilidad de que estas proteínas nucleadoras de actina o proteínas con actividad cinasa pudieran estar participando en la dinámica de formación y desensamblaje de plasma germinal participando en sitios subcelulares diferentes simultáneamente (Hall, 1998; Boettner and Van Aelst, 2002).

Una vez estabilizado y formado el Cuerpo de Balbiani, este migra y se desensambla en el polo vegetal del ovocito, pero permanece estático con una localización perinuclear en mutantes de la proteína Macf1a (Gupta *et al.*, 2010). Estos datos son similares a nuestros resultados preliminares de la inhibición de la vía de RhoA/Rock donde los ovocitos mantienen estructurado el plasma germinal en forma de Cuerpo de Balbiani en estadio 1b donde deberían ya haber migrado el plasma germinal formando un gradiente, y donde podría estar inhibiéndose la actividad de las cinasas Rock afectando la fosforilación de las proteínas motoras como su blanco más estudiado la miosina (Bloom and Beach, 1999; Latham *et al.*, 2001; Lindsay and McCaffrey, 2011), que ayudarían a la migración de esta estructura granular.

## Conclusión

En base a las predicciones bioinformáticas, RT-PCRs e hibridaciones *in situ*, se puede proponer que los mecanismos de localización no solo de los RNAs del plasma germinal, sino también de RNAm en si, dependan del reconocimiento temporal de marcas específicas en ellos por ribonucleoproteínas.

Posiblemente la estabilidad de la estructura granular de microdominios celulares como el Cuerpo de Balbiani depende de modificaciones postraduccionales tales como la fosforilación de proteínas que forman parte de esos complejos, así mismo, la fosforilación de proteínas motoras que viajan por el citoesqueleto que podrían participar en la regulación de la dinámica y recambio de los componentes de estos agregados.

## Perspectivas Bioinformáticas

- Ajuste fino de nuestro modelo bioinformático con respecto a otros posibles controles o pruebas para la identificación de señales de localización.
- Implementar el análisis de estructura secundaria de RNA en los posibles sitios de señales de localización.
- Aplicación del modelo bioinformático al transcriptoma de pez cebra, así como el de otros organismos modelo.

## Perspectivas Experimentales

- Demostrar que las señales de localización funcionan para localizar los RNAs en el Cuerpo de Balbiani o en el polo vegetal de ovocitos de pez cebra.
- Replicar los resultados del patrón de expresión de los genes de la vía de RhoA y sus genes efectores para sustentar su posible localización subcelular en el plasma germinal durante la ovogénesis de pez cebra.
- Dilucidar si la vía de RhoA durante la dinámica de la localización del plasma germinal durante la ovogénesis es facilitada por la familia de genes Rock o de las forminas o un sinergismo entre ellas.

## Información Suplementaria

### Tablas Suplementarias.

RBP; RBDs	RNA(m(especie))	Código postal	Mecanismo de transporte	Función celular
STAU; 4 dsRBDs conservados	<i>oskar</i> ( <i>Drosophila</i> )	3' UTR (SOLE; acumulaciones EJC)	Transporte activo (kinesina) con trayecto aleatorio sesgado	Diferenciación germinal
	<i>bicoid</i> ( <i>Drosophila</i> )	3' UTR and 50 stem loops	Transporte activo (dineína) y anclaje	Patrones embrionarios
	<i>vg1</i> ( <i>Xenopus</i> )	3' UTR (366nt)	Transporte activo (kinesina) y anclaje	Patrones embrionarios
	<i>CamKIIa</i> (mamífero)	3' UTR (30nt)	Transporte activo	Movimiento de fibroblastos y guía axonal
ZBP1, VERA, IMP1; 2 RRM y 4 KH	<i>ActB</i> (mamífero)	3' UTR, 5'-GGACU-3' (4-8) y 5'-ACA-3' (22-24)	Transporte activo, difusión, y anclaje	Diferenciación endodérmica embrionaria
	<i>vg1</i> y <i>vegT</i> ( <i>Xenopus</i> )	3' UTR (elemento X4)	Transporte activo (kinesina) y anclaje	Mantenimiento de polaridad axonal
	<i>Tau</i> (rata)	Secuencias ricas en U	Transporte activo (kinesina)	Formación de envoltura de mielina
hnRNPA/B, Squid, Hrp48; RRM, KH, y RGG	<i>MBP</i> (mamífero)	3' UTR (21nt A2RE)	Transporte activo	Desarrollo embrionario
	<i>gurken</i> ( <i>Drosophila</i> )	5' UTR	Transporte activo (dineína) y anclaje	Diferenciación germinal
	<i>oskar</i> ( <i>Drosophila</i> )	3' UTR (SOLE; acumulaciones EJC)	Transporte activo (kinesina)	Ensamblaje de microtúbulos
CPEB	<i>MAP2</i> (rata)	3' UTR CPE	Transporte activo	Ensamblaje y polaridad de uniones estrechas en la parte haz epitelio
	<i>ZO-1</i> (ratón)	3' UTR (5 CPEs conservados)	Desconocido	Huso y división mitótica
	<i>cyclinB1</i> y <i>Xbub3</i> ( <i>Xenopus</i> )	3' UTR CPE	Desconocido	Polaridad embrionaria
Rump	<i>nanos</i> ( <i>Drosophila</i> )	3' UTR (4 regiones parcialmente redundantes)	difusión y anclaje	Plasticidad sináptica
ARC1	<i>Arc1</i> (mamífero)	3' UTR	Transporte activo y exovesículas	Cambio de tipo sexual
She2/She3	<i>OXA1</i> (levadura)	3' UTR y ORF	Transporte activo (miosina) y anclaje	Biogénesis de membrana interna mitocondrial
Puf3p; PHD	<i>COX17</i> (levadura)	3' UTR (motivos UGUR)	Desconocido	Biogénesis de membrana mitocondrial y mortalidad
RBP-L/RBP-P; 3 RRM	<i>glutelin</i> (arroz)	ORF (motivos repetidos) y 3' UTR (rico en U)	Desconocido	Desarrollo de grano

	<i>prolamine</i> (arroz)	ORF (motivos repetidos) y 3'UTR (rico en U)	Transporte activo	Desarrollo de grano
FMRP; KH y RGG	<i>MAP1b</i> and <i>CamKIIa</i> (mamífero)	G-cuádruplex	Transporte activo	Neurogénesis y formación de memoria
SMAUG	<i>hsp83</i> ( <i>Drosophila</i> )	3' UTR	Transporte activo	Desarrollo: eliminación de transcritos maternos
LARP6	RNAm de proteínas ribosomales (mamífero)	5' TOP	Degradación y protección local	Formación de protuberancias de fibroblasto
TDP-43; RRM y C-terminal rico en Gly	<i>NEFL</i> y <i>RAC1</i> (mamífero)	3' UTR	Desconocido	Desarrollo neuronal y plasticidad
NOVA	<i>girk2</i> (ratón)	Región intrónica y 3'UTR YCAY	Transporte activo	Actividad de la dendrita de la neurona motora espinal

Tabla Suplementaria 1. Ribonucleoproteínas y sus zipcodes de los RNAs objetivo que guían su localización.

Gene	ID	clústers E2 MV1	nE2 MV1 en 5UTR	nE2 MV1 en CDS	nE2 MV1 en 3UTR	nE2 MV1 en 5UTR-CDS	nE2 MV1 en CDS-3UTR	nE2 MV1 en 5UTR-3UTR
<b>actbb</b>	NM_181601	0	0	0	0	0	0	0
<b>asz1</b>	NM_200230	0	0	0	0	0	0	0
<b>brul</b>	AB032726	1	0	0	1	0	0	0
<b>buc</b>	NM_001256780	1	0	0	0	1	0	0
<b>ccnb1</b>	NM_131513	0	0	0	0	0	0	0
<b>cpeb1b</b>	NM_131427	0	0	0	0	0	0	0
<b>daam1a</b>	XM_702261	2	0	1	1	0	0	0
<b>daam1b</b>	XM_005160502	3	0	1	2	0	0	0
<b>daam2</b>	XM_001338872	1	0	1	0	0	0	0
<b>dazl</b>	NM_131524	2	0	0	2	0	0	0
<b>diaph2</b>	XM_021472893	1	0	0	0	0	1	0
<b>diaph3</b>	NM_001003624	0	0	0	0	0	0	0
<b>dnd</b>	AY225448	1	0	0	0	1	0	0
<b>fmnl1a</b>	XM_680041	2	1	1	0	0	0	0
<b>fmnl1b</b>	XM_009297615	3	0	3	0	0	0	0
<b>fmnl2a</b>	XM_017357746	1	0	1	0	0	0	0
<b>fmnl2b</b>	XM_005165857	2	0	1	1	0	0	0
<b>fmnl3</b>	NM_001346154	1	0	1	0	0	0	0
<b>grip2a</b>	NM_001123288	1	0	1	0	0	0	0
<b>macf1a</b>	XM_017352288	2	0	1	1	0	0	0
<b>magoh</b>	NM_001017700	1	0	0	0	0	1	0
<b>nanos3</b>	NM_131878	0	0	0	0	0	0	0
<b>pou5f3</b>	NM_131112	1	0	0	1	0	0	0

<b>rbpms2b</b>	NM_200259	0	0	0	0	0	0	0
<b>rhoaa</b>	NM_213137	0	0	0	0	0	0	0
<b>rhoab</b>	NM_212749	0	0	0	0	0	0	0
<b>rhoac</b>	NM_213350	1	0	0	1	0	0	0
<b>rhoca</b>	NM_201150	1	0	0	1	0	0	0
<b>rhocb</b>	NM_001002445	1	0	0	1	0	0	0
<b>rock1</b>	NM_001256634	1	0	0	1	0	0	0
<b>rock2a</b>	NM_174863	1	0	0	1	0	0	0
<b>rock2b</b>	XM_017352433	1	1	0	0	0	0	0
<b>tdrd6</b>	XM_688932	1	0	1	0	0	0	0
<b>vasa</b>	BC129275	0	0	0	0	0	0	0
<b>wnt8</b>	NM_130946	1	0	0	0	0	1	0

Tabla Suplementaria 2. Cuantificación y localización de los clústers de motivos E2 MV1 en transcritos de *D. rerio*.

Gene	ID	sIBB	nBB 5UTR	nBB CDS	nBB 3UTR
<b>actbb</b>	NM_181601	0	0	0	0
<b>asz1</b>	NM_200230	0	0	0	0
<b>brul</b>	AB032726	0	0	0	0
<b>buc</b>	NM_001256780	1	0	1	0
<b>ccnb1</b>	NM_131513	0	0	0	0
<b>cpeb1b</b>	NM_131427	0	0	0	0
<b>daam1a</b>	XM_702261	1	0	0	1
<b>daam1b</b>	XM_005160502	0	0	0	0
<b>daam2</b>	XM_001338872	1	1	0	0
<b>dazl</b>	NM_131524	6	0	0	6
<b>diaph2</b>	XM_021472893	0	0	0	0
<b>diaph3</b>	NM_001003624	0	0	0	0
<b>dnd</b>	AY225448	2	0	0	2
<b>fmnl1a</b>	XM_680041	0	0	0	0
<b>fmnl1b</b>	XM_009297615	1	0	1	0
<b>fmnl2a</b>	XM_017357746	2	0	0	2
<b>fmnl2b</b>	XM_005165857	1	0	1	0
<b>fmnl3</b>	NM_001346154	0	0	0	0
<b>grip2a</b>	NM_001123288	0	0	0	0
<b>macf1a</b>	XM_017352288	7	1	4	2
<b>magoh</b>	NM_001017700	0	0	0	0
<b>nanos3</b>	NM_131878	3	0	0	3
<b>pou5f3</b>	NM_131112	0	0	0	0
<b>rbpms2b</b>	NM_200259	0	0	0	0
<b>rhoaa</b>	NM_213137	3	0	0	3
<b>rhoab</b>	NM_212749	2	0	0	2
<b>rhoac</b>	NM_213350	0	0	0	0
<b>rhoca</b>	NM_201150	0	0	0	0

<b>rhocb</b>	NM_001002445	0	0	0	0
<b>rock1</b>	NM_001256634	0	0	0	0
<b>rock2a</b>	NM_174863	5	0	0	5
<b>rock2b</b>	XM_017352433	3	3	0	0
<b>tdrd6</b>	XM_688932	5	3	2	0
<b>vasa</b>	BC129275	3	0	0	3
<b>wnt8</b>	NM_130946	0	0	0	0

Tabla Suplementaria 3. Cuantificación y localización de señales de localización del Cuerpo de Balbiani en transcritos de *D. rerio*.

Gen	Producto cDNA (pb)	Producto DNA (pb)
<i>rock1</i>	350	6656
<i>rock2a</i>	442	6842
<i>rock2b</i>	200	200
<i>fmnl1a</i>	440	1760
<i>fmnl1b</i>	305	4339
<i>fmnl2a</i>	365	5076
<i>fmnl2b</i>	326	2088
<i>fmnl3</i>	451	4313
<i>daam1a</i>	515	519
<i>daam1b</i>	498	498
<i>daam2</i>	509	20,762

Tabla Suplementaria 4. Tamaño del producto por PCR proveniente de muestras de cDNA o DNA genómico.

Figuras suplementarias

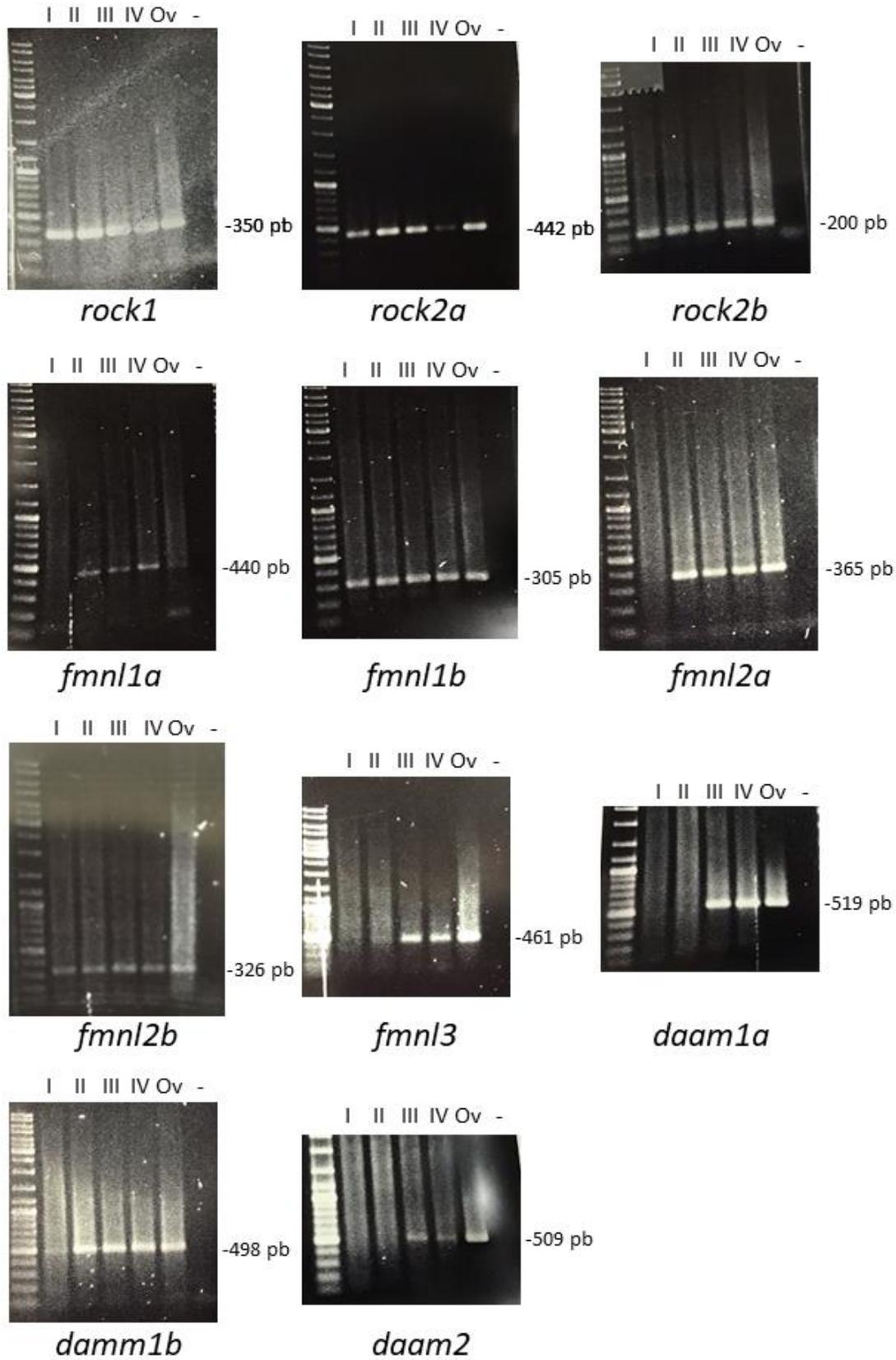


Figura Suplementaria 1 Expresión de los genes de la familia Rock y Forminas en estadios I-IV de la ovogénesis de pez cebra.

## Anexo programa

```
def find_all_indexes(input_str, search_str):
    l1 = []
    length = len(input_str)
    index = 0
    while index < length:
        i = input_str.find(search_str, index)
        if i == -1:
            return l1
        l1.append(i)
        index = i + 1
    return l1

def find_sites(sec,list_motiffs):
    d=[]
    for i in range(0,len(list_motiffs)):
        d=d+find_all_indexes(sec,list_motiffs[i])
    d.sort()
    return d

def transcrip(a):
    a=a.upper()
    b=a.replace('T','U')
    return b

def clusters(list_posc,clust_of,max_sep,emp_cds,empieza_3utr):
    c=0
    juntos=[]
    clust=[]
    nclu=0
    n5clu=0
    n5_3clu=0
    n5_Cclu=0
    nCclu=0
    nC_3clu=0
    n3clu=0
    for i in range(0,len(list_posc)-1):
        if (list_posc[i+1]-list_posc[i])<=max_sep:
            juntos=juntos+[list_posc[i]]
            c=1
        if i==(len(list_posc)-2):
            if len(juntos)>=clust_of-1:
                juntos=juntos+[list_posc[i]]
                loclu=loc_clu(juntos,emp_cds,empieza_3utr)
                n5clu=n5clu+loclu[0]
                nCclu=nCclu+loclu[1]
                n3clu=n3clu+loclu[2]
                n5_Cclu=n5_Cclu+loclu[3]
                nC_3clu=nC_3clu+loclu[4]
```

```

        n5_3clu=n5_3clu+loclu[5]
        clust=clust+juntos
        nclu=nclu+1
else:
    if c==1:
        if len(juntos)>=clust_of-1:
            juntos=juntos+[list_posc[i]]
            loclu=loc_clu(juntos,emp_cds,empieza_3utr)
            n5clu=n5clu+loclu[0]
            nCclu=nCclu+loclu[1]
            n3clu=n3clu+loclu[2]
            n5_Cclu=n5_Cclu+loclu[3]
            nC_3clu=nC_3clu+loclu[4]
            n5_3clu=n5_3clu+loclu[5]
            clust=clust+juntos
            juntos=[]
            c=0
            nclu=nclu+1
        else:
            juntos=[]
            c=0
    return clust,nclu,n5clu,nCclu,n3clu,n5_Cclu,nC_3clu,n5_3clu
def loc_clu(clu,emp_cds,empieza_3utr):
    a=clu[0]
    b=clu[-1]
    n5clu=0
    n5_3clu=0
    n5_Cclu=0
    nCclu=0
    nC_3clu=0
    n3clu=0
    if a>=empieza_3utr:
        n3clu=1
    else:
        if a>=emp_cds:
            if b>=empieza_3utr:
                nC_3clu=1
            else:
                nCclu=1
        else:
            if b>=empieza_3utr:
                n5_3clu=1
            else:
                if b>=emp_cds:
                    n5_Cclu=1
                else:

```

```

        n5clu=1
    return n5clu,nCclu,n3clu,n5_Cclu,nC_3clu,n5_3clu

def pos_transc_part(list_pos,emp_cds,empieza_3utr):
    utr5=[]
    cds=[]
    utr3=[]
    for i in range(0, len(list_pos)):
        if list_pos[i]<emp_cds:
            utr5=utr5+[list_pos[i]]
        if list_pos[i]>=emp_cds and list_pos[i]<empieza_3utr:
            cds=cds+[list_pos[i]]
        if list_pos[i]>=empieza_3utr:
            utr3=utr3+[list_pos[i]]
    return utr5,cds,utr3

def scat(df,list_gen_df):
    keys=df.keys()
    list_scat=[]
    for i in range(0,len(keys)):
        list_key=list(df[keys[i]])
        list_scat_0=[]
        for j in range(0,len(list_gen_df)):
            for k in range(0,len(list_key[j])):
                list_scat_0=list_scat_0+[[list_gen_df[j],list_key[j]][k]]
        list_scat_0=pd.DataFrame(data=list_scat_0,columns=['Gene','potitions'])
        list_scat=list_scat+[list_scat_0]
    return list_scat

def plotear(list_df):
    dff=[]
    for i in range(0,len(list_df)):
        dff=dff+[list_df[i].sort_values(by='Gene',ascending=False)]
    list_df=dff
    n=5
    grid = plt.GridSpec(1,n, wspace=0, hspace=0)
    plt.Figure(figsize=(11,4))
    ax2=plt.subplot(grid[0,n-1])
    ax=plt.subplot(grid[0,0:n-1],sharey=ax2)
    ax.scatter(y=list_df[0]['Gene'],x=list_df[0]['potitions'],color='lightblue')
    if len(list_df)==5:
        ax.scatter(y=list_df[4]['Gene'],x=list_df[4]['potitions'],s=50,color='black')
        ax.scatter(y=list_df[1]['Gene'],x=list_df[1]['potitions'],s=20,color='orange')
        ax.scatter(y=list_df[2]['Gene'],x=list_df[2]['potitions'],s=20,color='green')
        ax.scatter(y=list_df[3]['Gene'],x=list_df[3]['potitions'],s=20,color='red')
    try:
        ax2.scatter(y=list_df[0]['Gene'],x=list_df[0]['potitions'],color='lightblue')

```

```

if len(list_df)==5:
    ax2.scatter(y=list_df[4]['Gene'],x=list_df[4]['potitions'],s=50,color='black')
ax2.scatter(y=list_df[0]['Gene'],x=list_df[0]['potitions'],color='lightblue')
ax2.scatter(y=list_df[1]['Gene'],x=list_df[1]['potitions'],s=20,color='orange')
ax2.scatter(y=list_df[2]['Gene'],x=list_df[2]['potitions'],s=20,color='green')
ax2.scatter(y=list_df[3]['Gene'],x=list_df[3]['potitions'],s=20,color='red')
ax.set_xlim(-100,9000)
ax2.set_xlim(26500,28500)
ax.spines['right'].set_visible(False)
#ax2.ylabels.set_visible(False)
ax2.spines['left'].set_visible(False)
#ax.xaxis.tick_top()
ax.tick_params(labeltop=False) # don't put tick labels at the top
#ax2.xaxis.tick_bottom()
d = .015 # how big to make the diagonal lines in axes coordinates
# arguments to pass to plot, just so we don't keep repeating them
kwargs = dict(transform=ax2.transAxes, color='k', clip_on=False)
ax2.plot((-d, +d), (-d, +d), **kwargs) # top-left diagonal
ax2.plot((-d, +d), (1 - d, 1 + d), **kwargs) # bottom-left diagonal

kwargs.update(transform=ax.transAxes) # switch to the bottom axes
ax.plot((1 - d, 1 + d), (-d, +d), **kwargs) # top-right diagonal
ax.plot((1 - d, 1 + d), (1 - d, 1 + d), **kwargs) # bottom-right diagonal
except:
    a=0
    a=a+a
plt.show()
plt.clf()

#Paqueterias
import pandas as pd
import matplotlib.pyplot as plt

#extraer nombre de las hojas
df=pd.ExcelFile(r'C:\Users\ji_m\Desktop\rna_database_germplasm_pandas.xlsx')
sheetnames=df.sheet_names

#hacer por nombres de las hojas
all_dfs=[]
for i in range(0,len(sheetnames)):

df=pd.read_excel(r'C:\Users\ji_m\Desktop\rna_database_germplasm_pandas.xlsx',sheet_name=i,index='Gene')
shape=df.shape
#por tipo de gen
cat='Categoría'

```

```

#para tesis
cat='Categoria_2'
categorias=pd.CategoricalIndex(df[cat]).categories
df['empieza_cds']=df['Transc. Size']-df['Coding seq size']-df['UTR_3_size']
df['empieza_3utr']=df['Transc. Size']-df['UTR_3_size']
all_E2MV1_posc=[]
all_E2MV1_clusters=[]
all_E2MV1_nclu=[]
all_E2MV1_transc_5utr=[]
all_E2MV1_transc_cds=[]
all_E2MV1_transc_3utr=[]
all_BB_posc=[]
all_BB_transc_5utr=[]
all_BB_transc_cds=[]
all_BB_transc_3utr=[]
nE2MV1=[]
nE2MV1_5UTR=[]
nE2MV1_CDS=[]
nE2MV1_3UTR=[]
nBB=[]
nBB_5UTR=[]
nBB_CDS=[]
nBB_3UTR=[]
all_E2MV1_nclu5=[]
all_E2MV1_ncluC=[]
all_E2MV1_nclu3=[]
all_E2MV1_nclu5_C=[]
all_E2MV1_ncluC_3=[]
all_E2MV1_nclu5_3=[]
for j in range(0,shape[0]):
    t=transcrip(df['Transc.'][j])
    E2MV1_motiffs=['UUCAC','UUGCAC','AUCAC','UUCAU','UCCAC',
                  'UUCAG','UUUCU','CUUCU','UCUCU','UUUUC',
                  'UCCUCC','CUUUU']
    E2MV1_posc=find_sites(t,E2MV1_motiffs)
    nE2MV1=nE2MV1+[len(E2MV1_posc)]
    E2MV1_transc_parts=pos_transc_part(E2MV1_posc,df['empieza_cds'][j],df['empieza_3utr'][j])
    E2MV1_transc_5utr=E2MV1_transc_parts[0]
    nE2MV1_5UTR=nE2MV1_5UTR+[len(E2MV1_transc_5utr)]
    all_E2MV1_transc_5utr=all_E2MV1_transc_5utr+[E2MV1_transc_5utr]
    E2MV1_transc_cds=E2MV1_transc_parts[1]
    nE2MV1_CDS=nE2MV1_CDS+[len(E2MV1_transc_cds)]
    all_E2MV1_transc_cds=all_E2MV1_transc_cds+[E2MV1_transc_cds]
    E2MV1_transc_3utr=E2MV1_transc_parts[2]
    nE2MV1_3UTR=nE2MV1_3UTR+[len(E2MV1_transc_3utr)]
    all_E2MV1_transc_3utr=all_E2MV1_transc_3utr+[E2MV1_transc_3utr]

```

```

all_E2MV1_posc=all_E2MV1_posc+[E2MV1_posc]
E2MV1_clusters=clusters(E2MV1_posc,9,80,df['empieza_cds'][j],df['empieza_3utr'][j])
all_E2MV1_clusters=all_E2MV1_clusters+[E2MV1_clusters[0]]
all_E2MV1_nclu=all_E2MV1_nclu+[E2MV1_clusters[1]]
all_E2MV1_nclu5=all_E2MV1_nclu5+[E2MV1_clusters[2]]
all_E2MV1_ncluC=all_E2MV1_ncluC+[E2MV1_clusters[3]]
all_E2MV1_nclu3=all_E2MV1_nclu3+[E2MV1_clusters[4]]
all_E2MV1_nclu5_C=all_E2MV1_nclu5_C+[E2MV1_clusters[5]]
all_E2MV1_ncluC_3=all_E2MV1_ncluC_3+[E2MV1_clusters[6]]
all_E2MV1_nclu5_3=all_E2MV1_nclu5_3+[E2MV1_clusters[7]]
BB_motiffs=['GUAUUUA','UUGAUUU']
BB_posc=find_sites(t,BB_motiffs)
nBB=nBB+[len(BB_posc)]
BB_transc_parts=pos_transc_part(BB_posc,df['empieza_cds'][j],df['empieza_3utr'][j])
BB_transc_5utr=BB_transc_parts[0]
nBB_5UTR=nBB_5UTR+[len(BB_transc_5utr)]
all_BB_transc_5utr=all_BB_transc_5utr+[BB_transc_5utr]
BB_transc_cds=BB_transc_parts[1]
nBB_CDS=nBB_CDS+[len(BB_transc_cds)]
all_BB_transc_cds=all_BB_transc_cds+[BB_transc_cds]
BB_transc_3utr=BB_transc_parts[2]
nBB_3UTR=nBB_3UTR+[len(BB_transc_3utr)]
all_BB_transc_3utr=all_BB_transc_3utr+[BB_transc_3utr]
all_BB_posc=all_BB_posc+[BB_posc]
df['E2MV1 signal pos']=all_E2MV1_posc
df['nE2MV1 signal']=nE2MV1
df['E2MV1 clusters']=all_E2MV1_clusters
df['clusters E2MV1']=all_E2MV1_nclu
df['E2MV1 pos 5UTR']=all_E2MV1_transc_5utr
df['E2MV1 pos CDS']=all_E2MV1_transc_cds
df['E2MV1 pos 3UTR']=all_E2MV1_transc_3utr
df['E2MV1 en 5UTR']=nE2MV1_5UTR
df['E2MV1 en CDS']=nE2MV1_CDS
df['E2MV1 en 3UTR']=nE2MV1_3UTR
df['nE2MV1 en 5UTR']=all_E2MV1_nclu5
df['nE2MV1 en CDS']=all_E2MV1_ncluC
df['nE2MV1 en 3UTR']=all_E2MV1_nclu3
df['nE2MV1 en 5UTR-CDS']=all_E2MV1_nclu5_C
df['nE2MV1 en CDS-3UTR']=all_E2MV1_ncluC_3
df['nE2MV1 en 5UTR-3UTR']=all_E2MV1_nclu5_3
df['BB signal pos']=all_BB_posc
df['sIBB']=nBB
df['BB pos 5UTR']=all_BB_transc_5utr
df['BB pos CDS']=all_BB_transc_cds
df['BB pos 3UTR']=all_BB_transc_3utr
df['nBB 5UTR']=nBB_5UTR

```

```

df['nBB CDS']=nBB_CDS
df['nBB 3UTR']=nBB_3UTR
df=df.sort_values(by='Gene')
all_dfs=all_dfs+[df]
for j in range(0,len(categorias)):
    df1=df[df[cat]==categorias[j]]
    list_gen_df1=list(df1['Gene'])
    list_len_tra=list(df1['Transc. Size'])
    df0={'Gene':list_gen_df1,'potitions':list_len_tra}
    df0=pd.DataFrame(data=df0)
    df0.sort_values('Gene')
    df2=df1.filter(items=['E2MV1 pos 5UTR','E2MV1 pos CDS',
        'E2MV1 pos 3UTR'])
    df22=df1.filter(items=['E2MV1 clusters'])
    scats2=scat(df2,list_gen_df1)
    scats22=scat(df22,list_gen_df1)
    scats2=[df0]+scats2+scats22
    plotear(scats2)
    df3=df1.filter(items=['BB pos 5UTR','BB pos CDS',
        'BB pos 3UTR'])
    scats3=scat(df3,list_gen_df1)
    scats3=[df0]+scats3
    plotear(scats3)

#Crear el documento excel
writer = pd.ExcelWriter('final_data_pandas.xlsx', engine='xlsxwriter')
for i in range(0,len(all_dfs)):
    dfi=all_dfs[i].filter(items=['Gene','Categoria','ID','clústers E2MV1','sIBB','nE2MV1 en 5UTR','nE2MV1
en CDS','nE2MV1 en 3UTR','nE2MV1 en 5UTR-CDS','nE2MV1 en CDS-3UTR','nE2MV1 en 5UTR-
3UTR','nBB 5UTR','nBB CDS','nBB 3UTR'])
    dfi=dfi.set_index('Gene')
    dfi.to_excel(writer, sheet_name=sheetnames[i])
writer.save()

```

## Bibliografía

- Aizer, A. *et al.* (2008) 'The dynamics of mammalian P body transport, assembly, and disassembly in vivo', *Molecular Biology of the Cell*, 19(10), pp. 4154–4166. doi: 10.1091/mbc.E08-05-0513.
- Amano, M. *et al.* (1999) 'The COOH terminus of Rho-kinase negatively regulates Rho-kinase activity', *Journal of Biological Chemistry*, 274(45), pp. 32418–32424. doi: 10.1074/jbc.274.45.32418.
- Anderson, P. and Kedersha, N. (2009) 'Anderson P, Kedersha N.. RNA granules: post-transcriptional and epigenetic modulators of gene expression'. doi: 10.1038/nrm2694.
- Balagopal, V. and Parker, R. (2009) 'Polysomes, P bodies and stress granules: states and fates of eukaryotic mRNAs', *Current Opinion in Cell Biology*, pp. 403–408. doi: 10.1016/j.ceb.2009.03.005.
- Barbarese, E. *et al.* (1988) 'Expression and Localization of Myelin Basic Protein in Oligodendrocytes and Transfected Fibroblasts', *Journal of Neurochemistry*. doi: 10.1111/j.1471-4159.1988.tb01153.x.
- Benoit Bouvrette, L. P. *et al.* (2020) 'oRNAMENT: a database of putative RNA binding protein target sites in the transcriptomes of model species', *Nucleic acids research*, 48(D1), pp. D166–D173. doi: 10.1093/nar/gkz986.
- Blaser, H. (2005) 'Transition from non-motile behaviour to directed migration during early PGC development in zebrafish', *Journal of Cell Science*. doi: 10.1242/jcs.02522.
- Bloom, K. and Beach, D. L. (1999) 'mRNA localization: Motile RNA, asymmetric anchors', *Current Opinion in Microbiology*. doi: 10.1016/S1369-5274(99)00029-6.
- Boettner, B. and Van Aelst, L. (2002) 'The role of Rho GTPases in disease development', *Gene*. Elsevier, pp. 155–174. doi: 10.1016/S0378-1119(02)00426-2.
- Bontems, F. *et al.* (2009) 'Bucky Ball Organizes Germ Plasm Assembly in Zebrafish', *Current Biology*, 19(5), pp. 414–422. doi: 10.1016/j.cub.2009.01.038.
- Bregues, M., Teixeira, D. and Parker, R. (2005) 'Cell biology: Movement of eukaryotic mRNAs between polysomes and cytoplasmic processing bodies', *Science*, 310(5747), pp. 486–489. doi: 10.1126/science.1115791.
- Bubunencko, M. *et al.* (2002) 'A consensus RNA signal that directs germ layer determinants to the vegetal cortex of *Xenopus* oocytes', *Developmental Biology*, 248(1), pp. 82–92. doi: 10.1006/dbio.2002.0719.
- Buxbaum, A. R., Haimovich, G. and Singer, R. H. (2015) 'In the right place at the right time: Visualizing and understanding mRNA localization', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. doi: 10.1038/nrm3918.
- Campbell, P. D. *et al.* (2015) 'Kinesin-1 interacts with bucky ball to form germ cells and is required to pattern the zebrafish body axis', *Development (Cambridge)*, 142(17), pp. 2996–3008. doi: 10.1242/dev.124586.
- Crerar, H. *et al.* (2019) 'Regulation of NGF Signaling by an Axonal Untranslated mRNA', *Neuron*. doi:

10.1016/j.neuron.2019.02.011.

Dallaire, A., Frédérick, P. M. and Simard, M. J. (2018) 'Somatic and Germline MicroRNAs Form Distinct Silencing Complexes to Regulate Their Target mRNAs Differently', *Developmental Cell*, 47(2), pp. 239-247.e4. doi: 10.1016/j.devcel.2018.08.022.

Engel, K. L. *et al.* (2020) 'Mechanisms and consequences of subcellular RNA localization across diverse cell types', *Traffic*, (April), pp. 1–15. doi: 10.1111/tra.12730.

Escobar-Aguirre, M. *et al.* (2017) 'Microtubule-actin crosslinking factor 1 (Macf1) domain function in Balbiani body dissociation and nuclear positioning', *PLoS Genetics*, 13(9). doi: 10.1371/journal.pgen.1006983.

Eulalio, A. *et al.* (2007) 'P-Body Formation Is a Consequence, Not the Cause, of RNA-Mediated Gene Silencing', *Molecular and Cellular Biology*, 27(11), pp. 3970–3981. doi: 10.1128/mcb.00128-07.

Farley, B. M. and Ryder, S. P. (2008) 'Regulation of Maternal mRNAs in Early Development', *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 43(2), pp. 135–162. doi: 10.1080/10409230801921338.

Farris, S. *et al.* (2014) 'Selective localization of Arc mRNA in dendrites involves activity- and translation-dependent mRNA degradation', *Journal of Neuroscience*. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4944-13.2014.

Fernandez-Borja, M. *et al.* (2005) 'RhoB regulates endosome transport by promoting actin assembly on endosomal membranes through Dia1', *Journal of Cell Science*, 118(12), pp. 2661–2670. doi: 10.1242/jcs.02384.

Ferrandon, D. *et al.* (1994) 'Staufen protein associates with the 3'UTR of bicoid mRNA to form particles that move in a microtubule-dependent manner', *Cell*. doi: 10.1016/0092-8674(94)90013-2.

Fu, Y. *et al.* (2014) 'Gene expression regulation mediated through reversible', 15(May). doi: 10.1038/nrg3724.

Gagnon, J. A. and Mowry, K. L. (2011) 'Molecular motors: Directing traffic during RNA localization', *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. doi: 10.3109/10409238.2011.572861.

Goode, B. L. and Eck, M. J. (2007) 'Mechanism and Function of Formins in the Control of Actin Assembly', *Annual Review of Biochemistry*, 76(1), pp. 593–627. doi: 10.1146/annurev.biochem.75.103004.142647.

Grikscheit, K. and Grosse, R. (2016) 'Formins at the Junction', *Trends in Biochemical Sciences*, 41(2), pp. 148–159. doi: 10.1016/J.TIBS.2015.12.002.

Gupta, T. *et al.* (2010) 'Microtubule actin crosslinking factor 1 regulates the balbiani body and animal-vegetal polarity of the zebrafish oocyte', *PLoS Genetics*, 6(8). doi: 10.1371/journal.pgen.1001073.

Guraya, S. S. (1979a) 'Recent Advances in the Morphology, Cytochemistry, and Function of Balbiani's

- Vitelline Body in Animal Oocytes', *International Review of Cytology*, 59, pp. 249–321. doi: 10.1016/S0074-7696(08)61664-2.
- Guraya, S. S. (1979b) 'Recent Advances in the Morphology, Cytochemistry, and Function of Balbiani's Vitelline Body in Animal Oocytes', *International Review of Cytology*, 59(C), pp. 249–321. doi: 10.1016/S0074-7696(08)61664-2.
- Hall, A. (1998) 'Rho GTPases and the actin cytoskeleton', *Science*. American Association for the Advancement of Science, pp. 509–514. doi: 10.1126/science.279.5350.509.
- Heim, A. E. *et al.* (2014) 'Oocyte polarity requires a Bucky ball-dependent feedback amplification loop', *Development*, 141(4), pp. 842–854. doi: 10.1242/DEV.090449.
- De Heredia, M. L. and Jansen, R. P. (2004) 'mRNA localization and the cytoskeleton', *Current Opinion in Cell Biology*. Elsevier Current Trends, pp. 80–85. doi: 10.1016/j.ceb.2003.11.002.
- Huang, L. *et al.* (2011) 'Mitochondria associate with P-bodies and modulate microRNA-mediated RNA interference', *Journal of Biological Chemistry*, 286(27), pp. 24219–24220. doi: 10.1074/jbc.M111.240259.
- Irie, N. *et al.* (2015) 'SOX17 is a critical specifier of human primordial germ cell fate.', *Cell*, 160(1–2), pp. 253–68. doi: 10.1016/j.cell.2014.12.013.
- Jambhekar, A. and Derisi, J. L. (2007) 'Cis-acting determinants of asymmetric, cytoplasmic RNA transport', *RNA*. doi: 10.1261/rna.262607.
- Kaufman, O. H. *et al.* (2018) 'rbpms2 functions in Balbiani body architecture and ovary fate', *PLOS Genetics*. Edited by F. Pelegri, 14(7), p. e1007489. doi: 10.1371/journal.pgen.1007489.
- Kedersha, N. and Anderson, P. (2009) 'Chapter 4 Regulation of Translation by Stress Granules and Processing Bodies', *Progress in Molecular Biology and Translational Science*. Academic Press, pp. 155–185. doi: 10.1016/S1877-1173(09)90004-7.
- Kimball, S. R. *et al.* (2003) 'Mammalian stress granules represent sites of accumulation of stalled translation initiation complexes', *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 284(2 53-2). doi: 10.1152/ajpcell.00314.2002.
- Kishimoto, Y. *et al.* (2004) 'Zebrafish maternal-effect mutations causing cytokinesis defect without affecting mitosis or equatorial vasa deposition', *Mechanisms of Development*, 121(1), pp. 79–89. doi: 10.1016/j.mod.2003.10.001.
- Kloc, M. and Etkin, L. D. (1995) 'Two distinct pathways for the localization of RNAs at the vegetal cortex in *Xenopus* oocytes', *Development*, 121(2).
- Kloc, M., Larabell, C. and Etkin, L. D. (1996) *Elaboration of the Messenger Transport Organizer Pathway for Localization of RNA to the Vegetal Cortex of Xenopus Oocytes*, *DEVELOPMENTAL BIOLOGY*.

- Klymkowsky, M. W. (2018) 'Whole-mount immunocytochemistry in *Xenopus*', *Cold Spring Harbor Protocols*, 2018(1), pp. 28–33. doi: 10.1101/pdb.prot097295.
- Kosaka, K. *et al.* (2007) 'Spatiotemporal localization of germ plasm RNAs during zebrafish oogenesis'. doi: 10.1016/j.mod.2007.01.003.
- Kovar, D. R. and Pollard, T. D. (2004) 'Insertional assembly of actin filament barbed ends in association with formins produces piconewton forces', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(41), pp. 14725–14730. doi: 10.1073/pnas.0405902101.
- Krichevsky, A. M. and Kosik, K. S. (2001) 'Neuronal RNA granules: A link between RNA localization and stimulation-dependent translation', *Neuron*, 32(4), pp. 683–696. doi: 10.1016/S0896-6273(01)00508-6.
- Kugler, J. *et al.* (2009) 'Localization , anchoring and translational control Localization , anchoring and translational control of oskar , gurken , bicoid and nanos mRNA during *Drosophila* oogenesis', 6934. doi: 10.4161/fly.3.1.7751.
- Kühn, S. and Geyer, M. (2014) 'Formins as effector proteins of rho GTPases', *Small GTPases*. Taylor and Francis Inc. doi: 10.4161/sgtp.29513.
- Lai, F. *et al.* (2011) 'Nanos1 functions as a translational repressor in the *Xenopus* germline', *Mechanisms of Development*, 128(1–2), pp. 153–163. doi: 10.1016/j.mod.2010.12.001.
- Latham, V. M. *et al.* (2001) 'A Rho-dependent signaling pathway operating through myosin localizes  $\beta$ -actin mRNA in fibroblasts', *Current Biology*, 11(13), pp. 1010–1016. doi: 10.1016/S0960-9822(01)00291-3.
- Leclère, L. *et al.* (2012) 'Maternally localized germ plasm mRNAs and germ cell/stem cell formation in the cnidarian *Clytia*', *Developmental Biology*, 364(2), pp. 236–248. doi: 10.1016/j.ydbio.2012.01.018.
- Lécuyer, E. *et al.* (2007) 'Global Analysis of mRNA Localization Reveals a Prominent Role in Organizing Cellular Architecture and Function', *Cell*, 131(1), pp. 174–187. doi: 10.1016/j.cell.2007.08.003.
- Lessman, C. A. (2009) 'Oocyte maturation: Converting the zebrafish oocyte to the fertilizable egg', *General and Comparative Endocrinology*. doi: 10.1016/j.ygcen.2008.11.004.
- Leung, T. *et al.* (1996) 'The p160 RhoA-binding kinase ROK alpha is a member of a kinase family and is involved in the reorganization of the cytoskeleton.', *Molecular and Cellular Biology*, 16(10), pp. 5313–5327. doi: 10.1128/mcb.16.10.5313.
- Liao, G., Ma, X. and Liu, G. (2011) 'An RNA-zipcode-independent mechanism that localizes Dia1 mRNA to the perinuclear ER through interactions between Dia1 nascent peptide and Rho-GTP', *Journal of Cell Science*, 124(4), pp. 589–599. doi: 10.1242/jcs.072421.
- Lindsay, A. J. and McCaffrey, M. W. (2011) 'Myosin Va is required for P body but not stress granule formation', *Journal of Biological Chemistry*, 286(13), pp. 11519–11528. doi: 10.1074/jbc.M110.182808.

- Lipshitz, H. D. and Smibert, C. A. (2000) 'Mechanisms of RNA localization and translational regulation', *Current Opinion in Genetics and Development*. Current Biology Ltd, pp. 476–488. doi: 10.1016/S0959-437X(00)00116-7.
- Liu, H. *et al.* (2010) 'Structural basis for methylarginine-dependent recognition of Aubergine by Tudor', *Genes and Development*, 24(17), pp. 1876–1881. doi: 10.1101/gad.1956010.
- Loschi, M. *et al.* (2009) 'Dynein and kinesin regulate stress-granule and P-body dynamics', *Journal of Cell Science*, 122(21), pp. 3973–3982. doi: 10.1242/jcs.051383.
- Macdonald, P. M. and Kerr, K. (1997) 'Redundant RNA recognition events in bicoid mRNA localization', *RNA*.
- Marlow, F. (2015) 'Primordial Germ Cell Specification and Migration', *F1000Research*. doi: 10.12688/f1000research.6995.1.
- Marlow, F. L. (2010) *Maternal Control of Development in Vertebrates, Colloquium Series on Developmental Biology*. doi: 10.4199/c00023ed1v01y201012deb005.
- Martin, K. C. and Ephrussi, A. (2009) 'mRNA Localization: Gene Expression in the Spatial Dimension', *Cell*, pp. 719–730. doi: 10.1016/j.cell.2009.01.044.
- McGrew, L. L. *et al.* (1989) 'Poly(A) elongation during *Xenopus* oocyte maturation is required for translational recruitment and is mediated by a short sequence element.', *Genes & development*, 3(6), pp. 803–815. doi: 10.1101/gad.3.6.803.
- Meer, E. J. *et al.* (2012) 'Identification of a cis-acting element that localizes mRNA to synapses', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(12), pp. 4639–4644. doi: 10.1073/pnas.1116269109.
- Miranda-Rodríguez, J. R. (2012) *Función de RhoA en la localización del plasma germinal en el pez cebra*. Universidad Nacional Autónoma de México. Available at: <http://132.248.9.195/ptd2013/agosto/0699932/Index.html> Texto completo.
- Miranda-Rodríguez, J. R. *et al.* (2017) 'RhoA/ROCK pathway activity is essential for the correct localization of the germ plasm mRNAs in zebrafish embryos', *Developmental Biology*, 421(1), pp. 27–42. doi: 10.1016/j.ydbio.2016.11.002.
- Miranda Rodríguez, J. R. (2018) *Función de RhoA en la localización del plasma germinal en pez cebra*. Universidad Nacional Autónoma de México. Available at: <http://132.248.9.195/ptd2018/enero/0769296/Index.html> Texto completo.
- Nijjar, S. and Woodland, H. R. (2013) 'Protein interactions in *Xenopus* germ plasm RNP particles', *PLoS ONE*. doi: 10.1371/journal.pone.0080077.
- Oh, J. Y. *et al.* (2013) 'Activity-dependent synaptic localization of processing bodies and their role in dendritic structural plasticity', *Journal of Cell Science*, 126(9), pp. 2114–2123. doi: 10.1242/jcs.125690.

- Otomo, T. *et al.* (2005) 'Structural basis of actin filament nucleation and processive capping by a formin homology 2 domain', *Nature*, 433(7025), pp. 488–494. doi: 10.1038/nature03251.
- Pauley, K. M. *et al.* (2006) 'Formation of GW bodies is a consequence of microRNA genesis', *EMBO Reports*, 7(9), pp. 904–910. doi: 10.1038/sj.embor.7400783.
- Pelegri, F. *et al.* (1999) 'A mutation in the zebrafish maternal-effect gene *nebel* affects furrow formation and *vasa* RNA localization', *Current Biology*, 9(24), pp. 1431–1440. doi: 10.1016/S0960-9822(00)80112-8.
- Pelegri, F. (2003) 'Maternal Factors in Zebrafish Development', *Developmental Dynamics*. doi: 10.1002/dvdy.10390.
- Rajgor, D. *et al.* (2014) 'Mammalian microtubule P-body dynamics are mediated by *nesprin-1*', *Journal of Cell Biology*, 205(4), pp. 457–475. doi: 10.1083/jcb.201306076.
- Rajgor, D. and Shanahan, C. M. (2014) 'RNA granules and cytoskeletal links', in *Biochemical Society Transactions*. Portland Press Ltd, pp. 1206–1210. doi: 10.1042/BST20140067.
- Raz, E. (2003) 'Primordial germ-cell development: The zebrafish perspective', *Nature Reviews Genetics*. doi: 10.1038/nrg1154.
- Riemer, S. *et al.* (2015) 'A functional Bucky ball-GFP transgene visualizes germ plasm in living zebrafish', *Gene Expression Patterns*, 18(1–2), pp. 44–52. doi: 10.1016/j.gep.2015.05.003.
- Riento, K. and Ridley, A. J. (2003) 'Rocks: Multifunctional kinases in cell behaviour', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. Nature Publishing Group, pp. 446–456. doi: 10.1038/nrm1128.
- Roovers, E. F. *et al.* (2018) 'Tdrd6a Regulates the Aggregation of Buc into Functional Subcellular Compartments that Drive Germ Cell Specification', *Developmental Cell*, 46(3). doi: 10.1016/j.devcel.2018.07.009.
- Salas-Vidal, E. *et al.* (2005) 'Genomic annotation and expression analysis of the zebrafish Rho small GTPase family during development and bacterial infection', *Genomics*, 86(1), pp. 25–37. doi: 10.1016/J.YGENO.2005.03.010.
- Siomi, M. C., Mannen, T. and Siomi, H. (2010) 'How does the royal family of tudor rule the PIWI-interacting RNA pathway?', *Genes and Development*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp. 636–646. doi: 10.1101/gad.1899210.
- Somlyo, A. P. and Somlyo, A. V. (2000) 'Signal transduction by G-proteins, Rho-kinase and protein phosphatase to smooth muscle and non-muscle myosin II', *Journal of Physiology*. Cambridge University Press, pp. 177–185. doi: 10.1111/j.1469-7793.2000.t01-2-00177.x.
- Stuart, H. C. *et al.* (2008) 'Localized Rho GTPase activation regulates RNA dynamics and compartmentalization in tumor cell protrusions', *Journal of Biological Chemistry*, 283(50), pp. 34785–34795. doi: 10.1074/jbc.M804014200.

Thisse, C. and Thisse, B. (2007) 'High-resolution in situ hybridization to whole-mount zebrafish embryos'. doi: 10.1038/nprot.2007.514.

Urven, L. E., Yabe, T. and Pelegri, F. (2006) 'A role for non-muscle myosin II function in furrow maturation in the early zebrafish embryo', *Journal of Cell Science*, 119(20), pp. 4342–4352. doi: 10.1242/jcs.03197.

Wang, J. T. *et al.* (2014) 'Regulation of RNA granule dynamics by phosphorylation of serine-rich, intrinsically disordered proteins in *C. elegans*', *eLife*, 3. doi: 10.7554/eLife.04591.

Weismann, A. (1885) *The Continuity of the Germ-Plasm as the Foundation of a Theory of Heredity, Essays upon heredity and kindred biological problems*. Available at: <http://www.biodiversitylibrary.org/item/70640#page/182/mode/1up>.

Westerfield, M. (2007) *The Zebrafish Book. A Guide for the Laboratory Use of Zebrafish (Danio rerio), 5th Edition*. 4th editio, University of Oregon Press, Eugene (Book). 4th editio. Eugene, OR 97403 USA.

Williams, N. K. and Dichtl, B. (2018) 'Co-translational control of protein complex formation: A fundamental pathway of cellular organization?', *Biochemical Society Transactions*. doi: 10.1042/BST20170451.

Wolf, K. (1963) 'Physiological salines for fresh-water teleosts', *Progressive Fish-Culturist*, 25(3), pp. 135–140. doi: 10.1577/1548-8659(1963)25[135:PSFFT]2.0.CO;2.