



UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
ÁREA BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR

**ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN Y FUNCIÓN DE IIG9 EN LA DIFERENCIACIÓN
Y POLARIZACIÓN DE LAS CÉLULAS EPENDIMARIAS NORMALES Y
TUMORALES**

VÍCTOR MANUEL BAEZA CHAVARRÍA

Concepción – Chile

2021

Profesor Guía

Dra. Katterine Salazar Martínez

Laboratorio de Neurobiología y
Células Madre

Departamento de Biología Celular

Facultad de Ciencias Biológicas

Universidad de Concepción

Profesor Guía

Dr. Francisco Nualart Santander

Laboratorio de Neurobiología y Células
Madre

Departamento de Biología Celular

Facultad de Ciencias Biológicas

Universidad de Concepción

Esta tesis ha sido realizada en el Departamento de Biología Celular de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción.

Profesores integrantes de la comisión evaluadora:

Dra. Katterine Salazar Martínez
Profesor Guía de Tesis
Facultad de Ciencias Biológicas

Dr. Francisco Nualart Santander
Profesor Guía de Tesis
Facultad de Ciencias Biológicas



Dra. Marcela Torrejón Quezada
Depto. De Bioquímica y Biología Molecular
Facultad de Ciencias Biológicas

Dr. Juan-Pablo Henríquez Hohmann
Departamento de Biología Celular
Facultad de Ciencias Biológicas

Dr. Ariel Castro Alma
Director Programa Doctorado en Cs.
Biológicas, Área Biología Celular y Molecular

Dr. Christian González-Billault
Facultad de Ciencias
Universidad de Chile



Tesis de doctorado financiada por:

Fondecyt Regular 1190848

Fondecyt Regular 1181243

Fondecyt de Iniciación 11140405

ECM-12-PIA-ANID

Beca ANID Doctorado Nacional 2016 (21161386)

Beca ANID Gastos Operacionales 2018 (21161386)

Beca décimo semestre proyecto EDPG 2020





$$“X_{t+1} = aX_t(1 - X_t)”$$

Robert May. *Nature* (1976)

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Nualart, por el valor de los detalles, tanto en el proceso de escritura del proyecto como en la interpretación de los resultados. A la Dra. Salazar, por el apoyo tanto en lo teórico, experimental y personal. A ambos, por permitirme trabajar en un tema con alta proyección, y que me permitió vivir el ejercicio de la ciencia a través de un ocular, quizás tan emocionado y sorprendido como lo estuvieron a través de sus oculares Ramón y Cajal o Galilei. Gracias.

Al cuerpo docente del programa, que nunca dudó en responder las preguntas que me surgieron. Al personal del Centro de Microscopía Avanzada CMA Biobío, al Laboratorio de Histología y al personal del Bioterio por el apoyo técnico y metodológico al desarrollo de esta tesis. Gracias.

A los colegas y amigos del Laboratorio de Neurobiología: por las discusiones sobre literatura, metodologías, filosofía, series, música, o el sabor de la torta para el siguiente cumpleaños que nos tocaba en el calendario. Gracias.

A mi familia y amigos por ser un pilar fundamental durante el proceso de especificación, diferenciación y maduración de este doctor tan estocástico. Gracias.

Y a ti, si estás leyendo esta tesis. Gracias.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL.....	vii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	x
ÍNDICE DE TABLAS.....	xiii
ABREVIATURAS.....	xiv
RESUMEN.....	xviii
ABSTRACT.....	xx
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Epitelio multiciliado en mamíferos adultos.....	1
1.2. Epitelio multiciliado en el sistema nervioso central: Las células endimarias.....	3
1.3. Células endimarias de las cavidades ventriculares del SNC adulto.....	3
1.4. Células endimarias en los plexos coroideos.....	10
1.5. Proteína ciliar IIG9, interacción con PP1 y su relación funcional con la diferenciación endimaria.....	12
1.6. De Glía Radial a Célula Endimaria: especificación, diferenciación y polarización durante el desarrollo.....	17
1.7. Fisiopatología asociada al epitelio endimario.....	22
1.8. Endimoma humano y su relación con IIG9.....	24
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	27
HIPÓTESIS.....	29
OBJETIVO GENERAL.....	29
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	29
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	30
3.1. Animales de experimentación.....	30
3.1.1. Mantenimiento de los animales.....	30
3.1.2. Inyección única y continua en animales postnatales y adultos.....	30
3.2. Cultivos celulares.....	31
3.2.1. Cultivo de células HEK293T.....	31
3.2.2. Cultivo de células HEK293AAV.....	32
3.2.3. Cultivo de células DKFZ-EP1NS.....	32

3.2.4. Cultivo primario de neuroesferas.....	33
3.2.5. Medición de confluencia mediante tecnología IncuCyte®.....	33
3.3. Procesamiento histológico y citológico	34
3.3.1. Fijación muestras de tejido.	34
3.3.2. Fijación cultivos celulares.....	34
3.3.3. Obtención de cortes de pared endimaria (en-face wholemount).....	35
3.3.4. Inclusión y corte.	36
3.3.5. Inmunohistoquímica con peroxidasa.....	37
3.3.6. Inmunofluorescencia.	38
3.3.7. Microscopía.	39
3.4. RT-PCR convencional.	40
3.4.1. Extracción de ARN total.	40
3.4.2. Transcripción reversa de ARN total (RT).	41
3.4.3. Amplificación de cADN por PCR.	41
3.4.4. Electroforesis en geles de agarosa.	42
3.5. Ensayos de inmunodetección de proteínas	43
3.5.1. Obtención de extractos de proteínas totales.....	43
3.5.2. Electroforesis en gel de poliacrilamida y electrotransferencia.	44
3.5.3. Inmunodetección de las proteínas.	45
3.6. Generación de vectores plasmidiales bicistrónicos para la expresión de las isoformas larga y corta de IIIG9 y la proteína reportera GFP.	46
3.6.1 Subclonamiento en vector pAAV-Ires-GFP.	46
3.6.2 Purificación de los fragmentos de IIIG9L y IIIG9s con extremos no cohesivos.	46
3.6.3. Transformación de bacterias químicamente competentes y purificación del vector bicistrónico.	47
3.6.4 Desfosforilación del vector pAAV-4-Ires-GFP.....	47
3.6.5. Ligación de los fragmentos de IIIG9 en vector pAAV-4-Ires-GFP.	48
3.6.6. Orientación del inserto en el vector de expresión por PCR.	48
3.6.7. Elaboración de medio de cultivo Luria-Bertani (LB) líquido y agar.	48
3.7. Transfección de los clones en células HEK293A.....	49
4. RESULTADOS	51
4.1. Capítulo 1. Estudio de la localización de IIIG9 en el epitelio ventricular de rata adulta y evaluación del efecto de la pérdida de función de IIIG9 en la polarización de la pared endimaria adulta.	51

4.1.1. Localización de IIIG9 en las paredes ventriculares de rata adulta.....	52
4.1.2. Análisis de la inhibición sostenida de IIIG9 en el epitelio endimario de rata adulta. .	61
4.2. Capítulo 2. Caracterización de IIIG9 durante el periodo de especificación, diferenciación y polarización de las células endimarias, y análisis del fenotipo resultante de la pérdida de función de IIIG9 <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	67
4.2.1. Localización de IIIG9 durante el desarrollo embrionario y postnatal en las paredes ventriculares.	68
4.2.2. Análisis del fenotipo resultante de la pérdida de función de IIIG9 <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	91
4.3. Capítulo 3. Análisis del efecto de la ganancia de función de IIIG9 en la línea celular de endimoma DKFZ-EP1NS.....	99
5. DISCUSIÓN.....	113
5.1. Localización de IIIG9 en los cilios móviles.....	114
5.2. IIIG9 y el cilio primario.....	117
5.3. IIIG9 y las uniones célula-célula	119
5.4. Efectos de la inhibición de IIIG9	121
5.5. IIIG9 en un modelo tumoral derivado de la glía radial humana.	128
5.6. Funcionalidad de IIIG9 durante el desarrollo.....	130
6. CONCLUSIONES	135
7. ANEXO	136
8. REFERENCIAS	139

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Modelo tridimensional del nicho neurogénico adulto en la pared estriatal de los ventriculares laterales en modelo murino.	7
Figura 2. Localización de células multiciliadas en sistema nervioso central murino.	8
Figura 3. Representación esquemática del desarrollo de la corteza cerebral embrionaria.	19
Figura 4. Representación esquemática del proceso de especificación de las células endimarias.	20
Figura 5. IIIG9 es exclusivamente expresado en células endimarias, pero no en otras células que recubren las paredes ventriculares.	55
Figura 6. IIIG9 se localiza en los cilios y los bordes celulares en un modelo <i>in vitro</i> de células endimarias aisladas desde ventrículo lateral de rata adulta.	57
Figura 7. Análisis de marcadores ciliares y de adhesión celular en la pared endimaria mediante la técnica de <i>wholemout</i>	59
Figura 8. IIIG9 se codistribuye con marcadores de unión célula-célula en el ventrículo lateral de rata adulta.	60
Figura 9. La inhibición sostenida de IIIG9 <i>in vivo</i> genera gliosis reactiva y la formación de cúmulos celulares GFP+ rodeados por la cicatriz glial.	64
Figura 10. La inhibición sostenida de IIIG9 <i>in vivo</i> genera gliosis reactiva y desorganización de la citoarquitectura ventricular.	65
Figura 11. La disrupción de la citoarquitectura epitelial producida por la inhibición de IIIG9 <i>in vivo</i> genera una deslocalización del marcaje para IIIG9 en las células no transducidas adyacentes.	66
Figura 12. El ARNm de IIIG9 se expresa en distintos estadios del desarrollo embrionario del cerebro de rata.	70
Figura 13. IIIG9 se localiza en la pared ventricular embrionaria durante el período de especificación de la glía radial a célula endimaria.	71
Figura 14. Análisis de la distribución de IIIG9 en distintas regiones del sistema ventricular de rata de 13, 15 y 17 días de gestación.	74

Figura 15. Codistribución de IIIG9 con marcadores de unión célula-célula en el ventrículo lateral de ratas de 13, 15 y 17 días de gestación.	75
Figura 16. IIIG9 se deslocaliza de las uniones célula-célula durante el inicio de la diferenciación endimaria.	81
Figura 17. Identificación de dos subpoblaciones que forman un mosaico de células agrupadas dependiendo de la localización citoplasmática de IIIG9 en el epitelio del ventrículo lateral de rata de 5 y 7 días postnatal.	83
Figura 18. IIIG9 se localiza en la gran mayoría de las células que recubren el epitelio del ventrículo lateral de rata de 15 días postnatal, de manera equivalente a la localización en el epitelio endimario adulto.	85
Figura 19. La cantidad de células positivas a IIIG9 citoplasmático sigue un gradiente caudorostral en el epitelio del ventrículo lateral de rata de 7 días postnatal.	87
Figura 20. La cantidad de células positivas a GLUT1 citoplasmático sigue un gradiente caudorostral en el epitelio del ventrículo lateral de rata de 5 días postnatal.	89
Figura 21. La inhibición adenoviral de IIIG9 en modelo de neuroesferas <i>in vitro</i> altera el número de neuroesferas y la expresión de marcadores astrocíticos y neuronales.	96
Figura 22. La inhibición neonatal de IIIG9 genera gliosis reactiva y desorganización de la citoarquitectura ventricular a los 7 días postnatal.	97
Figura 23. La línea de endimoma EP1NS disminuye su confluencia en condiciones de cultivo para generar esferoides.	103
Figura 24. La línea celular EP1NS expresa el ARNm de IIIG9.	105
Figura 25. IIIG9 no es localizado en la línea celular EP1NS mediante inmunocitoquímica.	106
Figura 26. IIIG9 no es detectado en la línea celular EP1NS.	107
Figura 27. Análisis inmunocitoquímico de IIIG9 en células HEK293AAV transfectadas con los vectores pAAV IIIG9s-Ires-GFP y pAAV IIIG9L-Ires-GFP.	110
Figura 28. El área de las células EP1NS que sobreexpresan IIIG9 presentan un incremento respecto al control.	111
Figura 29. Modelo de la localización espacio-temporal de IIIG9 durante el desarrollo embrionario y postnatal del neuroepitelio.	134

Figura 30. Estandarización de inmunoreactividad para IIIG9 en cortes de embrión E15. 136

Figura 31. Estrategia de clonamiento de las isoformas larga y corta de IIIG9 en vector de expresión pAAV-Ires-GFP a partir de vectores de pasaje TOPO-Blunt. 137

Figura 32. IIIG9 se localiza en la base del cilio primario en un modelo in vitro. 138



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Anticuerpos utilizados.	39
Tabla 2: Partidores utilizados para RT-PCR convencional	43
Tabla 3. Evaluación de características fenotípicas presentes en el epitelio del ventrículo lateral de rata de 7 días postnatal, sometida a inyección única.....	93



ABREVIATURAS

3V: Tercer ventrículo

3Vd: Tercer ventrículo dorsal

3Vv: Tercer ventrículo ventral

4V: Cuarto ventrículo

AAV: Virus adeno-asociado

ARNm: ARN mensajero

B1: Astrocitos tipo B1 subventriculares

BO: Bulbo olfatorio

BrdU: 5-bromo-2-desoxiuridina

BSA: Albúmina de Suero de Bovino

C11orf66: Marco de lectura abierto 66, del cromosoma 11 (chromosome 11, open Reading frame 66 en inglés)

cDNA: DNA copia

CE: Canal espinal

CEPC: Células epiteliales de los plexos coroideos

CK1: Proteína caseína 1

CP: Plexos coroideos

Cy2: Cianina 2

Cy3: Cianina 3

Cy5: Cianina 5

DIV: Días *in vitro*

DKFZ: Centro alemán de investigación oncológica

DMEM: Medio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco



DMSO: Dimetil-sulfóxido

dNTPs: Desoxinucleótidos trifostato

E: Estadío embrionario

E1: Ependimocitos multiciliados

E2: Ependimocitos biciliados

E3: Células monociliadas ventriculares

EDTA: Ácido Etilendiaminotetracético

EGF: Factor de crecimiento epidermal

EGFP: Proteína fluorescente verde (enhanced Green fluorescent protein en inglés)

Ep: Células ependimarias

FGF: Factor de crecimiento de fibroblastos

FOXJ1: Forkhead box protein 1 por sus siglas en inglés

GAPDH: Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa

GFAP: Proteína Ácida Fibrilar de la Glia

GLUT1: Transportador de glucosa tipo 1

HRP: Peroxidasa de rábano (horseradish peroxidase en inglés)

IF: Inmuno-fluorescencia

IgG: Inmunoglobulina G

IHQ: Inmuno-histoquímica

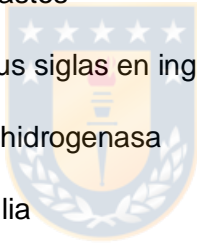
IIIG9L: Isoforma larga de IIIG9

IIIG9s: Isoforma corta de IIIG9

kDa: Kilodalton

LB: Medio Luria-Bertani

LCR: Líquido Cefalorraquídeo



LMD: Microdissección láser (laser microdissection en inglés)

LV: Ventrículo lateral

MCIDAS: *Multiciliate Differentiation and DNA Synthesis Associated Cell Cycle Protein*

NE: Neuroesfera

NSC: Células madre neurales (neural stem cell en inglés)

OMS: Organización mundial de la salud

pAAV: Plásmido para la generación de virus adenoasociado

Pb: Pares de bases

PBS: Tampón fosfato salino

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa

PFA: p-Formaldehído



PKA: Proteína quinasa A

PN: Días post-natal

PP1: Fosfatasa 1

PP2A: Fosfatasa 2A

PPP1R32: Subunidad regulatoria 32 de la fosfoproteína fosfatasa 1

PVDF: Fluoruro de polivinilideno

RT: Transcripción Reversa

SBF: Suero Bovino Fetal

SCO: Órgano subcomisural

Shh: Proteína *Sonic Hedgehog*

SIM: Microscopía de iluminación estructurada

SNC: Sistema Nervioso Central

SVCT2: Transportador de sodio/ácido L-ascórbico

TAE: Tampón Tris Acetato EDTA

TEM: Microscopía electrónica de transmisión

T_m: Temperatura de fusión

Tris: Tris(hidroximetil)amino-metano

T_α: Tanicitos alfa

T_{β1d}: Tanicitos β1 dorsales

T_{β1v}: Tanicitos β1 ventrales

VL: Ventrículo lateral

Wnt: Proteína Wnt (*Wingless-Int*)

ZO-1: Proteína *zonula occludens-1*

ZSV: Zona Subventricular

ZV: Zona Ventricular



RESUMEN

En el sistema nervioso central adulto, las paredes de los ventrículos cerebrales están cubiertas por células endimarias multiciliadas que se especifican a partir de la glía radial, durante los estadios E14-16 en ratón y se diferencian y polarizan durante la primera semana postnatal. IIIIG9 (también llamado PPP1R32) es una subunidad reguladora de la proteína fosfatasa 1, y posee una expresión restringida a los epitelios multiciliados. En esta tesis hemos estudiado la expresión y localización de IIIIG9 durante el período de especificación, diferenciación y polarización endimaria de la glía radial desde el estadio embrionario hasta adulto en cerebro de rata. Analizamos los efectos de la inhibición perinatal y adulta de IIIIG9 en ventrículos laterales. Adicionalmente utilizamos un modelo *in vitro* de endimoma derivado de la glía radial humana para estudiar la expresión y localización de IIIIG9, y los efectos de su expresión ectópica. IIIIG9 se expresa y localiza en la pared ventricular desde el estadio E13 hasta el adulto, con una localización celular periférica tipo zónula, adicional a su localización ciliar, con un aumento de los niveles citoplasmáticos en el período perinatal. La inhibición de IIIIG9 genera una denudación de la pared ventricular y una gliosis reactiva secundaria en estadio perinatal y adulto. Finalmente, el modelo *in vitro* de endimoma expresa el mensajero de IIIIG9, pero no es detectado a nivel de proteína. Una recuperación de función de IIIIG9 genera un aumento en el área de las células en cultivo. Este trabajo muestra que IIIIG9 participa en la regulación de la diferenciación, polarización de la glía radial a célula

ependimaria y la mantención del fenotipo ependimario mediante la regulación de las uniones célula-célula.



ABSTRACT

In adult central nervous system, the ventricular walls are lined by multiciliated ependymal cells, which specify from radial glial cells during embryonic E14-16 stages in mice, differentiating and polarizing during the first postnatal week. IIIG9 (also PPP1R32) is a protein phosphatase-1 regulatory subunit, and its expression is restricted to multiciliated epithelia. In this thesis we have studied IIIG9 expression and localization during specification, differentiation and polarization stages from radial glial progenitors to ependymal cells, from embryonic to adult stages in rat brain. We analyzed perinatal and adult IIIG9 inhibition effects on lateral ventricles. Additionally, we utilized an *in vitro* ependymoma cell model derived from human radial glia, to study IIIG9 expression and localization. Finally, we evaluated the effects of IIIG9 ectopic expression in this cell model. IIIG9 is expressed and localized in ventricular walls from E13 to adult, in which IIIG9 is located in zonula-like patterns, in addition to its ciliary localization. It's also highly expressed in perinatal stages through adulthood in ependymal cytoplasm. IIIG9 inhibition generates an ependymal denudation in lateral ventricles and reactive astrogliosis in perinatal and adult stages. Finally, IIIG9 mRNA is expressed in the ependymoma cell model, but it is not detected at protein levels. A IIIG9 function recovery increases cell area *in vitro*. This work demonstrates that IIIG9 participates in the regulation of the differentiation/polarization from radial glia to ependyma, and maintenance of ependymal phenotypes through regulation of cell-cell junctions.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Epitelio multiciliado en mamíferos adultos.

Las células multiciliadas son células epiteliales especializadas presentes en mamíferos adultos, que proyectan múltiples cilios móviles, y son requeridas en funciones respiratorias, cerebrales, reproductivas y renales (Spassky y Meunier, 2017). De manera adicional a cumplir funciones de barrera epitelial, decenas a cientos de cilios móviles son generados por cada célula multiciliada, que se mueven de manera coordinada y direccional, y permiten dirigir el movimiento del líquido cefalorraquídeo en el cerebro, mover mucus y patógenos en la tráquea, y el movimiento del oocito en el oviducto.

Estructuralmente, el cilio es un organelo microtubular formado por un axonema y originado a partir de un cuerpo basal, que se proyecta como una prolongación de membrana desde la superficie celular (Del Bigio, 2010). Los cilios son clasificados por las características de su axonema y su capacidad de generar movimiento. El axonema se compone de 9 pares de microtúbulos periféricos. Algunos cilios poseen un par de microtúbulos adicional en la parte central, de lo cual deriva la nomenclatura 9+2, si posee, o 9+0 si carece dicho par central.

En la mayoría de las células arrestadas del ciclo celular, es posible encontrar un único cilio primario inmóvil. Su estructura axonemal 9+0 carece del par de microtúbulos central. El cilio primario está involucrado en la detección de señales extracelulares, como Sonic hedgehog, (Shh), Wnt y el *sensing* del movimiento de fluidos (Guemez-Gamboa y col. 2014; Kotsis y col. 2013). El axonema presente en

los cilios de las células multiciliadas presenta una estructura 9+2, que corresponde a 9 pares de microtúbulos periféricos y un par de microtúbulos central. Los cilios característicos de las células multiciliadas protruyen de la zona apical y poseen un diámetro aproximado de 10 μm .

El cilio móvil difiere funcionalmente del cilio primario, en que su motilidad es posible dada ciertas diferencias estructurales en los componentes del axonema. La estructura microtubular de los cilios móviles 9+2 está formada por un complejo macromolecular de proteínas interconectadas, que consiste de rayos radiales (radial spokes), uniones de nexina, hojas centrales y brazos internos y externos de dineína (Ibañez-Tallón y col., 2003). El movimiento ciliar en las células multiciliadas depende de ciclos de fosforilaciones y desfosforilaciones continuas de los brazos de dineína, que se encuentran entre cada doblete exterior del axonema ciliar. En un determinado momento, los brazos de dineína, de un lado del eje del axonema, están activos para generar el movimiento en esa dirección, mientras que los demás brazos de dineínas se encuentran inactivos. Estas modificaciones dependen de las fosfatasa PP1, PP2A, y de las cinasas CK1 y PKA (Wirschell y col., 2011).

Múltiples proteínas ciliares han sido descritas, sin embargo, no se ha realizado una correcta diferenciación entre las proteínas efectoras, pertenecientes al cilio primario (presente en gran parte de las células arrestadas del ciclo celular), y las proteínas del cilio móvil (presente en las células multiciliadas). Mutaciones en los componentes de estos organelos resultan en un amplio y variado rango de patologías conocidas como ciliopatías. Recientemente se han realizado estudios enfocados en identificar el proteoma de las células multiciliadas (Patir y col. 2020;

Sim y col. 2019), sin embargo, dichos esfuerzos se han enfocado en identificar algunos candidatos sin abarcar a cabalidad estudios funcionales asociados. Por lo tanto, es relevante un mayor *screening* funcional de las proteínas efectoras involucradas en la diferenciación, maduración y funcionalidad del epitelio multiciliado.

1.2. Epitelio multiciliado en el sistema nervioso central: Las células endimarias

En humanos, y otros mamíferos, el sistema nervioso central posee células multiciliadas que corresponden a las células epiteliales presentes en los plexos coróideos (CEPC), las células endimarias de las cavidades ventriculares cerebrales y del canal espinal, permitiendo la generación y movimiento del líquido cefalorraquídeo (LCR) (Moreno, M.D. Doctoral Dissertation, 2016).

1.3. Células endimarias de las cavidades ventriculares del SNC adulto.

Las células endimarias forman un epitelio que recubre la pared de los ventrículos cerebrales y se encuentran en contacto directo con el líquido cefalorraquídeo (LCR) (Del Bigio, 2010). Poseen una morfología cuboidal, núcleo redondo, membranas que están interdigitadas con las células vecinas y presentan uniones adherentes y comunicantes tanto con otras células endimarias como con las células troncales neurales adultas presentes en la zona subventricular (Del Bigio 2010; Jimenez y col. 2014). En modelo murino, las células endimarias expresan

marcadores como CD24, S100 β , FoxJ1 y vimentina, y presentan una amplia superficie apical con aproximadamente 50 cilios largos, de alrededor a 10 μ m de longitud, con estructura 9+2 (Ohata y col. 2014; Spassky y col. 2005; Doetsch y col. 1997; Mirzadeh y col. 2008).

Las células endimarias poseen uniones adherentes y uniones comunicantes (Bouille y col. 1991), que favorecen la integridad del epitelio, y la coordinación del movimiento ciliar a través de las células endimarias. Adicionalmente las células endimarias expresan y localizan proteínas de uniones estrechas como ZO-1 y Ocludina, pero no Claudina-1 (Lippoldt y col. 2000) o Claudina-5 (Alvarez y col. 2007). Sin embargo, la inmunolocalización es más débil y discontinua para proteínas como ZO-1 (van Deurs y Koehler 1979, van Deurs 1980; Dermietzel, 1975; Langlet y col. 2013). Esta característica podría explicar la permeabilidad del epitelio endimario, con respecto a la barrera hematoencefálica: Al administrar diversas moléculas directamente al LCR, estas difunden desde la pared endimaria hacia el parénquima cerebral (Brighthman y Reese 1969; Jara y col. 2016). De esta forma, la pared endimaria funciona como una barrera permeable entre el LCR y el parénquima nervioso, lo cual permite la difusión paracelular de nutrientes desde el LCR y moléculas de desecho desde el parénquima nervioso.

Las células endimarias funcionan como una barrera física entre el LCR y el parénquima nervioso, y generan un flujo direccional activo de líquido cefalorraquídeo en la superficie ventricular, por el movimiento ciliar coordinado (Faubel y col. 2016; Siyahhan y col. 2014; Ibañez-Tallon y col. 2003).

Adicionalmente cumplen funciones neuroendocrinas, sensoriales y de homeostasis cerebral. Un estudio en modelo murino demostró que el flujo direccional del líquido cefalorraquídeo, propagado por el movimiento ciliar endimario, crea un gradiente quimiorrepelente de moléculas SLIT en dirección caudo-rostral que guían la migración parenquimal de nuevos neuroblastos hacia el bulbo olfatorio (Sawamoto y col. 2006).

La pared de los ventrículos laterales está compuesta principalmente de células endimarias multiciliadas y recubren la superficie del septum, el estriado y el cuerpo calloso. En la pared del estriado, la zona ventricular y la zona subventricular conforman el nicho neurogénico principal en el cerebro de mamíferos adultos (Mirzadeh y col. 2008; Lim y Buyla, 2016). En esta zona se generan nuevos neuroblastos que migran hacia el bulbo olfatorio para convertirse en interneuronas olfatorias funcionales. La organización detallada de esta pared en ratones se determinó mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM, del inglés Transmission Electron Microscopy), reconstrucciones tridimensionales y diversos marcadores moleculares (Doetsch y col. 1997; Mirzadeh y col. 2008). Dentro del nicho neurogénico se encuentran distintos tipos celulares: las células endimarias multiciliadas (E1), que componen la mayor proporción de la superficie epitelial, células endimarias biciliadas (E2) de estructura axonemal 9+2 y células uniciliadas o tipo B1, que se corresponden con las células troncales neurales adultas, que poseen un pequeño cilio primario 9+0 en contacto con el LCR (Mirzadeh y col. 2008). Las células B1 presentan características de astrocitos, como son la presencia de filamentos intermedios de GFAP y una expansión basal que

contacta con los vasos sanguíneos (Merkle y col. 2004). Las células B1 dan lugar a los precursores intermediarios (progenitores de amplificación transitoria) o células tipo C, que a su vez generan los neuroblastos o células tipo A. Los neuroblastos migran tangencialmente de 5 a 6 milímetros hasta llegar al BO, donde dan lugar a distintos tipos de interneuronas funcionales (Doetsch y col. 1997; Doetsch y col. 2002; Merkle y col. 2007). Estas poblaciones celulares se organizan a manera de molinillos o “pinwheels”, en los que las células E1 y ocasionalmente alguna E2, rodean a pequeñas agrupaciones de células B1 en el nicho neurogénico (Mirzadeh y col. 2008; Redmond y col. 2019) (Figura 1).

Hacia el tercer ventrículo, tres tipos de células ependimarias pueden ser identificadas: Las células E1 con aproximadamente 50 cilios móviles (Mirzadeh y col. 2008), las células E2 que presentan dos cilios móviles (Mirzadeh y col. 2008) y los tanicitos, que presentan un único cilio de estructura axonemal 9+0 y se encuentran hacia el área ventral del tercer ventrículo ventral (Bolborea y Dale, 2013; Mirzadeh y col. 2017). Se determinó que los tanicitos α poseen una estructura tipo E2, mientras que los tanicitos β poseen una estructura E3 (Mirzadeh y col. 2017).

El cuarto ventrículo tiene una morfología romboidal (Figura 2). Una gran proporción del epitelio de este ventrículo posee epéndimo multiciliado E1. Hacia la el área dorsal, conecta a la cavidad subaracnoídea. Hacia el área ventral se encuentra la línea media, la cual posee un epitelio pseudoestratificado compuesto por tanicitos E2 (Mirzadeh y col. 2017) que poseen uniones ocluyentes (Felten, 1981). Hacia el área caudal conecta con el canal central de la médula espinal.

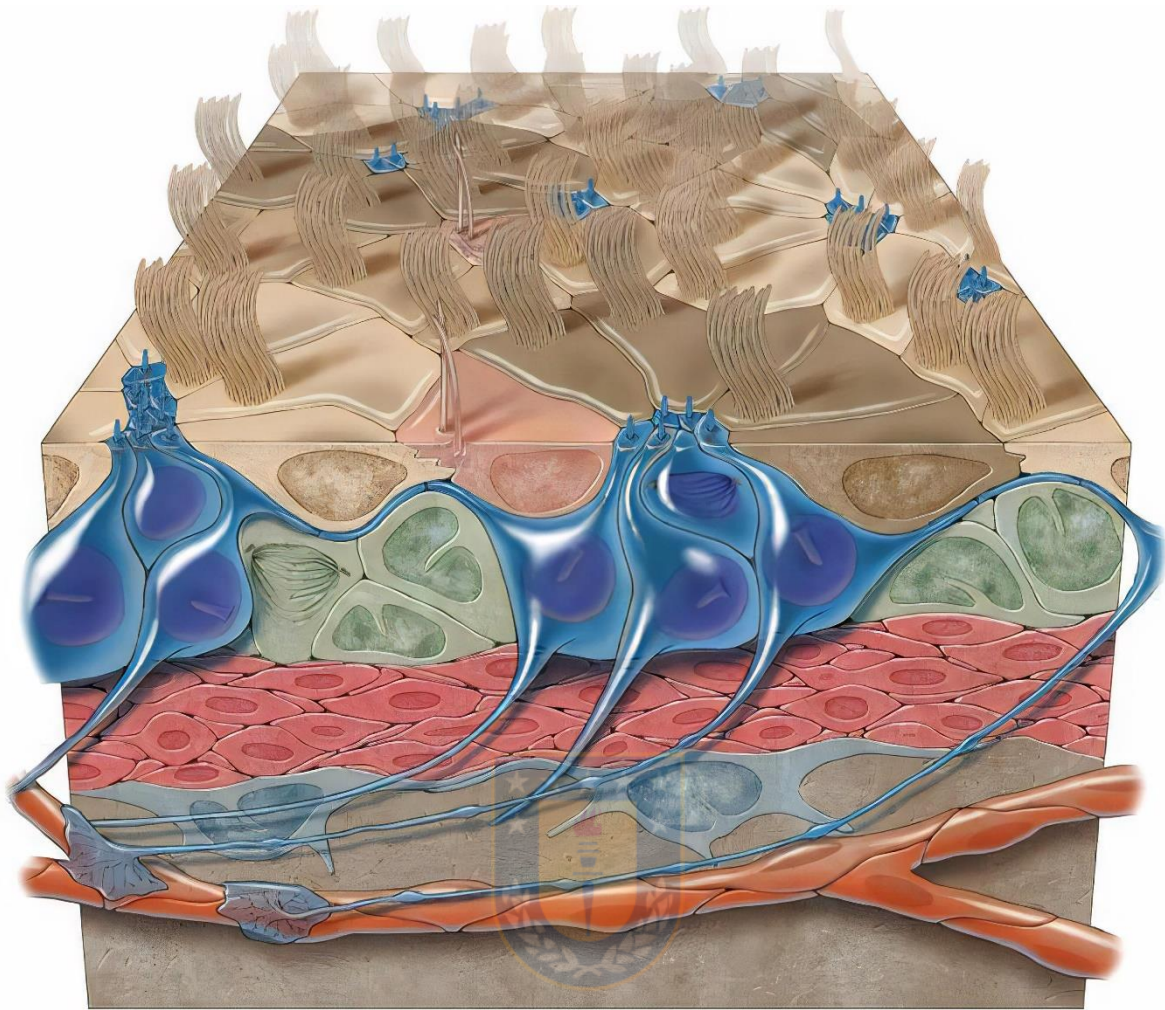


Figura 1. Modelo tridimensional del nicho neurogénico adulto en la pared estriatal de los ventriculares laterales en modelo murino. Esquema del nicho ventricular-subventricular que muestra las células B1 (azul), las células C (verde) y las células A (rojo), las células endimarias multiciliadas (E1) (café) y algunas células endimarias biciliadas (E2) (rosado). Las células B1 poseen un proceso basal largo que contacta con los vasos sanguíneos cercanos (naranja), y un proceso apical que interactúa con la superficie ventricular y presenta un único cilio primario (Mirzadeh y col. 2008).

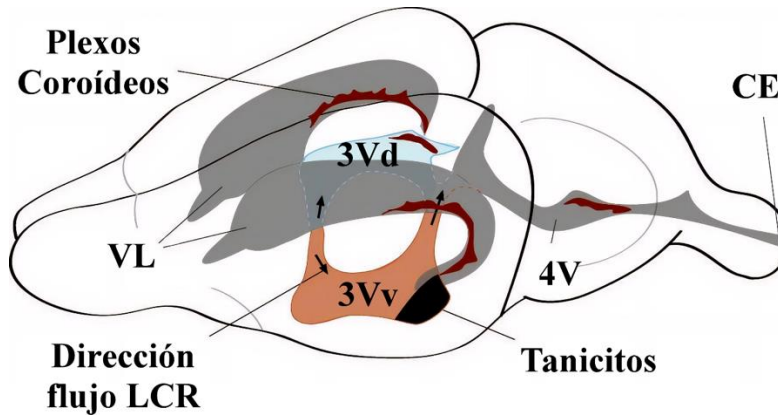


Figura 2. Localización de células multiciliadas en sistema nervioso central murino.

Gráfica que muestra los cuatro ventrículos cerebrales y el canal espinal donde circula el LCR. Los ventrículos laterales conectan con la parte medial del tercer. En dicho sitio de unión, el LCR puede fluir dorsal o ventral (dirección de las flechas). Hacia la zona caudal del ventrículo lateral, conecta con el cuarto ventrículo vía el acueducto de Silvio. En rojo oscuro se muestra la localización de los plexos coroideos. Gran parte del epitelio que recubre los ventrículos consiste en células endimarias (E1). La zona en negro hacia el tercer ventrículo ventral corresponde a tunicos α - y β . VL: ventrículos laterales; 3Vd: tercer ventrículo dorsal; 3Vv: tercer ventrículo ventral; 4V: cuarto ventrículo; CE: canal espinal. Adaptado de Eichele y col. 2020.

El canal espinal está constituido por un epitelio de células endimarias alargadas, astrocitos y neuronas (Kutna y col. 2014). La organización tipo “pinwheel” no se reproduce en este epitelio (Marichal y col. 2012), y su composición celular es más heterogénea. Las células endimarias del canal espinal se caracterizan en su mayoría por presentar de uno a cuatro cilios de estructura axonemal 9+2, siendo las células biciliadas alrededor del 70% de la composición del epitelio del canal espinal. Comparten la expresión de marcadores endimarios como CD24, S100B o Foxj1. Además, de las células endimarias, astrocitos y neuronas contactan con la cavidad ventricular (Alfaro-Cervello y col. 2012). En el canal espinal, las células endimarias conforman una población celular con capacidad proliferativa limitada (Meletis y col. 2008; Alfaro-Cervello y col. 2012) y en modelos de daño del cordón espinal, la contribución a la reparación es mínima (Ren y col. 2017).

Las células endimarias cumplen funciones físicas propias de un epitelio, mecánicas mediante el movimiento del LCR, en homeostasis del SNC y la mantención del nicho neurogénico (Kuo y col. 2006; Paez-Gonzalez y col. 2011). Aun cuando presenta funciones críticas, las células endimarias multiciliadas son postmitóticas, se generan sólo una vez durante el desarrollo embrionario y postnatal (Spassky y col. 2005; Spassky y col. 2017), y su reparación durante el envejecimiento es mínimo (Luo y col. 2008). Un mayor entendimiento sobre la génesis del epitelio endimario durante el desarrollo permitirá generar estrategias clínicas dirigidas al mantenimiento y la reparación de este epitelio multiciliado.

1.4. Células endoteliales en los plexos coroideos

Las células endoteliales de los plexos coroideos (CEPC) forman una barrera entre el LCR y el torrente sanguíneo, y están localizadas en las cavidades ventriculares del cerebro (Figura 2). Encapsulan vasos sanguíneos y secretan LCR como un ultrafiltrado del plasma sanguíneo junto a la producción específica de componentes por estas células (Ej. Transtiretina). Estas células muestran una marcada polaridad apico-basal: la superficie apical de estas células de los plexos coroideos poseen gran cantidad de microvellosidades en la zona apical para aumentar su área y promover su actividad secretoria continua. Cotransportadores de $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPasa}$ y $\text{Na}^+\text{K}^+\text{2Cl}^-$ y numerosos canales de K^+ y Cl^- , importantes para la regulación iónica del LCR, están localizados exclusivamente en la superficie apical (Kratzer y col. 2020; Lun y col. 2015). Otros transportadores como GLUT1 o SVCT2 se encuentran localizados en la superficie basolateral (Ulloa y col. 2019). Debido a que las células endoteliales de los plexos coroideos (CEPC) derivan del neuroepitelio dorsal y forman una monocapa continua con el epéndimo, son llamadas células endoteliales coroidales. Sin embargo, las CEPC y el epéndimo son distintos en variados aspectos, como es el caso de los cilios presentes en ambos tipos celulares. Las CEPC forman de 10 a 20 cilios 9+0 inmóviles en el estadio adulto. (Narita y col. 2010). La ciliogénesis en las CEPC comienza luego de la organogénesis, posterior al estadio E11 en ratón. (Nonami y col. 2013). Estos cilios presentan una motilidad transiente alrededor del período perinatal, con una baja frecuencia en el movimiento, y orientación aleatoria, lo que supone una estructura poco favorable para generar un flujo direccional de LCR. Su motilidad

declina posterior al nacimiento y se considera inmóvil en el estadio adulto (Narita y col. 2012).

El LCR está compuesto de cientos de moléculas como nutrientes, moléculas de señalización, microARN y exosomas (Sawamoto y col. 2006; Chiasserini y col. 2014; Zhang y col. 2015). Junto con fuerzas mecánicas de generación de flujo, estas moléculas modulan el desarrollo y homeostasis del sistema nervioso central (Lun y col. 2015). El pulso inicial del flujo de LCR está dado por pulsaciones arteriales más que por el movimiento ciliar. El LCR circulante que se origina de los plexos coroideos fluye a través de las paredes de los ventrículos laterales en dirección hacia el tercer ventrículo, previo a descender hacia el cuarto ventrículo y el canal central de la médula espinal (Figura 2). El LCR luego es reabsorbido en el espacio subaracnoideo hacia el sistema circulatorio y linfático. La integridad de la barrera coroidal se mantiene mediante la presencia de uniones estrechas, detalladas por crioinmunomicroscopía en plexos de rata (Van Deurs y Koehler, 1979). Los plexos coroideos presentan marcaje para distintas isoformas de cadherina (anti-Pan-Caderina, así como marcaje para α y β -catenina de manera similar a la pared endimaria de los ventrículos laterales, sin embargo, el inmunomarcaje es mayor en las CEPC para los marcadores de uniones ocluyentes ZO-1 y Ocludina (Lippoldt y col. 2000); a diferencia de los plexos coroideos donde es requerida la formación de uniones ocluyentes, el epitelio endimario de los ventrículos laterales es permeable debido a la ausencia de uniones estrechas funcionales (Brightman y Reese, 1969; Rodriguez y Bouchaud, 1996; Jimenez y col. 2014). Un modelo de ratón knock-out para las cadherinas Celsr2 y Celsr3, involucradas en la polarización

epitelial, afecta la formación de los cilios de las células endoteliales. Sin embargo, utilizando inmunomarcaje para tubulina acetilada se demostró que las CEPC desarrollan un cilio normal comparable a los animales control (Tissir y col. 2010). Estos estudios sugieren que los mecanismos de diferenciación de las células endoteliales y las CEPC podrían generarse de eventos transcripcionalmente no relacionados.

Las células endoteliales cumplen funciones propias de un epitelio, mecánicas y homeostáticas. Aun cuando presenta funciones críticas, las células endoteliales multiciliadas son postmitóticas, se generan sólo una vez durante el desarrollo embrionario y postnatal (Spassky y col. 2005; Spassky y col. 2017), y su reparación durante el envejecimiento es mínimo (Luo y col. 2008). Un mayor entendimiento sobre las proteínas efectoras involucradas en el establecimiento del epitelio endotelial durante el desarrollo podrá entregar herramientas para generar estrategias clínicas dirigidas al mantenimiento y la reparación de este epitelio multiciliado. Uno de estos factores es IIIIG9, que ha sido de interés reciente en nuestro laboratorio.

1.5. Proteína ciliar IIIIG9, interacción con PP1 y su relación funcional con la diferenciación endotelial.

El gen PPP1R32 codifica a la subunidad reguladora 32 de la proteína fosfatasa 1 (PP1) también llamada IIIIG9, ppp1r32, C11orf66 o FLJ32771 y se encuentra conservado en múltiples especies como Homo sapiens, Rattus norvegicus, Mus musculus, Bos taurus, Xenopus tropicalis y Danio rerio, entre otros.

El gen de IIG9 genera dos transcritos en humano y rata, y en esta última especie dan origen a una isoforma larga (IIG9L) de 425 aminoácidos (GenBank: AAH81718.1) y una isoforma corta (IIG9S) 381 aminoácidos (GenBank: AAK56500.1).

En el año 2002 se reportó por primera vez un estudio sobre la localización del ARN mensajero de IIG9 (Danielson y col. 2002). Mediante análisis de Northern Blot, realizados en muestras de tejidos periféricos como hipófisis, hígado, corazón, glándula adrenal, bazo, pulmón, timo, ovario y testículo, se demostró que solo en los dos últimos tejidos se detecta el ARNm de IIG9 (Danielson y col. 2002). Danielson y colaboradores también realizaron un análisis de hibridación in situ en cortes coronales de rata adulta, mostrando que la expresión del ARN mensajero de IIG9 se localiza principalmente en las células endimarias que recubre los cuatro ventrículos de rata adulta. En conjunto estos resultados muestran que la expresión de IIG9 se asocia a epitelios multiciliados de rata adulta.

De acuerdo a la información disponible en la base de datos “The Human Protein Atlas” (<https://www.proteinatlas.org>; Uhlen y col. 2015), IIG9 se localiza en el epitelio multiciliado de tráquea y oviducto humano, y en testículo. Posee una localización principalmente ciliar en estos epitelios, y no es inmunodetectado en otros epitelios (Ivliev y col. 2012; Uhlen y col. 2015). El anticuerpo comercial (HPA039068) utilizado en el programa “Human Protein Atlas” está dirigido a humano, y hasta la fecha no existe un anticuerpo comercial dirigido contra IIG9 de modelos murinos. Recientemente nuestro laboratorio en colaboración con el Doctor Manuel Cifuentes, académico e investigador de la Universidad de Málaga, hemos

generado un anticuerpo de conejo para la detección de IIG9 de rata. Posteriormente hemos publicado una caracterización de la localización de IIG9 en epitelio multiciliado, con énfasis la pared ventricular de rata adulta y durante el desarrollo (Cifuentes y col. 2017). IIG9 es localizado en epitelio multiciliado de tráquea y epéndimo, así como también en testículo. En el sistema nervioso central de rata adulta, IIG9 se localiza en el epitelio endimario de los cuatro ventrículos cerebrales de rata. Su localización subcelular se encuentra preferentemente en el axonema ciliar endimario, visto por microscopía de superresolución y análisis de inmunohistoquímica ultraestructural, sugiriendo que la localización de IIG9 podría tener una relación con el movimiento ciliar en el epitelio endimario maduro. Durante el desarrollo postnatal, IIG9 se localiza restringido a los cilios y la cara apical de la pared endimaria en proceso de maduración en los estadios P10 y P20. De manera interesante, observamos también que IIG9 se localiza en la zona ventricular y subventricular en el estadio embrionario de 17 días. Además, presenta un inmunomarcaje intenso hacia la zona apical del epitelio ventricular que contacta con el LCR (Cifuentes y col. 2017). En el estadio E17 no se encuentran células endimarias multiciliadas en el epitelio ventricular, sino que su precursor, las células de la glía radial, células que son consideradas las células troncales neurales en el estadio embrionario (Kyrousi y col. 2017). La marcada localización apical en células precursoras desafía el patrón de localización visto en el estadio adulto, donde IIG9 está presente en células multiciliadas diferenciadas, lo cual genera la interrogante acerca de si IIG9 estaría involucrado funcionalmente durante el proceso de especificación y diferenciación desde las células precursoras de la glía radial hacia un epitelio endimario multiciliado.

Análisis *in silico* de secuencias de proteínas mostraron que IIG9 posee un motivo estructural de anclaje a proteína fosfatasa 1 (PP1) denominado RVXF que promueve las interacciones de PP1 con sus subunidades regulatorias (Hendrickx y col., 2009; Fardilha y col., 2011). En la proteína IIG9, este motivo corresponde a la secuencia KVHF presente entre los aminoácidos 129 y 133 en la isoforma larga de rata y también se encuentra presente en la isoforma corta. La interacción de IIG9 con este dominio ha sido confirmada mediante análisis de coimmunoprecipitación de proteínas, ensayos de doble híbrido y ensayos funcionales en los cuales se observó que no contribuye a la inhibición de la actividad de PP1 (Hendrickx y col. 2009; Fardilha y col., 2011).

PP1 es una fosfatasa de serina/treonina, conservada y ubicua, que cataliza un tercio de todas las desfosforilaciones de proteínas en células eucariontes. Tres genes diferentes codifican tres isoformas de PP1 (α , β , γ), siendo las dos primeras ubicuas, y cada una de las cuales forma parte de un complejo de cientos de otras proteínas que actúan como subunidades regulatorias, las cuales poseen un motivo de anclaje corto y degenerado llamado RVXF (Hendrickx y col., 2009). Así como IIG9, se han descrito diversos interactores de PP1 que poseen en común motivos de anclaje a esta fosfatasa, siendo RvXF el más importante, al igual que otros motivos como AnkCap que también contribuyen a la especificidad, uniéndose a motivos de repeticiones de ankirina presentes en otras proteínas (Heroes y col. 2013). PP1 participa en funciones clave para la célula, como mitosis, meiosis, transcripción, apoptosis, división celular, proliferación, oncogénesis (Virshup y Shenolikar, 2009), y también permite el movimiento ciliar, mediante la acción de

desfosforilación de los brazos de dineína axonemal en el cilio de las células multiciliadas (Wirschell y col., 2011). La localización, especificidad y actividad de esta fosfatasa depende de la formación de complejos oligoméricos con estas proteínas interactoras de PP1 (Korrodí-Gregorio y col. 2014).

Existe especial interés en estudiar las proteínas regulatorias de PP1 y la participación de estos complejos oligoméricos en la regulación de diversos eventos celulares como la proliferación celular, la mantención de las uniones celulares y la transformación neoplásica, entre otras. Estudios de la inhibición farmacológica de PP1 *in vitro* utilizando ácido okadaico muestran un desensamblaje de las uniones célula - célula en menos de una hora, siendo esta disrupción atribuida a un incremento de la fosforilación de β -catenina (Serres y col. 1997). Aun cuando, está demostrado que PP1 participa de forma activa en la regulación de las uniones celulares *in vitro*, falta mucho por estudiar acerca de esta función *in vivo* (Bertocchi y col. 2012; McCole, 2013; Rao y col. 2009). En *Drosophila* se ha reportado la existencia de un interactor de fosfatasa conocido como Sds22 (también llamado PPP1R7). Una mutación en esta proteína causa una pérdida de la polarización apico-basal y la adquisición de morfología cuboidal en el epitelio de los discos imaginales de las alas (Grusche y col. 2009). Además, la falta de sds22 provoca una pérdida de la organización epitelial y promueve la invasividad celular y tumorigénesis (Jiang y col. 2009). Estos resultados apuntan a la participación de PP1 en la mantención de las uniones célula-célula y la polarización apico-basal mediada por una subunidad regulatoria de PP1. Sin embargo, la relación entre las

proteínas reguladoras, PP1 y las uniones adherentes sigue pobremente descrita en mamíferos.

En conjunto, estos resultados acerca de la localización de IIIG9 en células multiciliadas preferentemente axonemal y su interacción con la fosfatasa PP1 sugiere que dicha interacción podría funcionar como un regulador de su actividad o de su correcto anclaje en el axonema, participando en el movimiento ciliar (Cifuentes y col. 2017). Adicional a esta hipótesis de la función de IIIG9 en epéndimo adulto, surge la pregunta acerca del posible rol de IIIG9 durante el desarrollo embrionario y postnatal de las paredes ventriculares previo a la formación del epéndimo. La localización apical hacia el ventrículo durante este proceso en E17 (Cifuentes y col. 2017) podría indicar que IIIG9 podría cumplir un rol no descrito en la membrana apical, o en la formación y mantención de las uniones célula-célula durante el período de transición de glía radial a célula endimaria.

1.6. De Glía Radial a Célula Ependimaria: especificación, diferenciación y polarización durante el desarrollo.

Durante el desarrollo embrionario del sistema nervioso central, las células progenitoras neurales embrionarias que corresponden a las células de la glía radial ubicadas hacia la zona ventricular y subventricular, se dividen asimétricamente para producir neuronas, astrocitos, oligodendrocitos y células endimarias (Haubens y col. 2004; Malatesta y col. 2000, 2003; Merkle y col. 2004; Noctor y col. 2004, 2007; Spassky y col. 2005).

La glía radial está altamente polarizada, extendiendo un proceso apical en contacto con la zona ventricular (Figura 3), además de un largo proceso basal que guía a las neuronas en migración (periodo neurogénico) que está en contacto con la superficie pial o de vasos sanguíneos cercanos (Kriegstein y col. 2009). El proceso apical se une a la glía radial adyacente vía uniones adherentes basadas en cadherinas. Durante el período gliogénico (E16-P15) algunas células de la glía radial pierden las uniones adherentes y su contacto apical para transformarse en astrocitos. Otras células radiales retraen su proceso basal manteniendo sus uniones adherentes para diferenciarse en células endoteliales (Rasin y col. 2007).

Experimentos de marcaje con BrdU en modelo murino han demostrado que las células de la glía radial se especifican a un linaje endotelial entre los estadios E14-E16. Durante este período la glía radial que adquiere un compromiso endotelial deja de dividirse y mantiene sus características morfológicas hasta el nacimiento (Spassky y col. 2005). Este período se ve marcado por la disminución de los niveles de Notch, con la consecuente activación de los cofactores GEMC1 y MCIDAS, los cofactores de transcripción específicos para la diferenciación multiciliada río arriba que se han descrito en este proceso (Lewis y Stracker 2021; Kyrousi y col. 2017) (Figura 4). Uno de los pasos iniciales para la diferenciación de la glía radial especificada a epéndimo requiere de la formación de múltiples cuerpos basales que darán origen a los cilios endoteliales. Este proceso es regulado por el factor de transcripción maestro FOXJ1, el cual comienza su expresión entre los

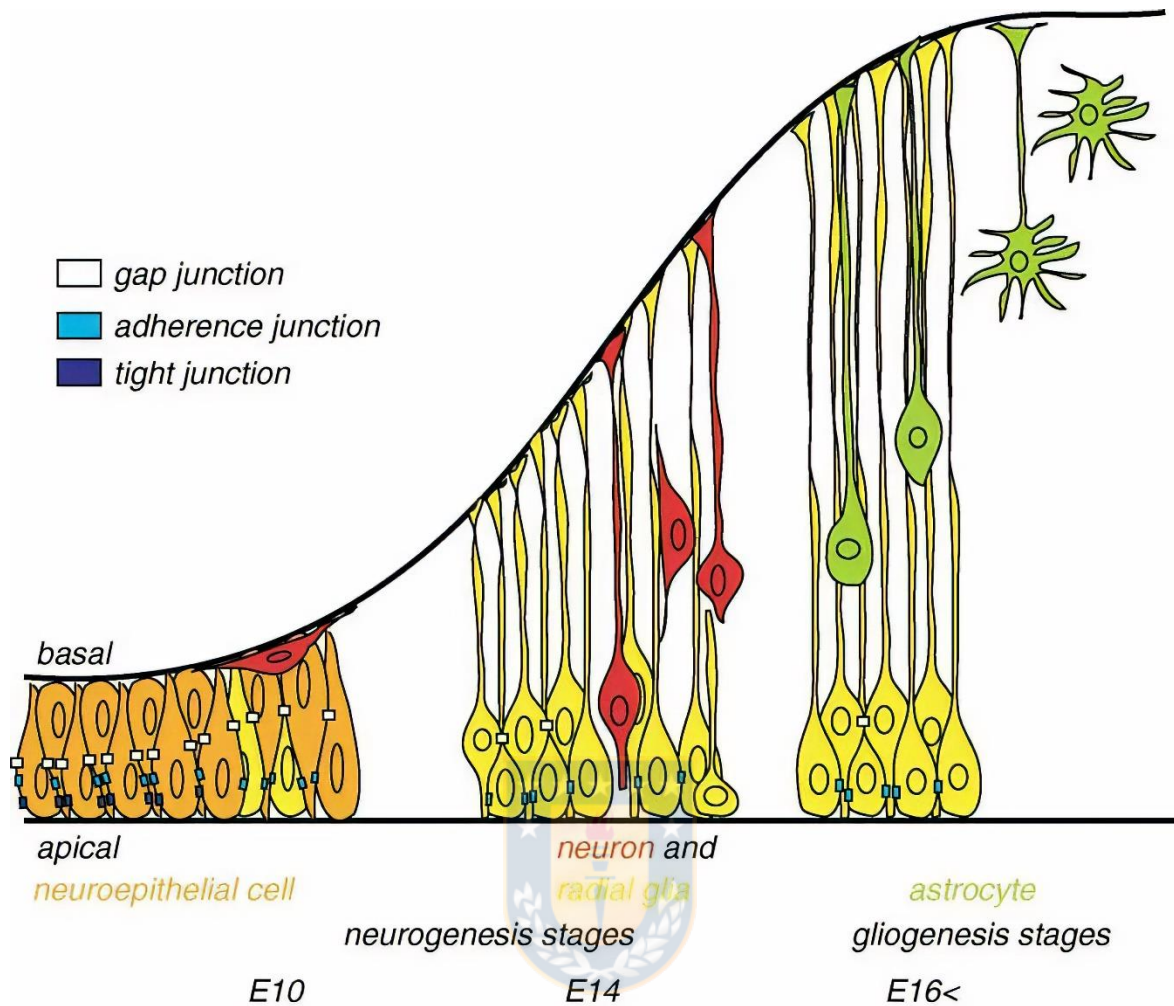


Figura 3. Representación esquemática del desarrollo de la corteza cerebral embrionaria. En los estadios tempranos (>E11), todos los precursores corresponden a las células neuroepiteliales (naranja). Las células de la glía radial aparecen alrededor del inicio de la neurogénesis. Las neuronas se muestran en rojo. En este estadio, las uniones estrechas (azul oscuro) dan paso a uniones adherentes (azul claro). La glía radial genera neuronas que migran hacia la corteza en dirección de los procesos basales de la glía radial. En el estadio E14, un subgrupo de glías radiales adquiere un compromiso endimario, sin perder características morfológicas de glía radial. En el estadio gliogénico, la glía radial comienza a generar astrocitos (Mori, Buffo y Götz, 2005).

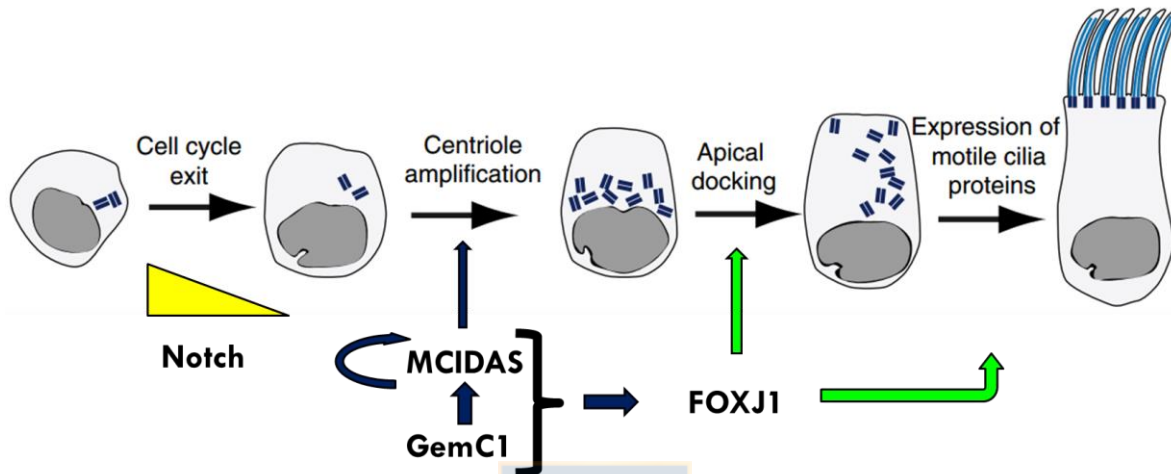


Figura 4. Representación esquemática del proceso de especificación de las células ependimarias. Durante la embriogénesis, disminuyen los niveles de Notch en las células de la glía radial a medida que salen del ciclo celular. Esto permite la activación del cofactor de transcripción GEMC1, el cual activa la expresión del cofactor MCIDAS. La expresión de MCIDAS funciona como un complejo de transcripción que permite su autoexpresión, la amplificación de centriolos y la expresión de FOXJ1. FOXJ1 es un factor de transcripción maestro en la activación de la ciliogénesis móvil, permitiendo el anclaje apical de los centriolos y la expresión de múltiples proteínas efectoras. (Modificado de Boon y col. 2014; Kyrousi y col. 2017).

estadios E15,5 y E18,5 en las paredes ventriculares (Jacquet y col. 2011). Al final de la embriogénesis, FoxJ1 es expresado en una subpoblación de glía radial (BLBP+) que también expresa el marcador endimario S100 β (Jacquet y col. 2009) y que durante el desarrollo postnatal dará lugar a las células endimarias. La diferenciación endimaria es iniciada luego del nacimiento, y está asociada a una activación metabólica mediada por la sobreexpresión del transportador de glucosa GLUT1 (Nualart y col. 1999; Silva-Álvarez y col. 2005). Durante su diferenciación, la glía radial retrae su proceso basal y se polariza hacia la zona ventricular, adquiere una morfología cuboidal y se generan múltiples centriolos. Estos centriolos migran hacia la cara apical, se convierten en cuerpos basales y permiten la generación de los múltiples cilios móviles. Un estudio detallado de la superficie ventricular determinó que las células B1 (VCAM1+) y las E1 (FOXJ1+) son totalmente distinguibles hacia el estadio P5 en modelo murino (Redmond y col. 2019). También se demostró que una misma célula de la glía radial puede generar células B1 y/o E1 dependiendo del tipo de división, si es simétrica o asimétrica (Ortiz -Álvarez y col. 2019).

Diversos interactores participan durante el proceso de especificación hasta la maduración del epitelio multiciliado. Se ha reportado que la especialización de las uniones adherentes en el epitelio endimario está regulado por la proteína Ankirina-3 durante la diferenciación. Esta proteína adaptadora está altamente expresada en los progenitores especificados a célula endimaria (E1) pero no en las células troncales neurales (destinadas a B1), participando en el mantenimiento de la citoarquitectura del nicho neurogénico desde el estadio embrionario (Paez-

Gonzalez y col. 2011). Otra proteína propuesta en la regulación de la maduración de la glía radial a epéndimo corresponde a Six3 que se encuentra presente en los estadios postnatales. Una delección de este gen resulta en la generación de células “tipo” endimarias, que presenta rasgos de diferenciación como la expresión de S100B y la generación de múltiples cuerpos basales, pero mantiene la expresión de marcadores de glía radial como GLAST y BLBP (Lavado y Olivier. 2011).

Estos reportes muestran la compleja relación temporal de las distintas proteínas que regulan la diferenciación y maduración endimaria. Aún cuando se comienzan a dilucidar los distintos factores de transcripción involucrados en la especificación, diferenciación y polarización endimaria, como por ejemplo Foxj1, GEMC1 y MCIDAS (Lewis y Stracker 2021; Kyrousi y col. 2017), todavía queda por determinar la función que cumplen muchas de las proteínas efectoras reguladas por estos factores de transcripción. En la búsqueda de nuevos efectores asociados, postulamos que IIG9 podría ser un factor relevante durante el proceso de especificación, diferenciación y polarización endimario, con una función pleiotrópica adicional a su función en el cilio móvil del epéndimo adulto.

1.7. Fisiopatología asociada al epitelio endimario.

Mutaciones genéticas de proteínas requeridas para el desarrollo de las células multiciliadas, o necesarias para el movimiento ciliar resultan en ciliopatías que generalmente son sistémicas. La disquinesia ciliar primaria es causada en la mayoría de los casos por mutaciones en los brazos internos y externos de dineína axonemal y como consecuencia generan un cilio inmóvil o con movimiento ciliar

desorganizado (Knowles y col. 2013). Los pacientes presentan menor fertilidad, presentan mayor riesgo de embarazos ectópicos, así como mayor tasa de infecciones respiratorias y mayor riesgo de síntomas asociados a la dilatación de los ventrículos cerebrales, así como también problemas al corazón y *situs inversus* en el 50% de los pacientes (Knowles y col 2013; Braun y Hildebrandt. 2017).

En el cerebro, las disfunciones ciliares causan una acumulación progresiva de LCR en los ventrículos cerebrales que incrementa la presión intracraneal y eventualmente se genera dilatación ventricular (Jimenez y col. 2014; Di Curzio y col. 2018). La hidrocefalia, terminología médica para designar esta dilatación, causa defectos cerebrales que afectan la locomoción y generan anomalías neuropsicológicas profundas. En el corto y largo plazo, también afecta la neurogénesis alterando la citoarquitectura y función de la zona subventricular (Campos Ordoñez y col. 2014; Sawamoto y col. 2006).

Mutaciones reportadas recientemente en los genes MCIDAS y CCNO, genes que regulan el inicio de la amplificación de centriolos, han sido descubiertos en un grupo de pacientes con disquinesia ciliar primaria (Boon y col. 2014; Wallmeier y col. 2014). Estas mutaciones resultan en una disminución abrupta o una falta de cilios móviles, condición médica nombrada como aplasia ciliar o “RGMC” (del inglés *reduced generation of multiple motile cilia*). Los pacientes que la padecen presentan los mismos síntomas que los pacientes con disquinesia ciliar primaria (Boon y col. 2014). Se ha despertado interés clínico en la complejidad del epitelio multiciliado como resultado de los avances en la reproducción médica asistida, la investigación acerca del metabolismo de drogas a nivel pulmonar, y el potencial terapéutico de la

entrega de drogas en el sistema nervioso central a través del líquido cefalorraquídeo.

1.8. Ependimoma humano y su relación con IIG9.

En el contexto fisiopatológico humano, la glía radial humana puede generar un tipo de tumores conocidos como ependimomas. Los ependimomas presentan características ultraestructurales, inmunohistoquímicas, moleculares y genéticas similares a la glía radial (Taylor y col. 2005). Los tumores ependimarios o ependimomas constituyen el tercer tipo de tumor cerebral más común en niños, después de los astrocitomas y de los tumores de tipo embrionarios (Guan y col. 2011). La organización mundial de la salud (OMS) ha desarrollado una clasificación en subgrupos de tumores ependimarios de acuerdo al grado de malignidad, siendo el grado I (subependimomas y ependimoma mixopapilar) los menos agresivos, grado II (ependimoma) medianamente agresivos y grado III (ependimoma anaplásico) cuyo comportamiento clínico es de mayor malignidad y de difícil tratamiento (Godfrain y col. 2009). Se ha reportado que ependimomas de diferentes zonas ventriculares poseen patrones de expresión génica similares a la expresión en la glía radial en dichas zonas del cerebro; adicionalmente, las células cancerígenas aisladas de estos ependimomas presentan un fenotipo de glía radial. Los ependimomas intracraneales malignos (grado III) también llamados ependimomas anaplásicos supratentoriales, crecen como tumores en los ventrículos laterales o en la zona subventricular. Estos presentan una alta tasa de proliferación y se acompañan de un aumento en la microvasculatura y la necrosis.

La tumorigenicidad de este tumor está dado por la alta presencia de células madres cancerosas que expresan marcadores como nestina, CD15, CD44, CD271, CXCR4, CD133, vimentina, VEGF and GFAP (Taylor y col. 2005; Milde y col. 2012). En el cerebro humano adulto persisten algunas células con características de glía radial en la zona subventricular-ventricular; por lo tanto, la transformación tumorigénica es posible (Merkle y col. 2004; Barry y col. 2005). Estos antecedentes han postulado que distintos grupos de endimomas son generados a partir de diferentes subpoblaciones de células progenitoras en el tejido ventricular donde se originan (Taylor y col. 2005).

Estudios genéticos muestran que dentro de los endimomas anaplásicos supratentoriales (grado III o endimomas altamente agresivos y malignos), existe un subgrupo de endimoma supratentorial, altamente metastásico conocido como “Rela-Fusión”, el cual presenta deleciones y rearrreglos aberrantes denominado cromotripsis, en el brazo largo del cromosoma 11, entre los segmentos 11q12.1 a 11q13.3 (Parker y col. 2014). En humano, IIIIG9 está presente en el locus 11q12.2 (Taylor y col. 2006), por lo que se ubica dentro de dicha área de rearrreglos patológicos. Esto genera la interrogante, si el locus de IIIIG9 estaría afectado por los eventos de cromotripsis; se desconoce si la línea celular expresa o localiza IIIIG9 en este tipo de endimomas. Es posible que una desregulación de IIIIG9 en las células troncales neurales de pacientes infantes y adultos, podría estar asociada a este tipo de endimoma “Rela-Fusión”, y participar en su aparición o la malignidad.

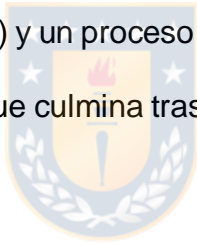
Para el correcto estudio de los tumores endimarios es importante el enfoque hacia los elementos moleculares que sean relevantes para la mantención

o diferenciación de sus células progenitoras, más que en las formas histológicas o clínicas de la patología. A diferencia de otras patologías donde se cuenta con una amplia gama de líneas celulares y modelos animales que emulan el desarrollo de estas patologías, el estudio de ependimomas se ha visto retrasado debido a la falta de modelos apropiados, *in vitro* e *in vivo*. Se ha caracterizado la línea celular DKFZ-EP1NS, proveniente de un ependimoma anaplásico supratentorial de grado III, la cual es altamente tumorigénica, crece en suspensión y recapitula la formación de tumores primarios *in vivo*, en modelos de xeno-transplantes (Milde y col. 2011; Ramsawhook y col. 2017). Además, esta línea celular puede diferenciarse a neuronas *in vitro* ante el tratamiento con Vorinostat (inhibidor del complejo de deacetilasas de histonas), disminuyendo su potencial metastásico (Milde y col. 2011), convirtiéndola en una de las primeras líneas celulares para el estudio de esta patología.

La posible ausencia de IIIIG9 puede ser un factor clave para cooperar en el fenotipo de crecimiento en suspensión, y de su alta tumorigenicidad celular; además, la línea celular EP1NS presente en nuestro laboratorio, constituye un modelo novedoso para el estudio de las propiedades tumorales ante la ganancia de función de IIIIG9 *in vitro*.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En el sistema nervioso central de los mamíferos es posible encontrar células multiciliadas hacia las cavidades ventriculares. Estas son nombradas células endimarias, recubren los ventrículos cerebrales y cumplen funciones regulatorias y mecánicas, ayudando al flujo de LCR mediante el movimiento de sus múltiples cilios ubicados en su cara apical. Estas células nacen a partir de la glía radial, y son consideradas post-mitóticas, es decir, no proliferan bajo condiciones fisiológicas. La transformación desde glía radial a célula endimaria comprende un proceso de especificación hacia el estadio E13-15, un proceso de diferenciación (expresión de marcadores de célula endimaria) y un proceso de maduración con la consecuente polarización y aparición de cilios que culmina tras las primeras dos semanas de vida post-natal.



La compleja estructura ciliar está compuesta de múltiples proteínas. La secuenciación masiva ha permitido identificar cientos de estas proteínas asociadas a este organelo. Un gran número de estas proteínas ciliares ya han sido estudiadas y caracterizadas, sin embargo, quedan por estudiar en detalle muchas más para avanzar en el entendimiento de la estructura y función del cilio, y para comprender de mejor manera una serie de patologías, asociadas a disfunción ciliar, denominadas ciliopatías. En el contexto fisiopatológico humano, la glía radial humana puede generar un tipo de tumores conocidos como endimomas. Los endimomas presentan características ultraestructurales, inmunohistoquímicas, moleculares y genéticas similares al de la glía radial.

Nuestro laboratorio ha descrito recientemente la localización de una nueva proteína llamada IIIG9, la cual se localiza en los epitelios multiciliados de rata adulta. En SNC, IIIG9 se localiza principalmente hacia los cilios de las células endimarias que recubren las cavidades ventriculares. La glía radial de rata, considerada la célula troncal neural embrionaria, carece de múltiples cilios, y expresa y localiza IIIG9 durante el estadio E17 hacia el borde apical. Esto nos permite hipotetizar acerca de la alguna función adicional en los progenitores comprometidos a célula endimaria. Además, aún queda por dilucidar si la glía radial humana también expresa y localiza IIIG9 en estadios previos durante el cual la glía radial adquiere un compromiso hacia célula endimaria (E14), así como los efectos de su ausencia en el epitelio endimario en proceso de diferenciación y adulto.

En esta tesis evaluamos la expresión y función de IIIG9 durante el período de especificación, diferenciación y polarización de las células endimarias de rata, los efectos de la inhibición neonatal de IIIG9 en el inicio de la diferenciación endimaria, y el efecto de la inhibición de IIIG9 en la mantención de la polarización del epitelio endimario adulto. También evaluamos la expresión y localización de IIIG9 en un modelo *in vitro* de endimoma EP1NS, que deriva de la glía radial humana, y los efectos de la expresión de IIIG9 de rata en esta línea celular de endimoma.

HIPÓTESIS

“La expresión de IIIG9 es necesaria para la integridad del tejido epitelial endimario durante el desarrollo y la vida adulta”

OBJETIVO GENERAL

“Analizar la expresión espacio-temporal y la ganancia y pérdida de función de la proteína IIIG9 durante la diferenciación y polarización endimaria normal y en la transformación neoplásica”.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Definir la localización de IIIG9 en epitelio ventricular de rata adulta, y evaluar el efecto de la pérdida de función de IIIG9 en la polarización de la pared endimaria adulta.
2. Caracterizar el patrón de expresión de IIIG9 durante el periodo de especificación, diferenciación y polarización de las células endimarias a partir de la glía radial, y analizar el fenotipo resultante de la pérdida de función de IIIG9 *in vitro* e *in vivo*.
3. Analizar el efecto de la ganancia de función de IIIG9 en la línea celular de endimoma DKFZ-EP1NS.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Animales de experimentación.

3.1.1. Mantenimiento de los animales. Se utilizaron ratas Sprague - Dawley embrionarias de 11, 13, 15 y 17 días de gestación, postnatales de 1, 3, 5, 7, 10, 15 días y adultas de ambos sexos. Los animales se mantuvieron en condiciones controladas de temperatura (20-25°C), fotoperíodo 16/8 Hrs de luz/oscuridad, recibieron acceso libre al agua y fueron alimentadas diariamente. Todos los animales de experimentación se manejaron según las normas de bioética del National Institutes of Health, Bethesda, MD y por el manual de Bioseguridad (2008) de la ANID.



3.1.2. Inyección única y continua en animales postnatales y adultos. Tras desinfección del área de operación, los animales utilizados fueron anestesiados (en frío para animales postnatales o por inhalación con isofluorano en animales adultos). Tras la pérdida de los reflejos oculares y de retracción de extremidades traseras, se realizó una inyección dirigida al ventrículo lateral derecho. En el caso de inyección única realizada en animales PN1, se utilizó jeringa Hamilton de 10 μ L para inocular 3 μ L de medio con partículas adenovirales al ventrículo lateral. Se utilizó un punto de inyección localizado a una distancia media entre el ojo derecho y la lambda del cráneo del animal, y luego 1 mm hacia distal. Se realizó una inyección de ~ 1,5 mm de profundidad, y se inocularon las partículas virales. En el caso de inyección continua, realizada en animales adultos, se utilizó una bomba osmótica ALZET®

modelo 2M2L, cargada previamente con partículas adenovirales (velocidad de inyección nominal 5 $\mu\text{L/hr}$) durante 14 días. Luego de esterilizar el lugar de la operación, utilizando tijeras se realizó un espacio subcutáneo en la espalda para alojar la bomba osmótica. Se suturó la incisión con corchetes de acero quirúrgico. Las ratas transducidas fueron mantenidas por 14 días para bomba ALZET® con libre acceso a comida y agua, tras lo cual fueron sacrificadas para análisis inmunohistoquímico en cortes gruesos de 40 μm .

3.2. Cultivos celulares.

Los cultivos celulares fueron realizados en una incubadora a 37°C, 5% de CO₂ y 95% de humedad. Los procedimientos de obtención y expansión celular fueron realizados en un gabinete de seguridad biológica nivel II y las células fueron almacenadas por congelamiento con DMSO 5% v/v en nitrógeno líquido.

3.2.1. Cultivo de células HEK293T. Estas células son subclones de la línea celular HEK293, provenientes de riñón humano embrionario y fueron utilizadas para la transfección de plásmidos. Las células de pasajes tempranos fueron cultivadas en placas de cultivo de 10 cm de diámetro (Falcon) con 10 mL de medio DMEM alta glucosa suplementado con 10% v/v de SBF (Gibco), penicilina 100 U/mL, estreptomicina 100 $\mu\text{g/mL}$, glutamina 2 mM y fungizona 2,5 $\mu\text{g/mL}$ (Gibco), con cambio de medio de cultivo cada dos días. Cuando las células en cultivo alcanzaron un 80-90% de confluencia, fueron expandidas en una proporción de 1:6.

3.2.2. Cultivo de células HEK293AAV. Estas células son subclones de la línea celular HEK293, provenientes de riñón humano embrionario, seleccionada específicamente para generar alto título de virus adeno-asociado en sistemas plasmidiales “helper-free” (AAV-100, Cell Biolabs Inc.). Las células de pasajes tempranos fueron cultivadas en placas de cultivo de 10 cm de diámetro (Falcon) con 10 mL de medio DMEM alta glucosa suplementado con 10% v/v de SBF (Gibco), penicilina 100 U/mL, estreptomina 100 µg/mL, glutamina 2 mM y fungizona 2,5 µg/mL (Gibco), con cambio de medio de cultivo cada dos días. Cuando las células en cultivo alcanzaron un 80-90% de confluencia, fueron expandidas en una proporción de 1:6.

3.2.3. Cultivo de células DKFZ-EP1NS. Las células DKFZ-EP1NS fueron aisladas de un paciente con ependimoma anaplásico supratentorial de grado III (categorizado según la organización mundial de la salud, OMS) (Milde y col. 2009). Las células fueron mantenidas en criopreservante que contiene 60 mM de mio-inositol, 0,025 mM de alcohol polivinílico, 65% de suero sintético “Knockout serum Replacement” (10828-028, Gibco) y 10% DMSO, y almacenadas a -80°C o en nitrógeno líquido. Las células fueron puestas en cultivo por hasta 12 días y y cultivadas en medio Neurobasal (Gibco) suplementado con B27 (Gibco), glutamina 2mM, Heparina 1ug/mL, EGF 20ng/mL, bFGF 20 ng/mL, penicilina 100 U/mL, estreptomina 100 mg/mL y fungizona 2,5 mg/mL. Se realizó pasaje cada 6 días, en el cual el sobrenadante fue disgregado mecánicamente, y fueron expandidas 1:2 a 1:3 en frascos T25. Para el análisis de célula viva en tiempo real se sembraron 20.000 células por pocillo en placas de 96 pocillos.

3.2.4. Cultivo primario de neuroesferas. Los cultivos fueron obtenidos de ratas Sprague-Dawley de 17 días de gestación y mantenidos en condiciones de cultivo a 37°C y 5% CO₂ en incubadora. Luego de aislar el cerebro, se obtuvieron las áreas de la corteza cerebral de ambos hemisferios mediante microdissección. Posteriormente, el tejido se sometió a disgregación mecánica en medio de proliferación para neuroesferas (Stem Cells Technologies Inc), que consta de NeuroCult® NS-A Proliferation Kit, suplementado con Heparina 2 ug/mL, EGF 20 ng/mL y FGF 10 ng/mL. Se descartó el tejido no disociado y el sobrenadante se transfirió a un tubo de 15 ml el cual fue centrifugado a 800 rpm por 5 min. El pellet fue resuspendido y se realizó el recuento y la estimación de la viabilidad celular mediante el método de exclusión con azul de tripán 0,2% p/v. Se sembraron en frascos T25 con 5 mL de medio de proliferación a una densidad de 100.000 cel/cm². Posteriormente a las 24 horas, se tomaron los 5 mL y se transfirió a un nuevo frasco T25, para eliminar debris precipitado en frasco y se agregó adenovirus AdsiBgalGFP o AdsiIIIIG9-GFP a cada frasco. Se recolectó el medio de los frascos T25 con las NE en suspensión y se sembraron en placas 24 pocillos con cubreobjetos previamente tratados con poli-L-lisina, 48 hrs posterior al cambio de frasco. Se mantuvieron las células en cada pocillo por 30 minutos para adherir las neuroesferas suspendidas, tras lo cual fueron fijadas con PFA 4%, y mantenidas en PBS a 4°C hasta su utilización.

3.2.5. Medición de confluencia mediante tecnología IncuCyte®. Para realizar análisis de confluencia de la línea celular EP1NS, se sembraron 20.000 células en placas de 96 pocillos de fondo ultra transparente. 24 horas después, se realizó

transfección con plásmido que presenta reportero GFP, y las células fueron mantenidas en el sistema IncuCyte® S3 (Essen-Bioscience) por hasta 10 días. Las imágenes fueron adquiridas en el equipo el cual fue configurado para tomar 4 fotos por cada pocillo con un aumento de 10X cada dos horas, por un período de tiempo de hasta 10 días. Posterior a esto, las imágenes fueron procesadas utilizando el software IncuCyte S3 y el módulo básico que permite analizar la confluencia de la placa, y el área de objetos verdes que presentan la fluorescencia producto de la transfección.

3.3. Procesamiento histológico y citológico

3.3.1. Fijación muestras de tejido. Las muestras de tejido de rata postnatal 7 y adulta para inyección intracerebroventricular, fueron fijadas por perfusión transcardial en paraformaldehído 4% p/v (PFA). Para ello, los animales fueron anestesiados con mezcla anestésica que contenía Xilacina (4 volúmenes), ketamina (4 volúmenes) y Pacifor^{MR} (2 volúmenes), luego se inyectó solución salina para eliminar la sangre del animal, y posteriormente se inyectó PFA 4% p/v. Luego fueron decapitados y los cerebros fueron extraídos. Las muestras fijadas por inmersión fueron mantenidas en PFA 4% p/v por 15 min, tras lo cual se realizó una serie de cortes coronales para facilitar la fijación. Las muestras se mantuvieron en fijador por 24 horas a 4°C y luego mantenidas en PBS 1X hasta su utilización.

3.3.2. Fijación cultivos celulares. Las células fueron cultivadas en placas de 12 y 24 pocillos sobre cubreobjetos de vidrio, fueron lavadas 3 veces con tampón Tris-

Fosfato 10 mM (Tris 10 mM, NaCl 120 mM, Na₂HPO₄ 8,4 mM, KH₂PO₄ 3,5 mM, pH 7,8), y luego fijadas con PFA al 4% por 15 a 30 minutos a temperatura ambiente. Las células se lavaron tres veces con tampón Tris-fosfato para su utilización.

3.3.3. Obtención de cortes de pared endimaria (en-face wholemount).

La cara facial del ventrículo lateral completo fue obtenida mediante la técnica de disección “wholemount” (Mirzadeh y col. 2010). Se obtuvo corteza de ratas Sprague-Dawley de estadio E17 y pared estriatal de estadios P1, P3, P5, P7, P10, P15, y Adulto. Los animales fueron sacrificados por dislocación cervical. Se removió el cráneo en dirección posterior a anterior. El cerebro fue puesto en PBS 1X frío para realizar microdisección utilizando lupa estereoscópica. Se disectaron los bulbos olfatorios, posteriormente se dividió el cerebro en la fisura interhemisférica. Se realizó un corte coronal en la porción posterior del cerebro, que permite identificar el hipocampo caudal. Se insertó bisturí en el espacio ventricular entre la corteza y el hipocampo. Luego que este corte está correctamente realizado, se separó la corteza del hipocampo con pinzas desde el área medial dorsal recién cortada, hacia el área distal ventral, siguiendo la apertura del ventrículo lateral. Se realizó otro corte que permitió liberar el hipocampo de la corteza. Con estos pasos bien ejecutados, el hipocampo fue fácilmente empujado con pinzas en dirección anterior, hasta que se liberó el área medial del ventrículo lateral estriatal. El cerebro con el ventrículo abierto fue fijado en PFA 4% por 4 horas en estadios E17-P3 y durante la noche (~16 hrs) en estadios P5-Adulto. El cerebro fue lavado en PBS 1X tras la fijación para continuar con la disección. Se removió con bisturí la corteza del cerebro fijado,

se removió la zona anterior del hipocampo, y se realizó un corte paralelo al ventrículo estriatal, del menor grosor posible dependiendo del tamaño del cerebro a analizar (80-200 μm). Este trozo de tejido fue inmunomarcado en tubo eppendorf para evitar daño mecánico en el lavado e incubación de anticuerpos. Luego fue montado utilizando medio de montaje fluorescente (Dako), con la precaución de dejar deslizar el cubreobjetos sobre el tejido con suavidad, para evitar presionar el tejido y expandirlo, lo cual genera errores en la interpretación de los resultados. Se rellena con medio de montaje utilizando micropipeta, hasta que todo el tejido estuviese cubierto. Se mantuvo a 4°C hasta su análisis.

3.3.4. Inclusión y corte. Los cerebros embrionarios fueron fijados en PFA 4%, e incluidos en bloques de parafina. Primero, las muestras fueron sometidas a una batería de etanol de concentración creciente (etanol 70% v/v, 95% v/v y cuatro baños de etanol 100% v/v) por diferentes periodos de tiempos para su deshidratación, luego fueron pasados por 3 baños de Histo-Clear®. En la última etapa de la inclusión, los tejidos se pasaron por 4 baños de parafina mantenida a 60°C en una estufa termostática, para finalizar con la confección de los bloques de parafina. Finalmente, las muestras fueron incluidas en parafina, introduciéndolas en cuatro baños de parafina mantenidas en una estufa termostática a 60°C. Una vez confeccionados los bloques, estos fueron enfriados rápidamente en agua corriente. Los bloques de parafina fueron cortados con un micrótopo rotatorio (Leica Reichert-Jung 2040 Autocut Microtome) en cortes seriados de 7 μm de grosor. Estas láminas fueron montadas en portaobjetos tratados con poli-L-lisina.

3.3.5. Inmunohistoquímica con peroxidasa. Los cortes de 7 μm de grosor en portaobjetos fueron desparafinados por inmersión en tres baños sucesivos de Histo-Clear® y en una batería de etanol en concentraciones decrecientes por 5 min cada uno. Los portaobjetos fueron lavados con agua y se calienta hasta hervir en tampón citrato (pH 6) manteniéndose a esta temperatura durante 10 minutos. Luego se dejó enfriar durante 2 horas. Las muestras se lavaron en tampón Tris fosfato 10 mM (Tris 10 mM, NaCl 120 mM, Na_2HPO_4 8,4 mM, KH_2PO_4 3,5 mM, pH 7,8) durante 5 minutos y, posteriormente, fueron incubadas por 15 min en metanol con peróxido de hidrógeno 3% v/v para inhibir la actividad peroxidasa endógena. Los cortes fueron nuevamente lavados en tampón Tris-fosfato 10 mM (pH 7,8) y posteriormente incubados con el primer anticuerpo (Tabla 1) preparado en tampón Tris-fosfato y albúmina sérica de bovino 1% p/v (Tris-BSA). La incubación fue realizada en una cámara húmeda a temperatura ambiente durante 12 a 16 h. Luego de lavar el primer anticuerpo, las muestras fueron incubadas con los segundos anticuerpos conjugados a peroxidasa (Tabla 1), diluidos en Tris-BSA por 2 h. Transcurrido el tiempo de incubación con el segundo anticuerpo, las muestras fueron lavadas en tampón Tris-fosfato y luego la actividad peroxidasa fue revelada utilizando una solución de diaminobenzidina 0,7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y peróxido de hidrógeno 3% v/v en tampón Tris-fosfato durante 15 min en oscuridad. La reacción fue detenida con lavados en agua destilada. Los cortes tratados fueron deshidratados en una batería de alcoholes de concentración creciente, cuatro baños sucesivos de Histo-Clear® y luego cubiertos con cubreobjetos utilizando medio de montaje Entellán®. Las muestras se mantuvieron en estufa a 60°C durante 24 hrs y luego mantenidas a temperatura ambiente para su visualización.

3.3.6. Inmunofluorescencia. Se utilizaron cortes de tejido incluidos en parafina, cultivos de células fijadas en cubreobjetos de vidrio, cortes de tejido cortados en vibrátomo y tejidos fijados de “wholemout”. Las muestras fueron lavadas en tampón Tris-fosfato 10 mM (pH 7,8). El procedimiento para células cultivadas y fijadas incluye lavado con solución permeabilizante Tritón X-100 0,2% v/v en Tris-fosfato 10 mM (pH 7,8). Luego, el primer anticuerpo preparado en Tris-BSA se incubó por 16 h en las diluciones correspondientes (Tabla 1). Posterior a la incubación con el primer anticuerpo y sus respectivos lavados en tampón Tris-fosfato 10 mM (pH 7,8) la muestra fue incubada durante 2 hrs con el segundo anticuerpo acoplado a un fluoróforo determinado (Tabla 1), el cual fue diluido en Tris-BSA. Adicionalmente se agregó marcador nuclear Hoechst (1:1000). Se incubó en cámara húmeda a temperatura ambiente y en oscuridad. Luego, las muestras fueron lavadas en tampón Tris-fosfato 10 mM (pH 7,8). Finalmente, las muestras fueron montadas con medio de montaje para fluorescencia (Dako) y se mantuvieron a 4°C en oscuridad hasta su visualización. El análisis de inmunomarcaje múltiple se realizó utilizando dos o tres anticuerpos primarios respectivamente (Tabla 1), generados en especies animales distintos de modo que no exista reacción cruzada. Los segundos anticuerpos utilizados (Tabla 1) tienen unidos distintos fluoróforos, para observar la inmureactividad mediante filtros diferentes. Los anticuerpos se aplicaron en conjunto en la misma solución (Tris-BSA) e incubados y lavados según el protocolo descrito anteriormente.

Tabla 1: Anticuerpos utilizados.

Anticuerpo	Especie	Dilución	Origen
Anti-III G9	Conejo	1:1000	Donado
Anti-Vimentina	Pollo	1:400	Merck
Anti-Vimentina	Ratón	1:50	Dako
Anti-III G9 (humano)	Conejo	1:200	Human Protein Atlas
Anti- β -catenina	Ratón	1:200	Santa Cruz
Anti-Pan-Cadherina	Ratón	1:500	Sigma-Aldrich
Anti-Glut-1	Conejo	1:100	EDM Millipore
Anti-ZO-1	Cabra	1:50	Santa Cruz
Anti-GFAP	Conejo	1:400	DAKO
Anti-IBA-1	Cabra	1:20	Abcam
Anti-Nestina	Ratón	1:50	BD Biosciences
Anti-IgG de conejo – HRP	Burro	1:200	Jackson Immunoresearch
Anti-IgG de ratón – HRP	Burro	1:200	Jackson Immunoresearch
Anti-IgG de pollo – Cy5	Burro	1:200	Jackson Immunoresearch
Anti-IgG de conejo (Alexa 488)	Burro	1:200	Jackson Immunoresearch
Anti-IgG de conejo Cy3	Burro	1:200	Jackson Immunoresearch
Anti-IgG de ratón Cy3	Burro	1:200	Jackson Immunoresearch

3.3.7. Microscopía. Las imágenes de los estudios asociados a microscopía óptica (dimensiones de 3840 x 3072, profundidad de color de 24 bits) fueron obtenidas en un microscopio óptico Zeiss, modelo Axioplan 2. Las imágenes fueron obtenidas mediante el software Nikon ACT-1. Los estudios de microscopía confocal espectral

fueron desarrollados en el Centro de Microscopía Avanzada (CMA Bío-Bío) de la Universidad de Concepción. Para lo cual, las imágenes de múltiples marcajes fluorescentes (1024 x 1024 pixeles, profundidad de color de 16 bits) fueron obtenidas en un microscopio confocal espectral Zeiss, modelo LSM 780 NLO, equipado con láser Diodo DPSS (405 nm), láser de argón (458 – 488 – 514 nm), láser Diodo DPSS (561 nm) y láser de helio-neón (633 nm). Los datos de microscopía de fluorescencia fueron almacenados y procesados con el software Zen 2012 (Zeiss). Las imágenes y reconstrucciones de máxima intensidad y tridimensional fueron obtenidas a partir del software Zen 2012 (Zeiss).

3.4. RT-PCR convencional.

3.4.1. Extracción de ARN total. Se extrajo ARN total desde las muestras obtenidas por disección desde muestras de, cerebro embrionario, postnatal y adulto de rata y células en cultivo. Las muestras fueron disgregadas mecánicamente y el ARN fue extraído homogenizando las muestras en 500 µL de Trizol® e incubándolas por 5 min a temperatura ambiente. Luego las muestras fueron tratadas con 100 µL de cloroformo, agitadas por 15 segundos e incubadas a temperatura ambiente por 3 min. Luego las muestras fueron centrifugadas a 12.000 g por 15 min a 4°C, para separar las fases y una vez recuperada la fase acuosa, se agregaron 250 µL de isopropanol a cada muestra, las que fueron incubadas por 10 min a temperatura ambiente y luego centrifugadas a 12.000 g por 10 min a 4°C. El sobrenadante fue eliminado y el pellet fue lavado con 500 µL de etanol 70% v/v y centrifugado a 7.500 g por 5 min a 4°C. El sobrenadante fue eliminado y el pellet fue resuspendido en 30

a 50 μ L de agua libre de ARNasa. El ARN total fue cuantificado midiendo su absorbancia a 260 nm y su pureza se midió por la relación 260/280 nm.

3.4.2. Transcripción reversa de ARN total (RT). La síntesis de ADN copia (cADN) fue realizada utilizando el RevertAid® H Minus First Strand cADN Synthesis Kit (Fermentas). Para un volumen final de 20 μ l, se incubaron 2 μ g del ARN total de las muestras con 0,5 μ g de OligodT, denaturado a 70°C por 5 min y llevado a hielo por 2 min. Posteriormente, se agregó el tampón de transcripción (Tris-HCl 50 mM, pH 8,3, KCl 50 mM, MgCl₂ 4 mM, DTT 10 mM), la mezcla de dNTPs (1 mM de cada uno) y 20 U del inhibidor de ARNasa y se incubó por 5 min a 37°C. Finalmente, se agregaron 200 U de la enzima transcriptasa reversa RevertAid® H Minus M-MuLV y se incubó por 1 h a 42°C. Al finalizar la reacción la muestra fue calentada a 70°C por 10 min. Los controles negativos para la transcripción reversa fueron tratados con el mismo protocolo de transcripción, pero sin la enzima transcriptasa reversa.

3.4.3. Amplificación de cADN por PCR. La reacción de amplificación del cADN obtenido se realizó en un termociclador ProFlex™ PCR System (Applied Biosystems) en presencia de los distintos partidores específicos (Tabla 1). La mezcla de reacción contenía Tris-HCl 10 mM (pH 8,8), KCl 50 mM, Nonidet P40 0,8% v/v, MgCl₂ 1,5 mM, mezcla de dNTPs (0,2 mM de cada uno), partidores específicos (0,2 μ M de cada uno), Taq ADN polimerasa 0,31 U (Fermentas) y 1 μ L del producto de transcripción reversa, en un volumen final de 12,5 μ L. La mezcla

fue incubada inicialmente a 95°C por 5 min, luego se realizaron 35 ciclos de 95°C por 30 segundos, 55-60°C (dependiendo de los partidores usados) por 30 segundos y 72°C por 30 a 40 segundos, por último, se realizó una extensión final de 72°C por 7 min. Los cADNs utilizados fueron testeados con partidores específicos para β -actina. Los partidores utilizados para amplificar los distintos genes fueron diseñados utilizando el programa Oligo Primer®, teniendo en cuenta su T_m , el porcentaje de GC y la formación de dímeros y loops (Tabla 2). Además, en algunos casos cada partidor se encuentra en un exón distinto por lo que a lo menos se flanquea un intrón, siendo esto un control para la amplificación de ADN genómico contaminante.

3.4.4. Electroforesis en geles de agarosa. Para la identificación de los productos de PCR se prepararon geles de agarosa 1,2% p/v en tampón TAE (Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM) y bromuro de etidio 0,2 μ g/mL. Se utilizó tampón de carga 6X que contenía glicerol 30% v/v, azul de bromofenol 0,5% p/v en tampón TAE (Tris-HCl 10 mM pH 8,0, EDTA 1mM). Se utilizó 3-5 μ L de marcador de peso molecular GeneRuler™ (SM1173 fermentas). Los geles fueron sometidos a un campo eléctrico de 100 V por 35 min en tampón TAE en una cámara de electroforesis. Los fragmentos de ADN en el gel fueron visualizados por el bromuro de etidio, en un transiluminador de luz ultravioleta.

Tabla 2: Partidores utilizados para RT-PCR convencional

Nombre	Partidor 5' (5'-3')	Partidor 3' (5'-3')	Tm (°C)	Producto (pb)
IIIG9-BamHI	GGATCCATGATGGG AAAACCTCC	GGATCCCCGCTGGAAG TTGGGTAGC	57	1287 pb para IIIG9L-BamHI 1158 pb para IIIG9s-BamHI
IIIG9-277	ACAACCCCGAGCTAT GTTCGG	GGCACGTCTCGATAGA AGGG	55	277 pb en presencia de cualquier isoforma de IIIG9
Orientación EGFP	ACAACCCCGAGCTAT GTTCGG	TTACTTGTACAGCTCGT CCATGC	58	1600 pb para correcta orientación de inserto.
β -actina	GCTCGTCGTCGACA ACGGCTC	CAAACATGATCTGGGT CATCTTCTC	60	353 pb
Ciclofilina	ATAATGGCACTGG TGGCAAGTC	ATTCCTGGACCCAAA ACGCTCC	60	239 pb
IIIG9 (humano)	GACCCTCTAGACCAGC CAGA	CTCTGGCCAACACAGGTA GG	60	223 pb

3.5. Ensayos de inmunodetección de proteínas

3.5.1. Obtención de extractos de proteínas totales. Para la obtención de estos extractos se procedió de acuerdo a lo descrito por Salazar y col., (2016). Así los tejidos fueron extraídos rápidamente, cortados en trozos pequeños y homogenizados con 3 volúmenes de solución de homogenización conteniendo cocktail inhibidor de proteasas/fosfatasa (Cell Signaling). Los tejidos homogenizados fueron sonicados a 4°C y luego centrifugados por 10 min a 8.000 g a 4°C y el sobrenadante resultante se mantuvo a -80°C. La concentración de

proteínas fue cuantificada por el método de Bradford (Bio-Rad) midiendo su absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro.

3.5.2. Electroforesis en gel de poliacrilamida y electrotransferencia. Para resolver las proteínas de interés, se utilizaron geles al 10% p/v de acrilamida/bisacrilamida. El gel separador contenía las siguientes concentraciones finales: acrilamida 10%-bisacrilamida 0.1% p/v, SDS 0,1% p/v, TEMED 0,0015% v/v y persulfato de amonio 0,01% p/v, preparados ambos en tampón Tris-HCl 1,5 M (pH 8,8). El gel espaciador contenía las siguientes concentraciones finales: acrilamida 10%-bisacrilamida 0.25% p/v, SDS 0,1% p/v, TEMED 0,0015% v/v y persulfato de amonio 0,01% p/v, preparados ambos en tampón Tris-HCl 0,5 M (pH 6,8). Como tampón de corrida se utilizó un tampón Tris glicina (Tris 25 mM, glicina 192 mM, SDS 0,1% p/v, pH 6,8). Se sembraron 40 µg de extractos de proteínas diluidas en tampón de carga 5X (Tris-HCl 250 mM, pH 6,8, SDS 4% p/v, glicerol 20% v/v, β-mercaptoetanol 1,25 M, azul de bromofenol 0,04% p/v). Se aplicó un voltaje de 100 V al gel montado en la cámara de electroforesis por 6 h aproximadamente.

Las proteínas del gel resultante fueron transferidas a membranas de Immobilon-P. Para esto, el gel fue puesto en contacto con la membrana en una cámara de electrotransferencia en presencia de tampón Tris-HCl 25 mM (pH 8.8), glicina 192 mM y etanol 20 % v/v. La electrotransferencia fue realizada a 100 V durante 1 hrs a temperatura ambiente.

3.5.3. Inmunodetección de las proteínas. Una vez realizada la transferencia se tiñó la membrana con una solución de rojo Ponceau-S 0,2% p/v para confirmar la correcta transferencia de las proteínas a la membrana. Posteriormente, la membrana fue lavada con tampón TBS-T (NaCl 150 mM, Tris 10 mM, pH 7,4, Tween-20 0,05% v/v) y bloqueada con una solución TBS-TL que contiene leche descremada 5% p/v en tampón TBS-T durante 1 h. Luego, las membranas fueron incubadas con el primer anticuerpo anti-IIIG9 (1:20.000), diluido en TBS-TL por 12 h a 4°C. Posteriormente, se realizaron tres lavados de 10 minutos cada uno con TBS-T y con TBS-TL. Luego, la membrana fue incubada por 2 h con un segundo anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado a peroxidasa diluido en TBS-TL con agitación suave a temperatura ambiente y en oscuridad. Una vez finalizada la incubación, se realizaron tres lavados de 10 minutos cada uno con solución TBS-T y luego se reveló con un sistema de detección quimioluminiscente Western Lightning Plus ECL (PerkinElmer), incubando la membrana durante 1 a 5 minutos con el reactivo. La señal de quimioluminiscencia fue capturada por un equipo fotodocumentador ImageQuant LAS 500 (GE Healthcare Life Sciences). Las membranas fueron reutilizadas para detectar β -actina, previa eliminación de los anticuerpos primarios y secundarios mediante su incubación en una solución de stripping (Re-Blot Plus Mild Antibody Stripping Solution, Chemicon). Esta incubación se realizó por 15 min a temperatura ambiente. Posteriormente, las membranas fueron lavadas con TBS-T, bloqueadas con TBS-TL por 30 min e incubadas con el primer anticuerpo anti β -actina acoplado a HRP (1:50.000). El revelado y la obtención de imagen se realiza de la misma forma descrita previamente.

3.6. Generación de vectores plasmidiales bicistrónicos para la expresión de las isoformas larga y corta de IIG9 y la proteína reportera GFP.

3.6.1 Subclonamiento en vector pAAV-Ires-GFP. En nuestro laboratorio contamos con vectores pCR Blunt-TOPO IIG9s (isoforma corta) y pCR Blunt-TOPO IIG9L (isoforma larga) con sitios de restricción BamHI en sus extremos 5' y 3'. Se realizó digestión enzimática con BamHI (NEB) y los fragmentos liberados fueron purificados desde gel de agarosa mediante kit StrataPrep DNA Gel Extraction Kit (Agilent Technologies). Se realizó el subclonamiento de las isoformas en el vector pAAV-Ires-GFP (Cell Biolabs, VPK-418-SER4).

3.6.2 Purificación de los fragmentos de IIG9L y IIG9s con extremos no cohesivos. Los fragmentos en el gel de agarosa fueron identificados y cortados bajo transiluminador con luz UV atenuada. Los fragmentos se purificaron mediante kit de extracción StrataPrep DNA Gel Extraction Kit (Agilent Technologies). Para ello, se agregó 300 µL de tampón de extracción por cada 100 µL de volumen de gel. La mezcla se calentó hasta su disolución a 60°C, se transfirió a columna y se centrifugó a 13.000 g por 30 segundos. Posteriormente, se agregó tampón de lavado y se centrifugó a 13.000 g por 30 segundos. Se eluyó cada fragmento con 50 µL de tampón de elución. Los fragmentos fueron guardados a -20°C hasta su utilización.

3.6.3. Transformación de bacterias químicamente competentes y purificación del vector bicistrónico. Para ello se se utilizaron bacterias *Escherichia coli* One Shot® TOP 10 químicamente competentes (Invitrogen). Se descongelaron viales de 50 µL de bacterias en hielo, y se les agregó 6 µL de la mezcla de ligación. La mezcla fue incubada por 30 min en hielo y luego fue sometida a un golpe de calor de 42°C por 30 segundos. Se dejó la mezcla en hielo y se agregaron 250 µL de medio S.O.C. (Invitrogen). El tubo fue incubado en agitación (225 rpm) a 37°C por 1 h. A continuación, se sembraron las bacterias en placas de agar LB con kanamicina 50 µg/mL que fueron incubadas toda la noche en una estufa a 37°C. Las colonias obtenidas después de la incubación fueron aisladas y crecidas en 6 mL de medio LB con ampicilina 100 µg/mL a 37°C, en agitación durante 12 horas. La purificación de los diferentes clones obtenidos fue realizada mediante el kit E.Z.N.A.™ Plasmid Miniprep (Omega Bio-Tek), para lo cual, se centrifugó la suspensión bacteriana en un tubo de 2 mL a 10.000 g durante 1 minuto y se eliminó el sobrenadante. Luego, se agregó solución I (RNAsa) y se agitó vigorosamente, solución II y se invirtió varias veces para mezclar y solución III y se centrifugó a 13.000 g por 10 min. El sobrenadante se pasó por una columna, se lavó y finalmente se eluyó el plásmido en 30-50 µL de agua grado biología molecular para su utilización. La selección de los clones se realizó mediante análisis de PCR utilizando partidores específicos (Tabla 1, IIIG9-277) para ambas isoformas de IIIG9.

3.6.4 Desfosforilación del vector pAAV-4-Ires-GFP. El plásmido ya digerido fue sometido a desfosforilación de sus extremos cohesivos. Para ello, a la mezcla de digestión del plásmido pDC 311.3 - eGFP se le agregó fosfatasa antártica 1U (New

England Biolabs) y tampón de reacción de fosfatasa antártica 1X (New England Biolabs) llegando a un volumen final de 35 μ L. La mezcla se incubó en termociclador 2720 Thermal Cycler (Applied Biolabs) a 37°C durante 1 h, y luego se inactivó la fosfatasa a 65°C por 5 min.

3.6.5. Ligación de los fragmentos de IIIIG9 en vector pAAV-4-Ires-GFP. El plásmido digerido y desfosforilado se mezcló con los fragmentos IIIIG9s y IIIIG9L purificados, en una relación molar 1:3. Para ello, se mezclaron 14 femtomoles del plásmido, 42 femtomoles de cada inserto, 1 U de ligasa de ADN T4 y 1X de tampón T4, en un volumen final de 6 μ L. La mezcla de ligación se mantuvo a 4°C durante la noche y posteriormente, se realizó la transformación, purificación de los vectores y análisis de los clones positivos mediante PCR, de la misma forma que en el punto 6.1.4.

3.6.6. Orientación del inserto en el vector de expresión por PCR. Los insertos fueron cortados con una enzima de restricción (BamHI) por lo que su inserción en el vector puede ocurrir en ambos sentidos. Se verificó la correcta orientación del inserto en el vector con partidores específicos (Tabla 1): el partidor sentido hibrida con una secuencia del fragmento inserto y el partidor antisentido hibrida con una secuencia río abajo en el vector. Se realizó PCR utilizando una T_m 58°C. Los clones correctamente orientados, amplificaron un producto de 1600 pb.

3.6.7. Elaboración de medio de cultivo Luria-Bertani (LB) líquido y agar. El medio de cultivo LB líquido se preparó utilizando triptona 10 g/L, extracto de

levaduras 5 g/L y cloruro de sodio 10 g/L disuelto en agua destilada y fue posteriormente autoclavado. El agar LB se preparó utilizando 40 g/L de LB Agar (MoBio) disuelto en agua destilada y fue posteriormente autoclavado. Las placas LB se prepararon agregando 20 mL de agar LB disuelto tibio con 100 µg/mL ampicilina a cada placa.

3.7. Transfección de los clones en células HEK293A. La transfección de las células HEK293A con los plásmidos de expresión pAAV-4-IIIIG9s-Ires-GFP, pAAV-4-IIIIG9L-Ires-GFP) se realizó utilizando Lipofectamina (Invitrogen) como reactivo de transfección, de acuerdo a lo descrito por Salazar y col. (2014). Para ello se sembraron 50.000 células en placas de 24 pocillos 24 hrs previo a la transfección. Las células se transfectaron con 1 µg de uno de los vectores, utilizando una razón de masa de ADN (µg)/volumen de reactivo de transfección (µL) 1:10. El reactivo de transfección se diluyó en Optimem (Invitrogen) en un volumen final de 50 µl y se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente. Luego, se agregó por goteo al reactivo de transfección diluido, el ADN a transfectar el cual también fue diluido en el mismo volumen de Optimem. Posteriormente, la mezcla se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente para que se forme el complejo ADN-lípido catiónico. Antes de que concluyeran los 30 minutos, las células se lavaron 3 veces con Optimem y se incubó con 300 µl de Optimem a cada pocillo, al cual se agregó la solución de transfección por goteo. Inmediatamente después, se incubó en estufa a 37 °C por 2,5 horas, luego de las cuales, se realizaron un cambio de medio completo (DMEM suplementado con 10% v/v de SBF (Gibco), penicilina 100 U/mL, estreptomycin 100 µg/mL, glutamina 2 mM y fungizona 2,5 µg/mL (Gibco)). Las células fueron

mantenidas en cultivo por 24 horas más y fueron fijadas con paraformaldehído al 4% p/v en PBS. Estas células fueron utilizadas para inmunofluorescencia, tras lo cual fueron montadas.



4. RESULTADOS

4.1. Capítulo 1. Estudio de la localización de IIG9 en el epitelio ventricular de rata adulta y evaluación del efecto de la pérdida de función de IIG9 en la polarización de la pared endimaria adulta.

Se ha reportado la expresión de IIG9 en muestras humanas de tráquea y oviducto, además del testículo (Ivliev y col. 2012), siendo su localización preferentemente observada en epitelios multiciliados. En modelos murinos, su expresión solo había sido observada a nivel de RNA mensajero en testículo y cerebro, y se observó su localización mediante hibridación *in situ* en las paredes ventriculares del SNC, donde residen las células endimarias (Danielson y col. 2002).

En nuestro laboratorio se definió por primera vez la localización de IIG9 en testículo, epitelio multiciliado de tráquea, oviducto y endimario de rata adulta. En el estadio adulto la pared endimaria está completamente diferenciada, de esta forma no se encuentran procesos radiales, producto de la desaparición de la glía radial postnatal. Considerando estos conceptos, nos preguntamos si la localización de IIG9 es requerida para el mantenimiento de la polarización del epitelio diferenciado. Para ello, caracterizamos la localización de IIG9 en los complejos de unión del epéndimo adulto y evaluamos el efecto de la pérdida de función de IIG9 en la polarización de la pared endimaria adulta de rata.

4.1.1. Localización de IIG9 en las paredes ventriculares de rata adulta.

Utilizando la técnica de micro-disección láser acoplada al análisis de qRT-PCR, comparamos los niveles de expresión del ARNm de IIG9 en las diferentes subpoblaciones presentes en el epitelio ventricular del tercer ventrículo (Fig. 5).

Se extrajo ARN total de células endimarias multiciliadas (ep), tanicitos alfa (α T), los cuales son biciliados, tanicitos β 1 dorsales (D β 1T) y tanicitos β 1 ventrales (V β 1T), los cuales poseen un cilio inmóvil, y poseen numerosas microvellosidades (Cortes-Campos y col. 2013; Mirzadeh y col. 2017) (Fig. 5A). Se amplificó una banda del tamaño esperado para IIG9 (277 pb) en las células endimarias; la intensidad de esta banda fue normalizada utilizando GAPDH como gen de referencia y se asignó una expresión relativa del 100% (Fig. 5C). Una expresión relativa del 17% fue amplificada en α T tanicitos (Fig. 5B, carril 2; C). No se observó amplificación en tanicitos D β 1T o V β 1T. Para comparar los niveles del mensajero con los de proteína, realizamos un análisis inmunohistoquímico (Fig. 5 D-J). Una reacción positiva fue detectada en las células endimarias de los ventrículos laterales (Fig 5 H-I, flechas), tercer y cuarto ventrículo (Fig 5 D-G, flechas), mientras que no se observó inmunomarcaje en las neuronas del parénquima cerebral que rodea las paredes ventriculares, o en los plexos coroideos (CP). Además, no se observó inmunomarcaje en los tanicitos α , D β 1, o V β 1 (Fig 5D, cabeza de flecha y asterisco). En ausencia del anticuerpo primario, no se detectó inmunomarcaje (Fig 5J). Estos resultados muestran que en SNC de rata adulta, IIG9 se localiza en el cilio y citoplasma de las células endimarias que recubren los ventrículos cerebrales, y

no fue detectado en los tanicitos hipotalámicos, lo que sugiere un rol de IIIG9 en la motilidad ciliar y el movimiento de LCR en SNC.

Para determinar si la expresión de IIIG9 se conserva en un modelo *in vitro* de células endimarias, realizamos un cultivo de endimocitos aislados de los ventrículos laterales de rata adulta que mantiene sus características fenotípicas (Grondona y col. 2013). Mediante análisis de microscopía de SIM-superresolución en el plano Z (Fig. 6) mostramos que la distribución de IIIG9 sigue un patrón punteado hacia los bordes celulares (Fig. 6A-B) y los múltiples cilios endimarios (Fig. 6C-D). El marcador ciliar tubulina- α acetilada presentó un marcaje homogéneo demarcando el axonema ciliar presente en cada cilio, y los microtúbulos acetilados en el citoplasma. Estos resultados mostraron que, adicional a la localización ciliar, IIIG9 podría ejercer un rol en la mantención del fenotipo endimario asociado a las uniones célula-célula. No se observó una distribución preferente hacia la zona apical o la zona basolateral, posiblemente debido a que los endimocitos aislados carecen de interacciones de otras células que permitan establecer los límites de dichas zonas.

Para establecer un análisis en el epitelio endimario diferenciado que permita determinar la localización de IIIG9 cercana a las uniones célula-célula *in situ*, hemos utilizado la técnica de disección de pared ventricular en-face *wholemout* que involucró la disección de la pared endimaria (Mirzadeh y col. 2010). Esta técnica nos permitió obtener la cara ventricular de la pared endimaria diferenciada de ratas adultas (2-6 meses) (Fig. 7 panel A) y realizar la

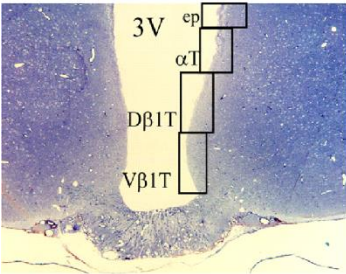
inmunodetección de las proteínas de adhesión celular en el plano Z, tras el análisis de microscopía confocal.

Caracterizamos mediante inmunohistoquímica la integridad del *wholemout* (Fig. 7 panel B) utilizando el marcador ciliar tubulina acetilada (Fig. 7A), que marca los múltiples cilios de la superficie ventricular. Los marcadores de adhesión celular Pan-cadherina (Fig. 7B) y β -catenina (Fig. 7C) demarcan los complejos de unión, lo cual valida que nuestra técnica de *wholemout* reproduce la morfología del tejido ependimario normal.

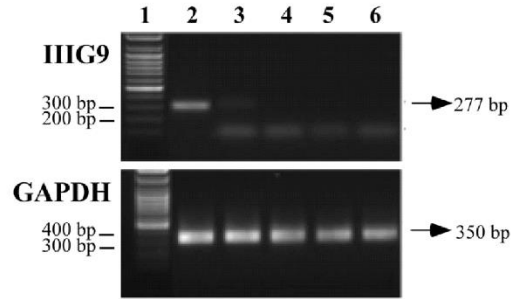
Luego analizamos la localización de IIIG9 en los bordes celulares en el epéndimo adulto (Fig. 8). Observamos para IIIG9, que el inmunomarcaje es citoplasmático y su localización se acentúa en los bordes celulares, donde se codistribuye con β -catenina (Fig. 8F) y Pan-cadherina (Fig. 8L). Estos resultados muestran que la distribución de IIIG9 en los complejos de unión es un fenotipo normal del epitelio ependimario diferenciado.

Figura 5. IIIG9 es exclusivamente expresado en células ependimarias, pero no en otras células que recubren las paredes ventriculares. **A.** Corte coronal de cerebro de rata adulta que muestra las distintas subpoblaciones celulares presentes en tercer ventrículo que fueron aisladas por microdissección láser (ep células ependimarias E1; α T tanicitos alfa; D β 1T Tanicitos beta 1 dorsales; V β 1T tanicitos beta 1 ventrales). **B.** Análisis de RT-PCR para IIIG9 y GAPDH. Marcador de peso molecular (carril 1), y cDNA obtenido desde microdissección láser de ep, α T, D β 1T y V β 1T respectivamente (carril 2-5). **C.** Análisis semicuantitativo de la expresión del ARNm de IIIG9 relativo a GAPDH como ARNm de referencia. ***p < 0.001 fue considerado significativo. **D-I.** Análisis de localización de IIIG9 por inmunoperoxidasa en cortes coronales de 7 μ m. D Tercer ventrículo ventral. E-F Tercer ventrículo dorsal. G Cuarto ventrículo. H, I Ventrículos laterales. **J.** Control negativo sin anticuerpo primario. El inmunomarcaje es positivo en el cilio (flechas) y citoplasma presente en las paredes de los distintos ventrículos. Las subpoblaciones de tanicitos no mostraron inmunoreactividad (cabeza de flecha, asteriscos). 3V, tercer ventrículo. 4V, cuarto ventrículo. LV, ventrículo lateral. SCO, órgano subcomisural. Ep, células ependimarias. CP, plexos coroideos. Aumento: D-G, K 10X, H 20X, I-J, L-M 40X.

A



B



C

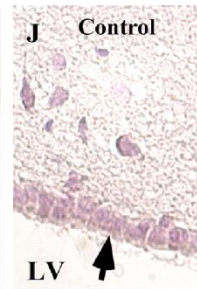
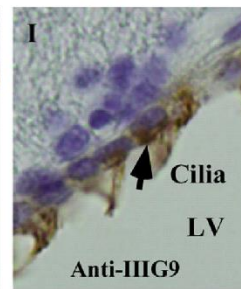
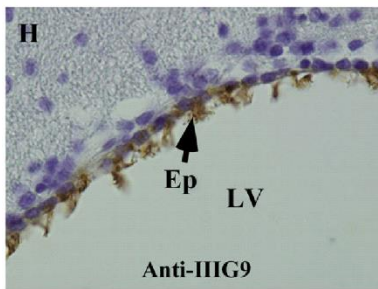
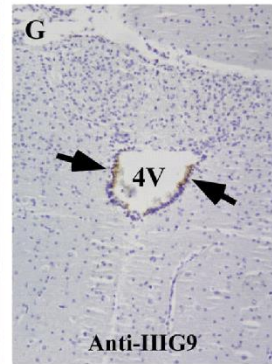
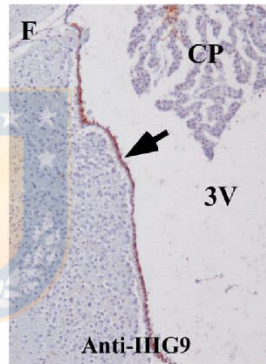
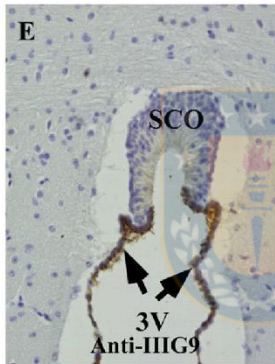
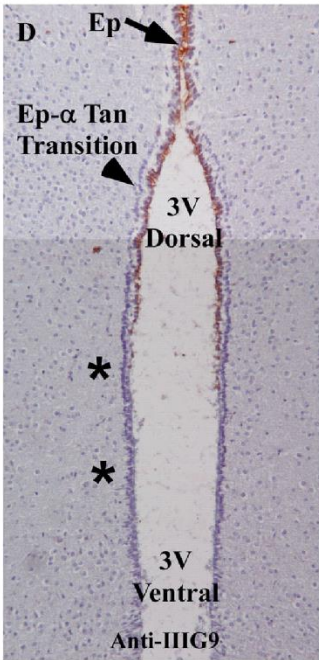
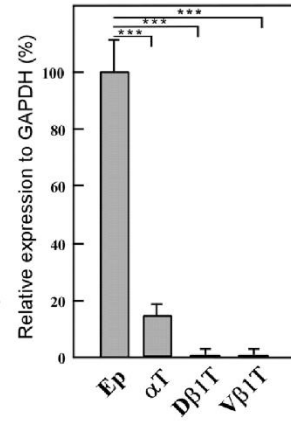
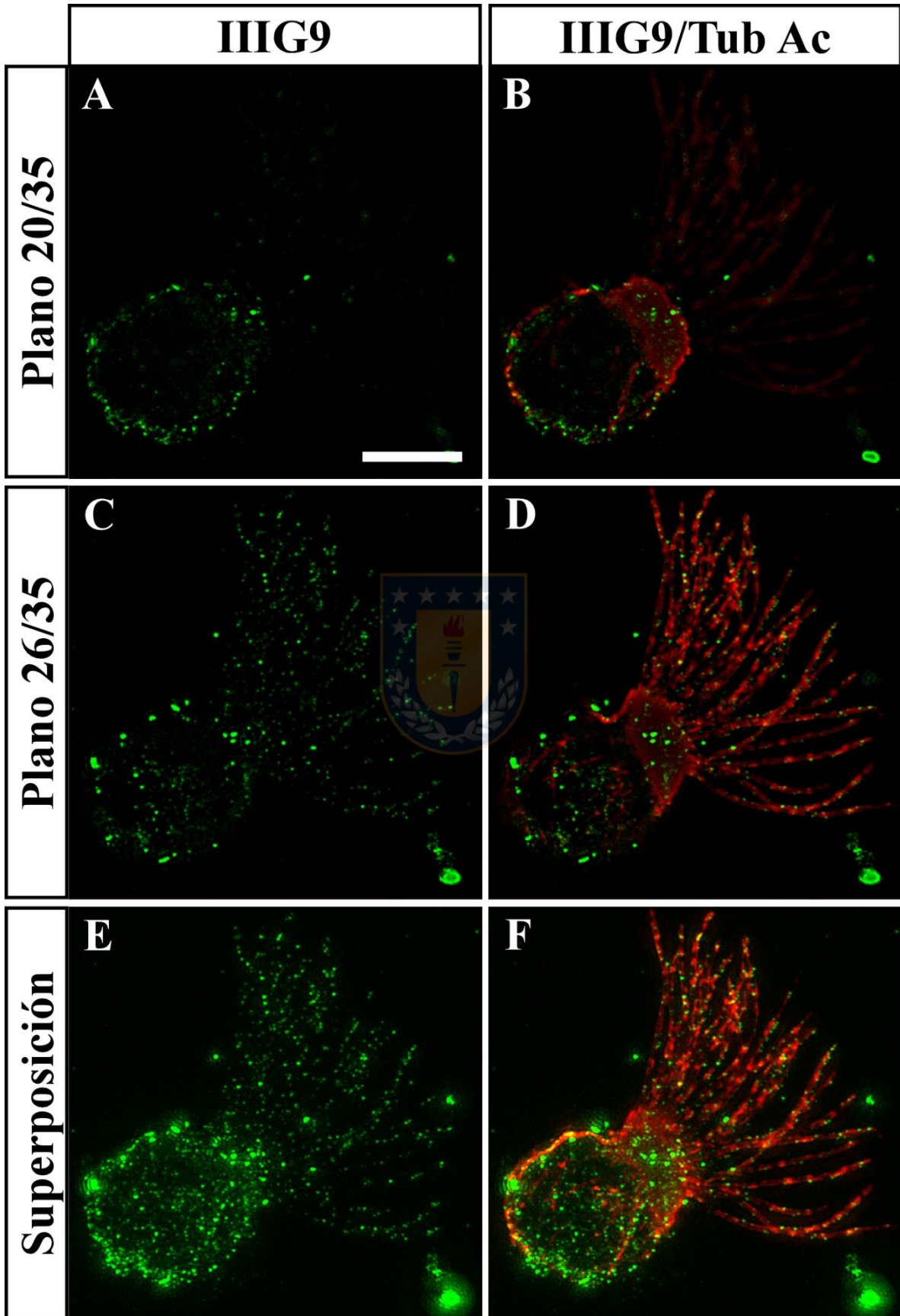


Figura 6. IIIIG9 se localiza en los cilios y los bordes celulares en un modelo *in vitro* de células endimarias aisladas desde ventrículo lateral de rata adulta. Las células endimarias aisladas fueron cultivadas por 2 días, fijadas e incubadas con anticuerpos contra IIIIG9 (verde) y tubulina- α acetilada (rojo), y se realizó microscopía SIM-superresolución, en la cual se tomaron 35 imágenes en el plano Z a una distancia de 0,15 μm por plano, siendo el plano 1 el más alejado del portaobjeto, y el plano 35 el más cercano. **A-B.** Plano 20/35, donde IIIIG9 se localiza hacia los bordes celulares. **C-D.** Plano 26/35, donde IIIIG9 posee una localización punteada hacia los cilios endimarios. **E-F.** Proyección de máxima intensidad. Barra de aumento 5 μm .



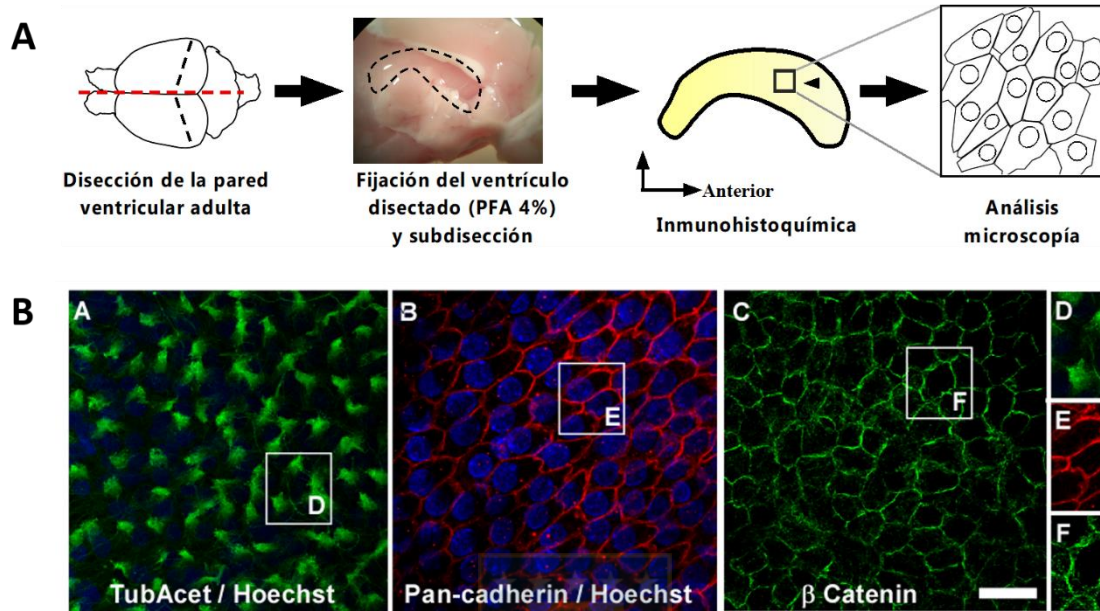


Figura 7. Análisis de marcadores ciliares y de adhesión celular en la pared endimaria mediante la técnica de *wholemount*. Pared endimaria de rata adulta (enface *wholemount*). **A.** Protocolo obtención *wholemount*: Se realizó disección de la cara estriatal de la pared endimaria adulta. Una vez disectada, se montó con el epitelio endimario hacia arriba y se eligió una zona medial a anterior para el análisis. **B.** Análisis de marcadores endimarios y de unión celular: A. Inmunomarcaje para tubulina acetilada (verde). B. Inmunomarcaje para Pan-cadherina (rojo). C. Inmunomarcaje para β -catenina. D-F. aumento digital de A-C respectivamente. Barra de aumento, 20 μ m.

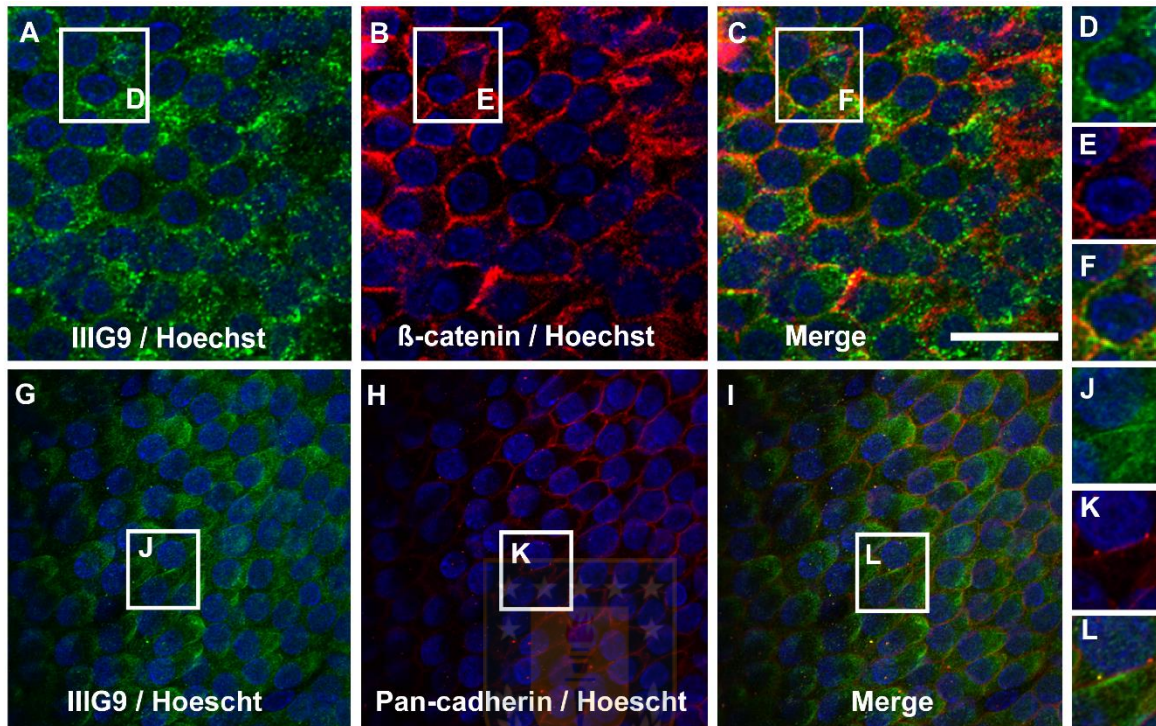


Figura 8. IIIIG9 se codistribuye con marcadores de unión célula-célula en el ventrículo lateral de rata adulta. Análisis de localización de IIIIG9 y marcadores de adhesión celular en pared endimaria mediante la técnica de *wholemout*. **A.** Inmunomarcaje para IIIIG9 (verde). **B.** Inmunomarcaje para β-catenina (rojo). **C.** superposición de A-B. **D-F.** aumento digital de A-C respectivamente. **G.** Inmunomarcaje para IIIIG9 (verde). **H.** Inmunomarcaje para Pan-cadherina (rojo). **I.** superposición de G-H. **J-L.** aumento digital de G-I respectivamente. Barra de aumento, 20 μm.

4.1.2. Análisis de la inhibición sostenida de IIG9 en el epitelio endimario de rata adulta.

Nuestro laboratorio cuenta con adenovirus que permiten la inhibición de la traducción del ARN mensajero de IIG9, o la inhibición de β gal, utilizado como control negativo. Estos adenovirus permiten la expresión del gen reportero GFP, para la correcta identificación de las células transducidas. Evaluamos el efecto de la inhibición sostenida de IIG9 *in vivo*, en la pared endimaria diferenciada de rata adulta, utilizando la tecnología de bomba osmótica ALZET®. Esta tecnología permitió la administración ventricular continua de ambos adenovirus durante 14 días, sin necesidad de manipular nuevamente al animal. Se analizó mediante inmunohistoquímica la distribución de los marcadores de célula endimaria vimentina, marcador astrocítico GFAP (Fig. 9 C, G, K, Ñ) y el marcador microglial IBA-1 (Fig. 10 C, G, K, Ñ), en cerebros de ratas adultas transducidas con el virus control (Ad-si β gal) y el virus inhibidor (Ad-siIIG9). En animales controles (Fig. 9A-H, Fig. 10A-H), se observaron células endimarias transducidas (GFP+) positivas a vimentina que se disponen como un epitelio continuo (Fig. 9B, F; fig. 10B, F). La inmunotinción para GFAP muestra la presencia de astrocitos subventriculares, débilmente positivos (Fig 9C, G). También se observó marcaje para IBA-1 en la región subventricular y el parénquima neuronal, que corresponden a células de la microglía (fig. 10C, G). Las células transducidas mantienen su distribución epitelial normal (epitelio cúbico simple), a través del borde ventricular. Estos datos indican que la administración del virus control no genera disrupción endimaria, lo cual demuestra que la estrategia experimental utilizada genera un fenotipo equivalente al de un animal no tratado. Diferentes resultados se observaron con el tratamiento

con el Ad siIIIIG9-GFP (fig. 9I-O, fig. 10I-O). Se observó una pérdida de la integridad de la pared endimaria y ausencia de un epitelio cúbico simple que expresa vimentina con respecto al control. Además, se observaron numerosas células transducidas (GFP+) en la cavidad ventricular que presentan una morfología redonda y se disponen formando un cúmulo celular (Fig. 9I-O; Fig. 10I-O). De igual forma, se observó una intensa colocalización para vimentina y GFAP, que da cuenta de la presencia de astrocitos hipertróficos característicos de un proceso de activación astrocítica o gliosis reactiva (Fig. 9 J-K, Fig. 10 J-K). En el animal transducido con el virus control, IBA-1 se presenta focalizado en la zona subventricular (fig. 10A-H). Sin embargo, en los cerebros transducidos con Ad-siIIIIG9, el marcaje para IBA-1 es indicativo de la presencia de células microgliales, que se disponen en el foco de la gliosis y entre las células transducidas (fig. 10 K-Ñ).

Se realizó inmunohistoquímica para IIIIG9, para evaluar la inhibición efectiva de IIIIG9 (Fig. 11). El inmunomarcaje para IIIIG9 mostró de que esta proteína se encuentra restringida a los cilios de la pared endimaria transducida, (fig. 11D) de forma similar a lo descrito en rata adulta normal (Cifuentes y col. 2017). En el caso del virus inhibidor, se pierde la integridad de la pared endimaria, observándose un cúmulo de células dispuestas en la cavidad ventricular (área delimitada en líneas entrecortadas) y las células transducidas (GFP+, verde) no presentan marcaje para el anticuerpo anti-IIIIG9 (rojo), corroborando la eficacia de la inhibición. De igual forma, las células no transducidas que presentan IIIIG9 carecen de morfología endimaria (células ciliadas) (fig. 11 E, F). Estos resultados indican que la inhibición

sostenida de IIG9 durante 14 días genera denudación de la pared endimaria y gliosis reactiva en el epitelio endimario adulto.

Los resultados de este capítulo mostraron que IIG9 se localiza en las células endimarias en el SNC de rata adulta, mientras que está ausente en otras células como los tanicitos que recubren el tercer ventrículo ventral y que carecen de múltiples cilios móviles, lo cual corrobora que IIG9 es una proteína expresada en células multiciliadas. IIG9 se localiza en los cilios endimarios y en los bordes celulares tanto *in vitro* como *in situ* utilizando la técnica de *wholemout*, lo cual sugiere una función adicional en la mantención de las uniones célula-célula. La inhibición de IIG9 *in vivo* genera gliosis reactiva característica de una respuesta a una injuria en el sistema nervioso central, generando una cicatriz glial que es independiente del protocolo utilizado para la inhibición, ya que el control genera un fenotipo equivalente a los animales no tratados. La disrupción de la citoarquitectura epitelial en la cavidad ventricular transducida generó una deslocalización del marcaje para IIG9 en las células no transducidas, lo cual sugiere que la localización de IIG9 en los complejos de unión es requerida para la mantención del fenotipo endimario.

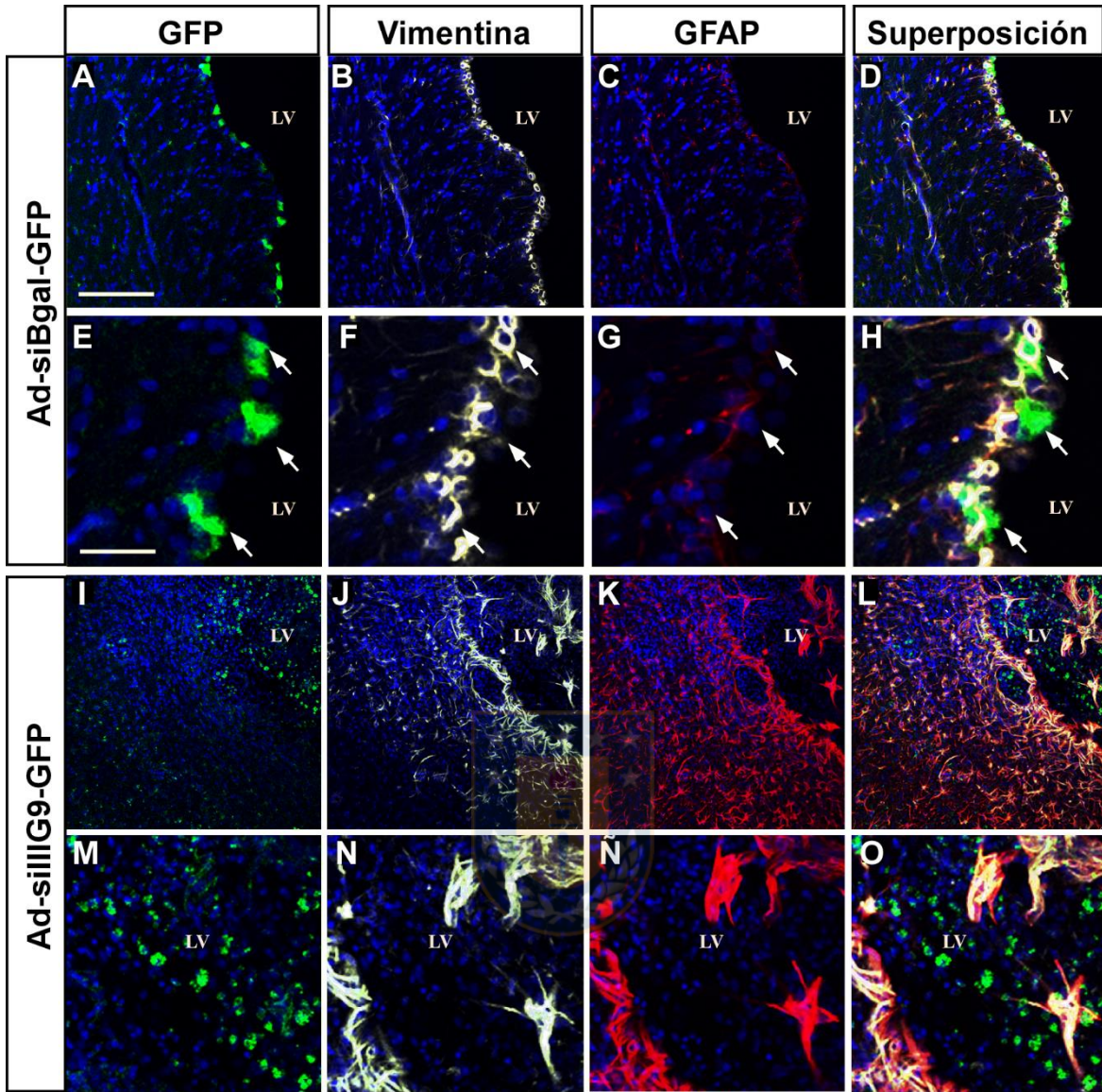


Figura 9. La inhibición sostenida de IIIG9 in vivo genera gliosis reactiva y la formación de cúmulos celulares GFP+ rodeados por la cicatriz glial. Análisis inmunohistoquímico para GFAP y vimentina en el ventrículo lateral de cerebros de rata adulta sometidas a una inyección continua de adenovirus control o inhibidor de IIIG9 durante 14 días. En verde se muestran células transducidas, marcaje para vimentina en blanco, rojo para GFAP y núcleos en azul. **A-H. Pared de ventrículo lateral de rata transducida con virus control Ad-siCtrl-GFP. Las flechas muestran células transducidas control que no presentan marcaje para GFAP. **I-O.** Borde ventricular sin pared ependimaria definida de rata transducida con adenovirus inhibidor de IIIG9 Ad-siIIIG9-GFP donde se observan astrocitos hipertróficos GFAP/vimentina positivos. Aumentos en A-D e I-L: 20X, E-H y M-O: 60X.**

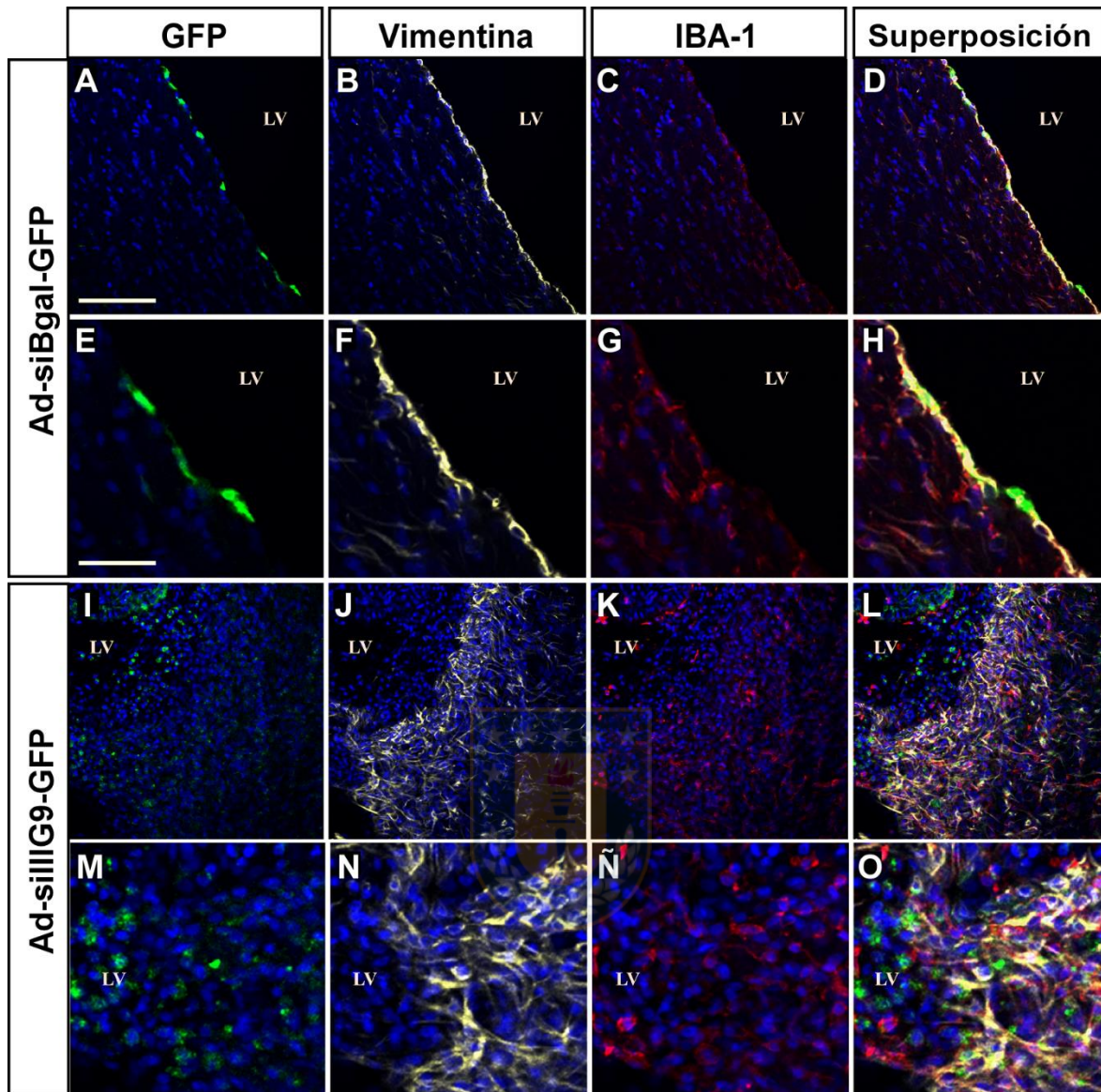


Figura 10. La inhibición sostenida de IIIG9 in vivo genera gliosis reactiva y desorganización de la citoarquitectura ventricular. Análisis inmunohistoquímico para el marcador microglial IBA-1 y vimentina en el ventrículo lateral de cerebros de rata adulta sometidas a una inyección continua de adenovirus control o inhibidor de IIIG9 durante 14 días. En verde se muestran células transducidas, marcaje para vimentina en blanco, rojo para IBA-1 y núcleos en azul. **A-H.** Pared de ventrículo lateral de rata transducida con virus control Ad-siCtrl-GFP. **I-O.** Borde ventricular sin pared endimaria definida de rata transducida con adenovirus inhibidor de IIIG9 Ad-siIIIG9-GFP. Aumentos en A-D e I-L: 20X, E-H y M-O: 60X.

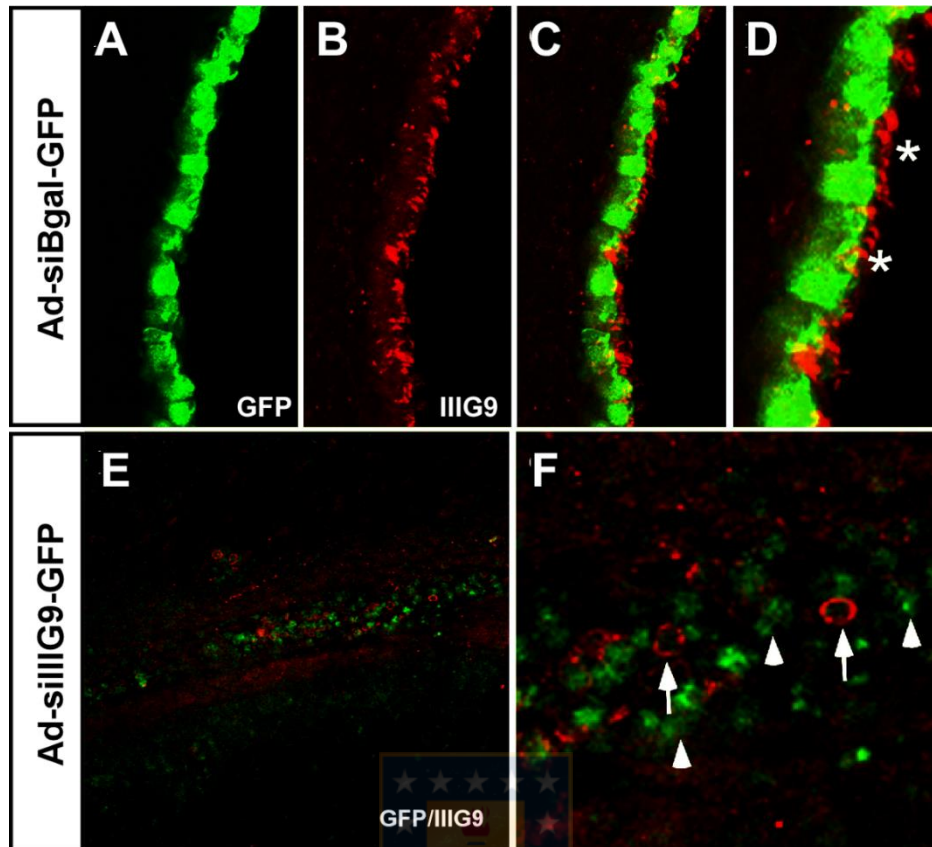


Figura 11. La disrupción de la citoarquitectura epitelial producida por la inhibición de IIIIG9 *in vivo* genera una deslocalización del marcaje para IIIIG9 en las células no transducidas adyacentes. Análisis inmunohistoquímico para IIIIG9 en el ventrículo lateral de cerebros de rata adulta sometidas a una inyección continua de adenovirus control o inhibidor de IIIIG9 durante 14 días. En verde se muestran las células transducidas (GFP) y en rojo se muestra el inmuno-marcaje para IIIIG9. **A, B, C, D.** Pared endimaria de rata transducida con adenovirus control Ad-siβgal-GFP (asteriscos indican el marcaje ciliar de IIIIG9). **E, F.** Borde ventricular sin pared endimaria definida en rata transducida con adenovirus Ad-siIIIIG9-GFP. Las células transducidas (verde) no presentan marcaje para IIIIG9 (rojo) debido a la inhibición viral. Aumentos en A-C: 40X, D: ampliación digital, E: 10X, F: 40X.

4.2. Capítulo 2. Caracterización de IIIG9 durante el periodo de especificación, diferenciación y polarización de las células endimarias, y análisis del fenotipo resultante de la pérdida de función de IIIG9 *in vitro* e *in vivo*.

Los resultados del capítulo anterior mostraron que IIIG9 está presente en los bordes celulares de la célula endimaria, lo que sugiere un posible rol asociado a la mantención de las uniones célula-célula, y su inhibición sostenida genera una disrupción de la citoarquitectura del epitelio endimario adulto. Una interrogante que se extiende de estos resultados consiste en determinar el rol de IIIG9 durante el proceso de especificación, diferenciación y polarización de las células endimarias a partir de la célula troncal que las genera, la glía radial.

Nuestro laboratorio caracterizó la localización de IIIG9 en la pared ventricular embrionaria; determinando su distribución en la glía radial presente en el ventrículo lateral de ratas de 17 días de gestación. En este periodo la glía radial, que generara células endimarias en el estadio postnatal, ya ha adquirido su compromiso de diferenciación (Cifuentes y col. 2017).

En este capítulo caracterizamos la localización de IIIG9 desde el estadio E11 hasta el estadio P15, período que contempla el proceso de especificación, diferenciación y polarización endimaria y evaluamos el efecto de la pérdida de función de IIIG9 en estadios postnatales tempranos, cuando ocurre la diferenciación endimaria.

4.2.1. Localización de IIIG9 durante el desarrollo embrionario y postnatal en las paredes ventriculares.

Mediante RT-PCR convencional evaluamos la presencia del mensajero de IIIG9 en muestras de ARN total de corteza cerebral de rata embrionaria E11, E13, E15, E17, y P1, al igual que muestra de ventrículo lateral de rata adulta como control positivo (Fig. 12, carril 2-7). Para este ensayo utilizamos partidores diseñados para hibridar con ambas isoformas de IIIG9 de rata. La amplificación del transcrito no fue detectada en el estadio E11, sin embargo, se detectaron niveles basales en E13, con un incremento relativo hasta P1. Es interesante destacar los altos niveles de amplificación en el estadio P1, mayor incluso que los niveles de amplificación en el estadio adulto. También se detectó el mensajero de IIIG9 en cDNA de un cultivo primario de neuroesferas (NE) aisladas desde corteza cerebral de rata embrionaria de 17 días, y cultivadas durante 48 horas previo a la extracción de RNA (Fig. 12, carril 9).

Estos resultados muestran un aumento gradual en la expresión de IIIG9 durante el desarrollo de la corteza cerebral embrionaria. Adicionalmente, mostramos que la expresión de IIIG9 se mantiene *in vitro* mediante la propagación de un cultivo primario de neuroesferas proveniente de corteza cerebral de rata E17. Considerando que el mensajero de IIIG9 se encuentra en diversos estadios del desarrollo embrionario del sistema nervioso central embrionario, decidimos caracterizar la localización de IIIG9 en distintos estadios embrionario, utilizando un anticuerpo contra IIIG9 que fue validado y reportado previamente por nuestro laboratorio (Cifuentes y col. 2017). Para esto utilizamos cortes de 7 μ m de grosor

incluidos en parafina de embriones de rata de E11 (Fig. 13 A, E, I, M), E13 (Fig. 13 B, F, J, N), E15 (Fig. 13 C, G, K, Ñ), y E17 (Fig. 13 D, H, L, O). En el estadio 11 se observó que IIIG9 presenta una inmunotinción débil (reacción de color café) en el epitelio que recubre el área anterior del telencéfalo (Fig. 13E) y una marca ligeramente mayor en la zona apical del epitelio posterior del telencéfalo (Fig. 13I). En asterisco se destacaron las áreas ventriculares donde IIIG9 está presente. En flecha se mostraron células parenquimales positivas a IIIG9. De manera interesante, IIIG9 no se encuentra presente en la zona ventricular hacia el mesencéfalo, y se detectaron algunas células positivas para IIIG9 en la zona parénquima del mesencéfalo. En E13, fue posible detectar IIIG9 hacia la zona apical del epitelio ventricular, tanto en el área anterior (Fig. 13F) como hacia el área posterior (Fig. 13N) del ventrículo lateral. En el área medial (Fig 13J), se observaron ciertas células en la zona ventricular positivas para IIIG9, pero no en la zona apical. Esto puede ser debido al ángulo de corte del tejido, el cual no muestra el epitelio adyacente al ventrículo. En el estadio E15, la inmunoreactividad para IIIG9 es intenso, tanto en el área anterior (Fig. 13G), medial (Fig. 13K) y posterior (Fig. 13Ñ) del ventrículo lateral. IIIG9 se concentra hacia la zona ventricular y subventricular. En E17, IIIG9 también fue detectado, con menor intensidad, en el área medial del ventrículo lateral, tanto en la zona ventricular como en la zona subventricular (Fig. 13L). Hacia el área posterior, IIIG9 comienza a concentrarse en la zona ventricular, en mayor intensidad que en la zona subventricular. El área anterior muestra un marcaje débil, posiblemente producto del ángulo de corte que no representa de forma correcta la zona ventricular (Fig. 13H). La inmunorreacción se pierde cuando se suprime la

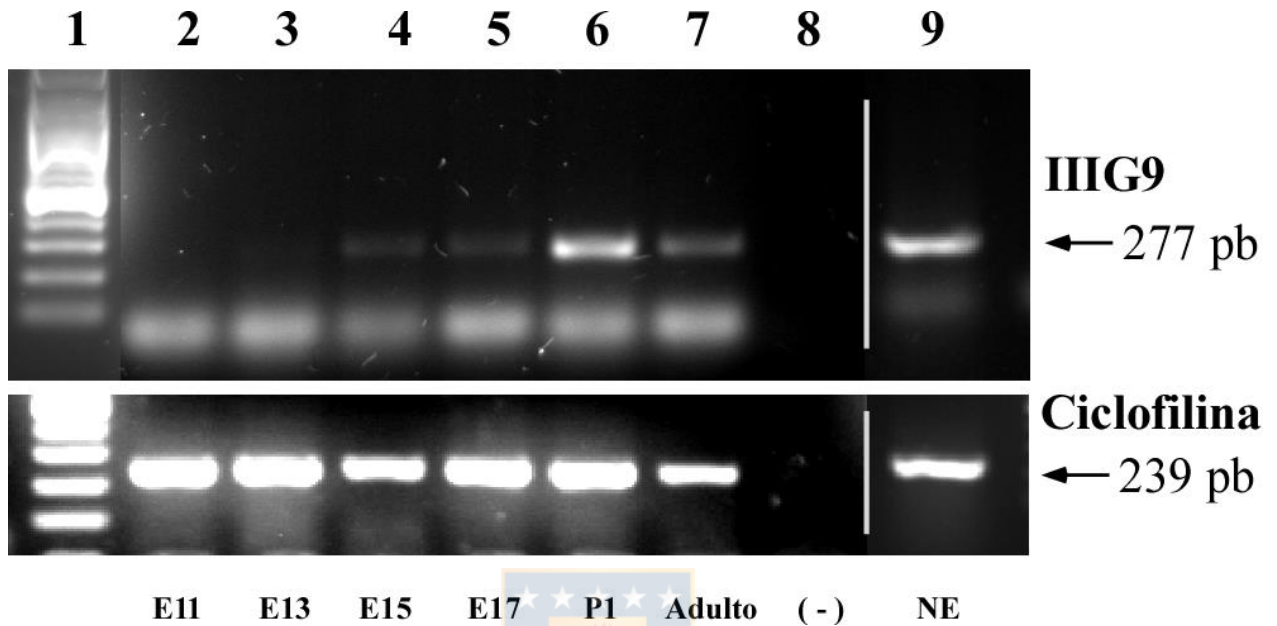


Figura 12. El ARNm de IIIG9 se expresa en distintos estadios del desarrollo embrionario del cerebro de rata. Se utilizaron partidores para amplificar una secuencia de 277 pb de IIIG9 mediante RT-PCR, a partir de 2ug de ARN total de cada muestra. Carril 1: marcador de peso molecular. Carril 2: cDNA de corteza cerebral de rata de 11 días embrionario (E11). Carril 3: cDNA de corteza de día E13. Carril 4: cDNA de corteza de día E15. Carril 5: cDNA de corteza de día E17. Carril 6: cDNA de corteza de día P1. Carril 7: cDNA de ventrículo lateral de rata adulta. Carril 8: Control negativo. Carril 9: cDNA de cultivo primario de neurosfers de corteza de rata E17, cultivada durante 24 horas. La línea vertical blanca indica la separación de imágenes de geles distintos.

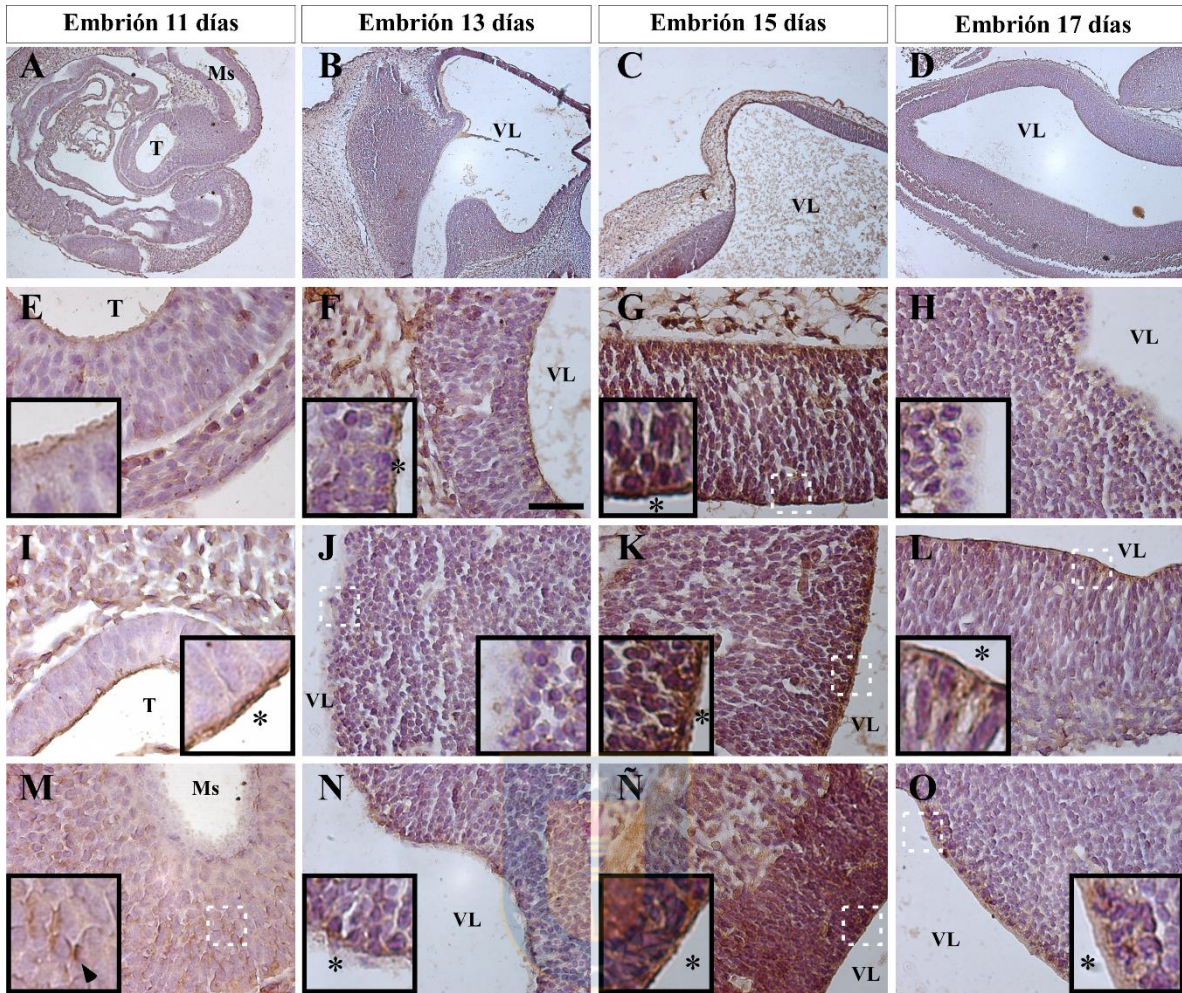


Figura 13. IIIG9 se localiza en la pared ventricular embrionaria durante el período de especificación de la glía radial a célula ependimaria. Análisis inmunohistoquímico de la localización de IIIG9 en diferentes regiones ventriculares del cerebro de rata embrionaria de 11, 13, 15 y 17 días de gestación. **A, E, I, M.** Cortes sagitales de embrión de 11 días. **B, F, J, N.** Cortes transversales de embrión de 13 días. **C, G, K, Ñ.** Cortes transversales de embrión de 15 días. **D, H, L, O.** Cortes transversales de embrión de 17 días. En asterisco se muestra borde ventricular positivo a IIIG9. Cabeza de flecha se muestra células parenquimales positivas a IIIG9. T: telencéfalo; Ms: Mesencéfalo; VL: ventrículo lateral; Aumento: A-D: 20X; E-O 40X. Cuadros en negro, aumento digital en relación 1:2,5 respecto de la imagen original.

incubación con el segundo anticuerpo con nuestro protocolo de trabajo (Fig. 30, Anexo).

A medida que comienza el período de neurogénesis en el desarrollo embrionario E9-10, las células del neuroepitelio comienzan a elongarse y se convierten gradualmente en células de la glía radial (Kriegstein y col. 2009). De esta forma, considerando los resultados previamente indicados es factible que IIIIG9 sea activamente expresado en la glia radial. Para demostrar este concepto, analizamos la codistribución de IIIIG9 y nestina (marcador de glia radial) en cortes sagitales de la pared ventricular de rata, en estadíos embrionarios de 13, 15 y 17 días (Fig. 14). En E13 se observó una distribución citoplasmática de IIIIG9 en las células presentes en las regiones subventriculares, así como también en el borde ventricular y/o citoplasma de las células de la glía radial, que contactan con el ventrículo. Paralelamente, observamos la distribución de nestina a lo largo del soma y el proceso de la glía radial (rojo), en el borde ventricular (Fig. 14C, F). De manera similar, en el cerebro embrionario E15, IIIIG9 se observó en el borde ventricular, y distribuida en puntos discretos en el soma de células que además fueron positivas para nestina (Fig. 14 I-K, flechas). En E17, IIIIG9 se observó en las células ventriculares y subventriculares. La corteza cerebral externa presenta células positivas para IIIIG9 y negativas para nestina, que podrían corresponder a neuroblastos en migración hacia la corteza (Fig. 14 Q, R, S, flecha). A nivel de las células ventriculares, la reacción para IIIIG9, se observó preferentemente en el borde apical y lateral (fig. 14M). Por lo tanto, IIIIG9 se expresa en estadíos tempranos del

desarrollo de la corteza cerebral, localizándose a nivel apical. Además, su expresión y localización se mantiene en la pared ventricular de cerebro E17.

Posteriormente, realizamos un análisis inmunohistoquímico para detectar IIIG9 en cortes sagitales de 7 μm de grosor, en la pared ventricular de ratas de estadio embrionario 13, 15 y 17. En estas muestras se utilizaron marcadores de adhesión célula – célula como β -catenina y Pan-cadherina, al igual que vimentina (Fig. 15). En el estadio E13 (Fig. 15 A-H) se observó la localización citoplasmática de IIIG9, y una codistribución parcial con los marcadores de adhesión celular Pan-Cadherina y β -catenina. IIIG9 y vimentina se observaron en la zona ventricular y subventricular. En el estadio E15 (Fig. 15 A'-H'), se observó la codistribución parcial entre IIIG9 y Pan-cadherina, en los bordes celulares. El marcaje para β -catenina en este estadio también se encuentra en el núcleo celular además de su localización en los bordes celulares y el citoplasma. Tanto IIIG9 como vimentina se localizan en la zona ventricular y subventricular. En el cerebro embrionario E17 (Fig. 15 A''-H''), incrementa la codistribución de los marcadores de adhesión celular y IIIG9. Se observó el marcaje de vimentina en la zona ventricular y subventricular. Sin embargo, el marcaje de IIIG9 se localizó de manera más intensa en la zona ventricular, que en la zona subventricular (Fig. 13 L, O). Los resultados indican un aumento de la polarización apical (ventricular) de IIIG9 a medida que avanza el desarrollo embrionario del sistema nervioso central.

Para establecer un análisis comparativo global en el epitelio ventricular, durante el proceso de diferenciación y polarización de la glía radial hacia célula endimaria, hemos utilizado la técnica en-face *wholemout*, que involucró la

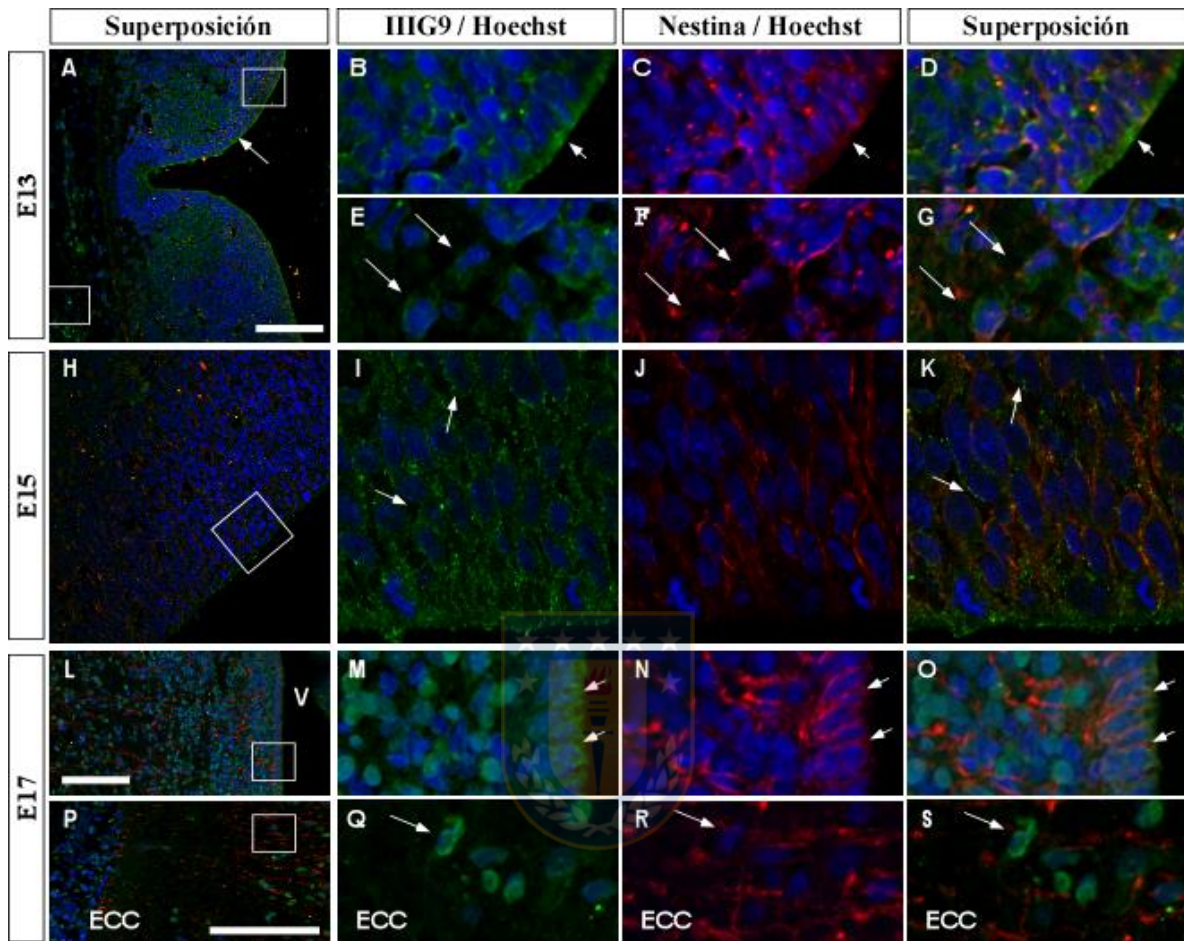
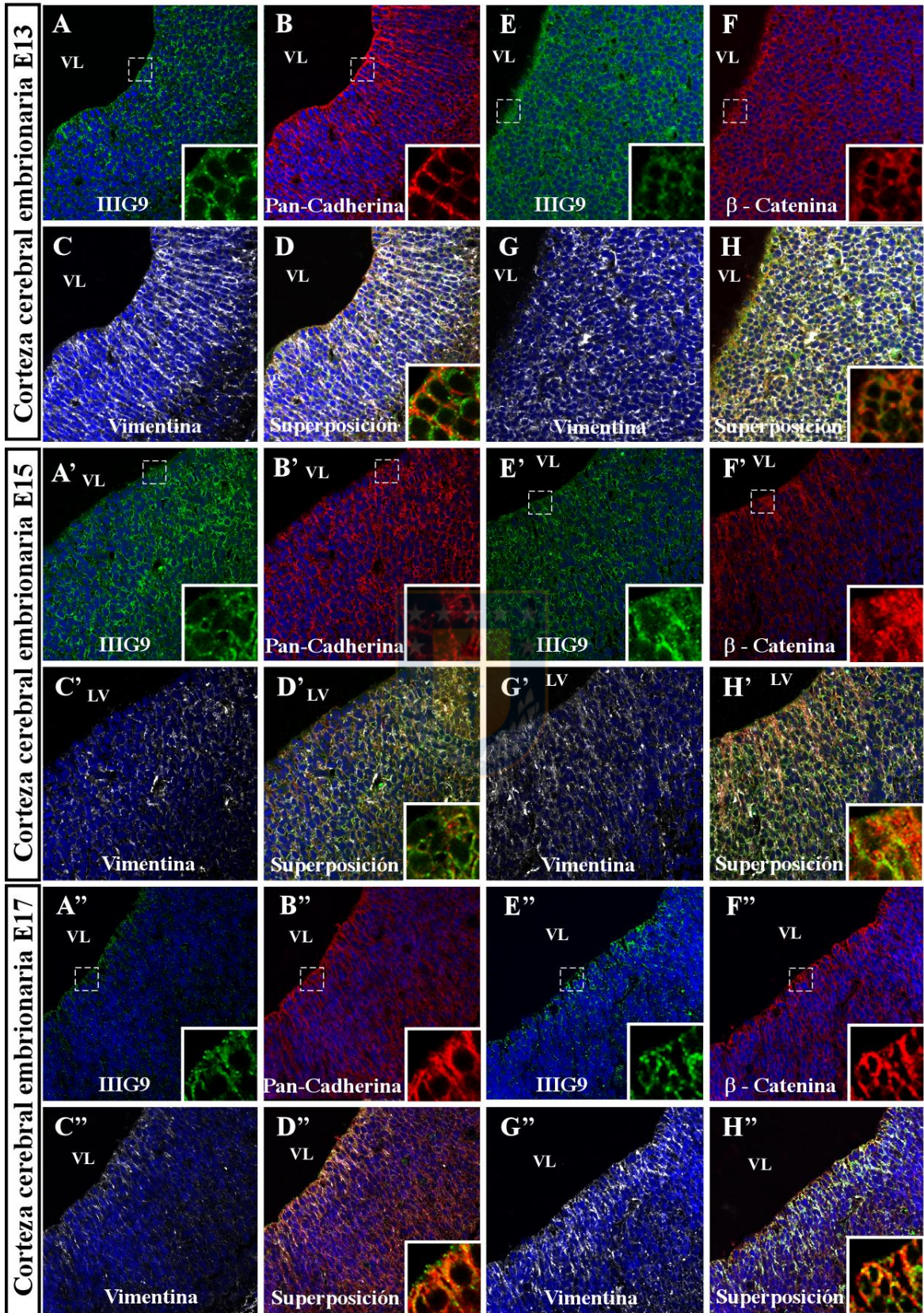


Figura 14. Análisis de la distribución de IIIG9 en distintas regiones del sistema ventricular de rata de 13, 15 y 17 días de gestación. Inmunofluorescencia realizada en cortes coronales de cerebro de rata de 7 μm de grosor, incubados con anti-IIIG9 (rojo), Nestina (verde) y Hoechst (azul). **A-G.** Análisis de inmunofluorescencia en cerebro E13. **H-K.** Inmunofluorescencia en cerebro E15. **L-S.** Análisis de inmunofluorescencia en cerebro E17. En las células ventriculares se mostró un patrón de inmunoreactividad asociado a los bordes celulares, mientras que, en la corteza cerebral, IIIG9 también se encuentra en células negativas a Nestina (flechas). ECC: corteza cerebral embrionaria. Barra de aumento, 100 μm .

Figura 15. Codistribución de IIIG9 con marcadores de unión célula-célula en el ventrículo lateral de ratas de 13, 15 y 17 días de gestación. Inmunofluorescencia y análisis de microscopía confocal, de cortes coronales de cerebro de rata de 7 μm de grosor, de estadíos E13 (**A-H**), E15 (**A'-H'**) y E17 (**A''-H''**). Marcaje para IIIG9 (verde), Pan-cadherina (B, D, en rojo), β -catenina (F, H, en rojo), vimentina (blanco) y Hoechst (azul). En los estadíos embrionarios, IIIG9 se localiza preferentemente en los bordes celulares de la glía radial y se co-distribuye con marcadores de adhesión celular, como Pan-cadherina y β -catenina. Aumento 20X.



disección de la pared endimaria (Mirzadeh y col. 2010). Esta técnica nos permitió obtener la cara ventricular de la pared endimaria (Fig. 6I) en estadios E17, P1, P3, P5, P7, P10 y P15 y realizar el análisis de las proteínas de adhesión celular, estudiando su distribución en el plano Z por medio de microscopía confocal (Fig. 16 panel A). Tras la disección, se realizó inmunohistoquímica utilizando los anticuerpos anti-Pan-cadherina, anti-vimentina y anti-IIIIG9 para los estadios mencionados (Fig 16 panel B).

En el estadio E17 se observó que IIIIG9 marca los bordes celulares (Fig. 16C) y genera una codistribución de IIIIG9 y pan-cadherina (Fig. 16D). El marcaje para vimentina y IIIIG9 están ampliamente distribuido en la superficie ventricular (Fig. 16A, E). En las células positivas a vimentina, IIIIG9 se observó con un marcaje continuo en el borde celular, demarcado por pan-cadherina. En las células con marcaje débil o negativo para vimentina, IIIIG9 se observó con un marcaje punteado y discontinuo, cercano a los bordes celulares, demarcados por pan-cadherina (Fig. 16D, H). En el estadio P1, la distribución de IIIIG9 se desorganiza de los bordes celulares, lo cual genera un patrón punteado discontinuo, en gran parte de la superficie ventricular (Fig. 16C'). Se observaron algunas células que presentan un marcaje para IIIIG9 intenso a nivel citoplasmático (Fig. 16C', D'). Las células que presentan IIIIG9 citoplasmático intenso presentan un marcaje de vimentina intenso (Fig. 16 G', H'). En el estadio P3, se observó un aumento en la cantidad de células positivas a IIIIG9, que son positivas también a vimentina (Fig. 16G''). El marcaje de IIIIG9 se codistribuye con el marcaje de pan-cadherina, de forma parcial (Fig. 16D''), sin embargo, dicha codistribución es menos pronunciada que lo observado en E17.

Estos resultados indican una distribución altamente heterogénea de IIIIG9 en la superficie ventricular y una deslocalización de las uniones célula-célula durante el inicio de la diferenciación de la glía radial a célula endotelial.

En modelo murino, la diferenciación y maduración endotelial comienza en el nacimiento y se considera completa en el estadio P21. Sin embargo, ya en el estadio P15, el fenotipo endotelial en las paredes ventriculares es similar a lo observado en el adulto (Tramontin y col. 2003). Realizamos análisis de *wholemout* de ventrículo lateral de ratas de P5, P7, P10 y P15, para demostrar la localización y distribución de IIIIG9 durante la maduración endotelial.

Tanto en el estadio P5 y P7, identificamos dos subpoblaciones celulares que se distinguen por la localización citoplasmática intensa de IIIIG9, o baja intensidad de IIIIG9. Estas células se agrupan formando un mosaico celular en la cual se observó que las células que presentan una localización citoplasmática intensa de IIIIG9 son mayoritarias en P5 y P7 (Fig. 7, C, D). Estas células positivas a IIIIG9 también son positivas para vimentina (Fig. 17 I, J). Las células que no presentan marcaje citoplasmático para IIIIG9, presentan un patrón punteado en los bordes celulares (Fig. 17C, E) o en un punto discreto de la célula (Fig. 17D, F, flecha).

En el estadio P10 y P15, la mayoría de las células son positivas para IIIIG9 y vimentina (Fig. 18). Algunas células que presentan poco marcaje para IIIIG9, presentan un punto discreto (Fig. 18C, E, flecha) de manera similar a lo observado en P7. En P15 se observó que la mayoría de las células de la superficie ventricular son positivas para IIIIG9 y vimentina, siendo el marcaje para IIIIG9 polarizado hacia

los bordes celulares. Las células positivas a IIIIG9 se agrupan en “clusters” y rodean a las células negativas a IIIIG9 y vimentina (Fig. 18J).

Estos resultados indican que la maduración de la glía radial hasta célula endimaria requiere de dos instancias a nivel temporal: i) la desorganización de la localización de IIIIG9 de los bordes celulares, en el estadio E17-P3, y ii) un aumento importante en la expresión de IIIIG9 a nivel citoplasmático. De esta manera, las células endimarias pueden completar su maduración.

El proceso de maduración endimaria en los ventrículos laterales ocurre en un gradiente de ventral a dorsal, y posterior a anterior (Spassky y col. 2005). En los resultados anteriores, realizamos la disección de *wholemout* en distintos estadios del desarrollo y realizamos el análisis de microscopía confocal espectral en una misma área, como se muestra en los esquemas, lo cual hace comparable los resultados en el tiempo. Para realizar una comparación espacial, elegimos el estadio P7 y analizamos un área posterior del ventrículo lateral (Fig. 19 A, B, flecha), y un área anterior cercana al bulbo olfatorio (Fig. 19 A, B, punta de flecha). Observamos que el área posterior del ventrículo lateral presenta un gran porcentaje de células positivas a IIIIG9 y vimentina (Fig. 19 I), mientras que el número disminuye considerablemente en el área anterior (Fig. 19J). En las áreas posteriores, se observó una mayor cantidad de células con marcaje citoplasmático intenso para IIIIG9, hacia el área ventral (datos no mostrados).

Para corroborar nuestros resultados respecto del gradiente posterior-anterior de IIIIG9 observado utilizando la técnica de *wholemout*, realizamos una comparación espacial en ventrículo lateral posterior y anterior en estadio P5,

utilizando GLUT-1 como un marcador de diferenciación endimaria validado por nuestro laboratorio que sigue dicho gradiente posterior-anterior (Silva-Alvarez y col. 2005), y ZO-1 como marcador de uniones célula-célula (Fig. 20). Observamos que el área posterior del ventrículo lateral presenta un alto porcentaje de células positivas a GLUT-1 (Fig. 20I), mientras que el número disminuye considerablemente en el área anterior (Fig. 20J). Adicionalmente, observamos en la zona anterior, que algunas células tienen un marcaje heterogéneo para GLUT-1 y presentan un punto discreto (Fig. 20 D, cabeza de flecha). Estos puntos discretos son similares a los observados en P7 y P10 para IIG9 (Fig. 17F, 18E, flecha). En el área posterior, se observaron células de área más pequeña negativas para el marcaje de GLUT-1. En conjunto estos resultados indican que la aparición de células con marcaje citoplasmático intenso para IIG9 sigue un gradiente posterior-anterior y ventro-dorsal.



Figura 16. III G9 de deslocaliza de las uniones célula-célula durante el inicio de la diferenciación endimaria. A. Protocolo obtención *wholemout*. Se realizó disección de la cara estriatal de la pared endimaria. Una vez disectada, se montó con el epitelio endimario hacia arriba y se eligió una zona anterior para el análisis. **B.** Caracterización de la localización de III G9 en el epitelio del ventrículo lateral de rata de 17 días de gestación, 1 día postnatal y 3 días postnatal. Inmunofluorescencia de la superficie ventricular utilizando montaje de la pared endimaria completa (*wholemout*), fijada con para-formaldehído y marcada contra III G9 (verde), Pan-cadherina (rojo), vimentina (blanco), y Hoechst (azul). Estadios E13 (**A-H**), E15 (**A'-H'**) y E17 (**A''-H''**). En estadio E17, III G9 se distribuye en patrones punteados discretos hacia los bordes celulares de la glía radial. Esta localización se desorganiza en los estadios tempranos P1 y P3. Hacia P3 se observan un porcentaje menor de células de marcaje citoplasmático para III G9, las cuales son positivas para vimentina. Barra de aumento 100 μm para A, 20 μm para C.

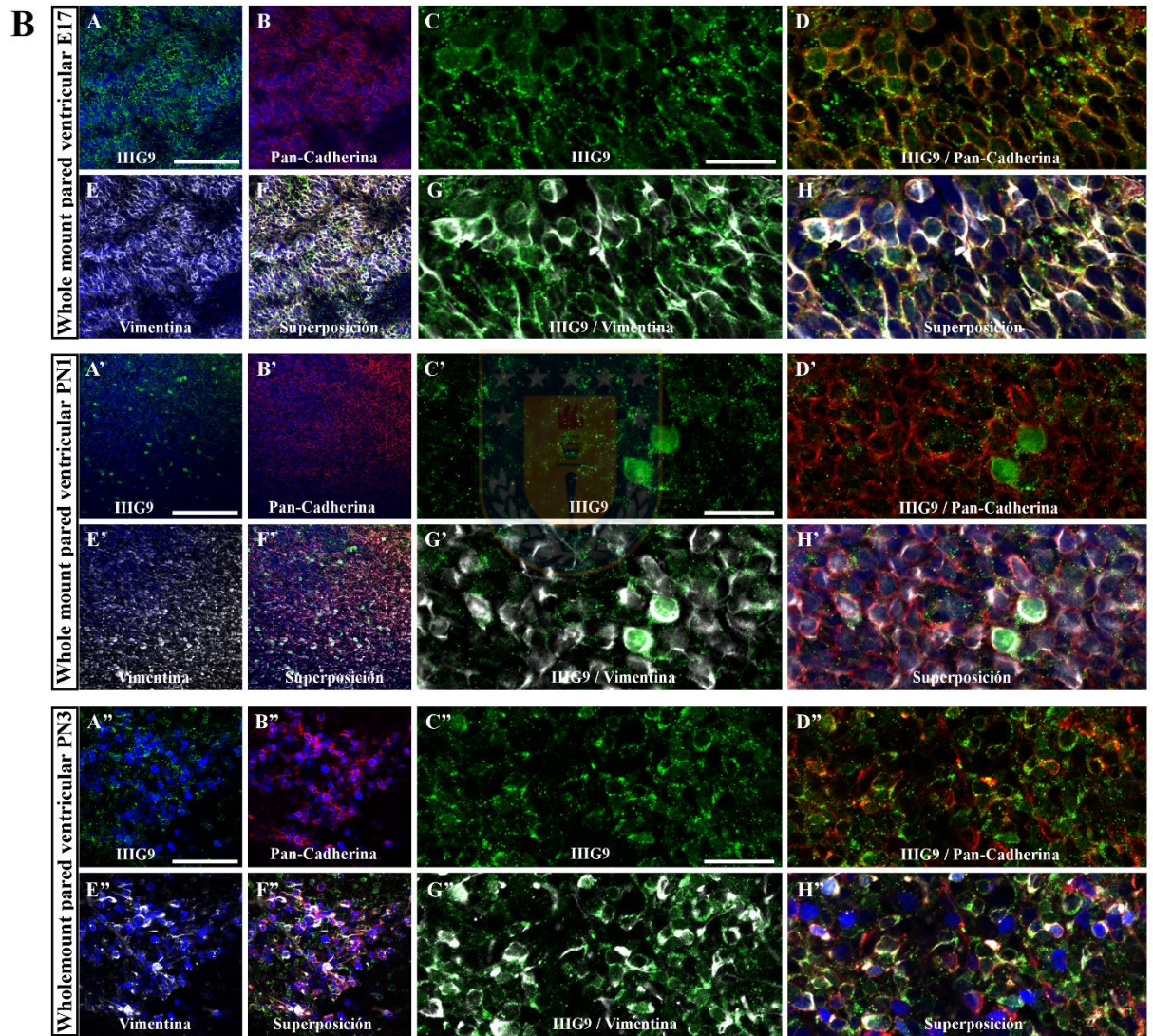
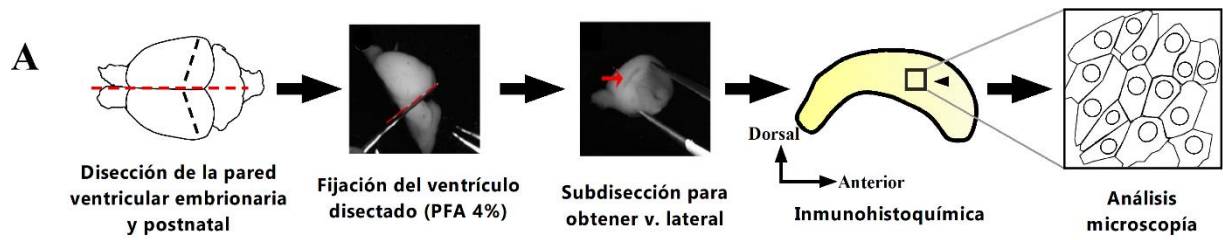


Figura 17. Identificación de dos subpoblaciones que forman un mosaico de células agrupadas dependiendo de la localización citoplasmática de IIIIG9 en el epitelio del ventrículo lateral de rata de 5 y 7 días postnatal. Inmunofluorescencia de la superficie ventricular utilizando *wholemout* marcado contra IIIIG9 (verde), Pan-cadherina (rojo) y vimentina (blanco). El esquema de la zona superior permite identificar el lugar de la disección (**A**) y el área de análisis (**B**). Estadios P5 (**C, E, G, I**) y P7 (**D, F, H, J**). En estos estadios, se observa una alta cantidad de células de marcaje citoplasmático para IIIIG9. En el estadio P7, un porcentaje menor de células que carece de marcaje de IIIIG9 citoplasmático intenso, presenta un punto discreto que no colocaliza con el marcador Pan-cadherina (flecha en F). Cuadro en blanco representa aumento digital en P5 (**C', E', G', I'**) y P7 (**D', F', H', J'**). Barra de aumento 100 μm .

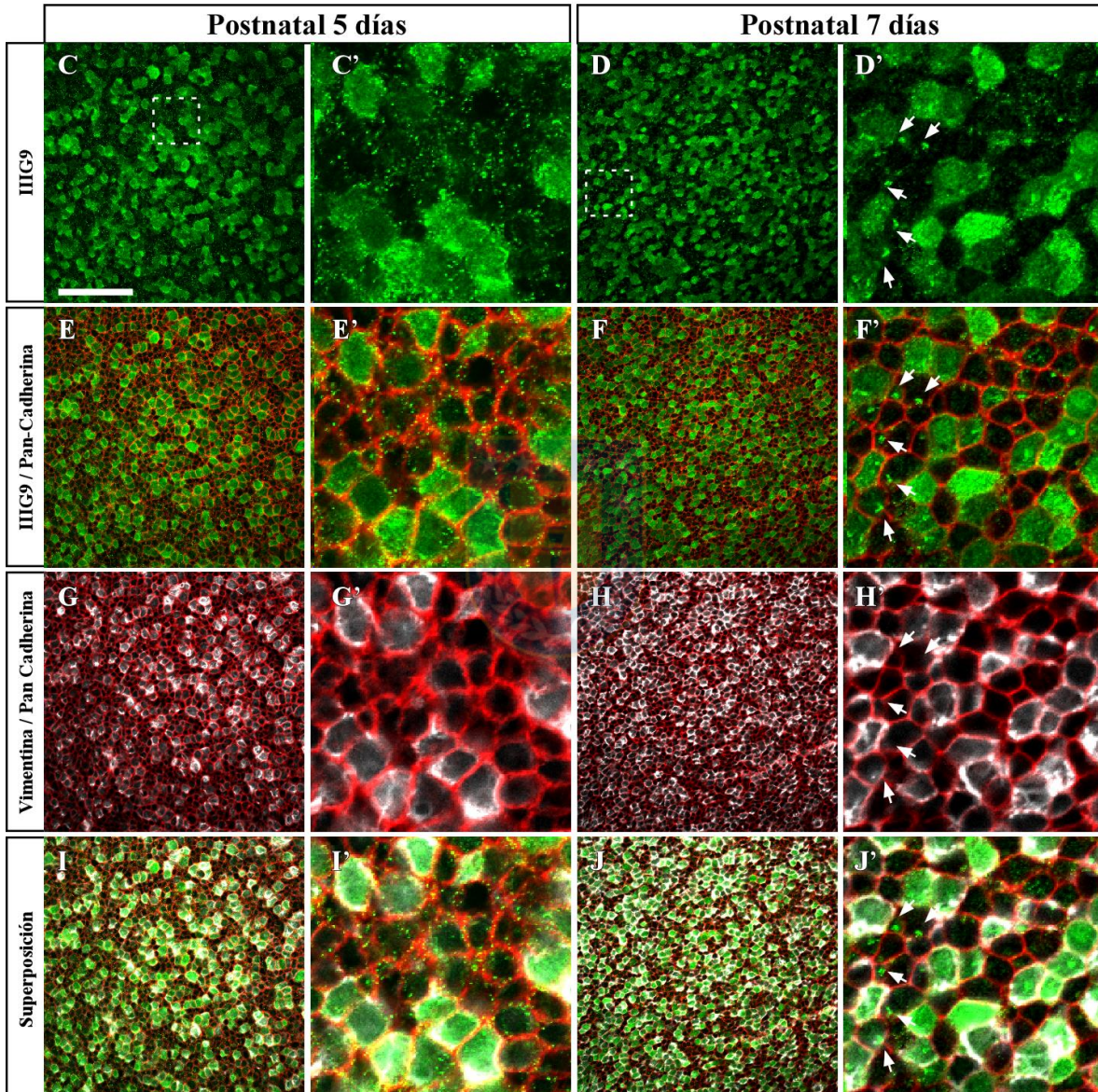
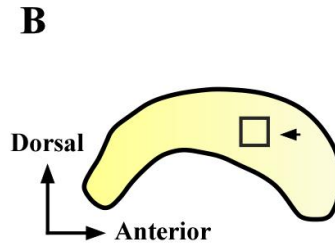
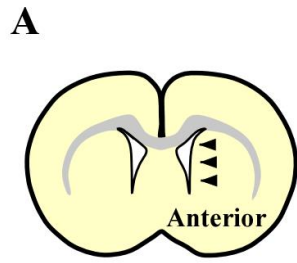


Figura 18. IIIIG9 se localiza en la gran mayoría de las células que recubren el epitelio del ventrículo lateral de rata de 15 días postnatal, de manera equivalente a la localización en el epitelio endimario adulto. Caracterización confocal espectral de la localización de IIIIG9 en el epitelio del ventrículo lateral de rata de 10 y 15 días postnatal. Inmunofluorescencia de la superficie ventricular utilizando *wholmount* marcado contra IIIIG9 (verde), Pan-cadherina (rojo) y Vimentina (blanco). El esquema de la zona superior permite identificar el lugar de la disección (**A**) y el área de análisis (**B**). Estadios P10 (**C**, **E**, **G**, **I**) y P15 (**D**, **F**, **H**, **J**). En el estadio P10, se observa una alta cantidad de células células de marcaje citoplasmático para IIIIG9, mientras que en P15, el marcaje de IIIIG9 vuelve a reorganizarse hacia los cilios (plano de corte no mostrado) y hacia los bordes celulares. En P10, un porcentaje menor de células que carece de marcaje de IIIIG9 citoplasmático intenso, presenta un punto discreto que no colocaliza con el marcador Pan-cadherina (flechas). En P15 se observan células IIIIG9 negativo y vimentina negativo rodeadas de células positivas para ambos marcadores (cabeza de flecha). Cuadro en blanco representa aumento digital en P10 (**C'**, **E'**, **G'**, **I'**) y P15 (**D'**, **F'**, **H'**, **J'**). Barra de aumento, 100 μm .

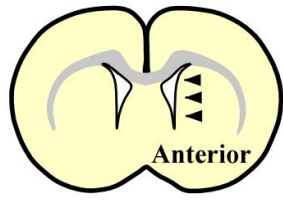
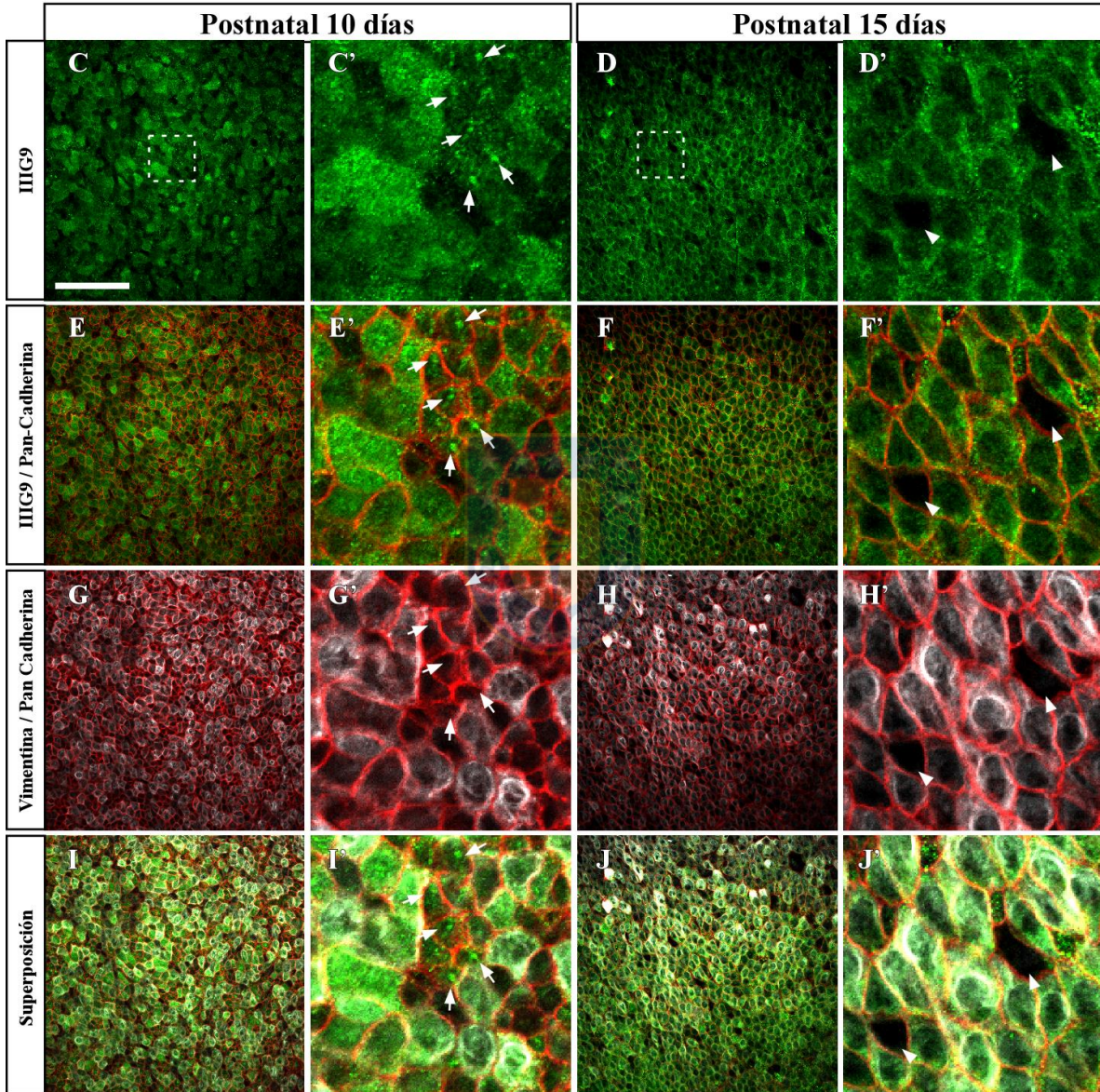
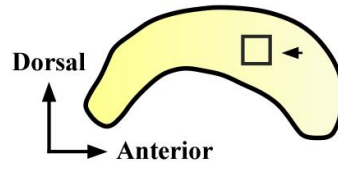
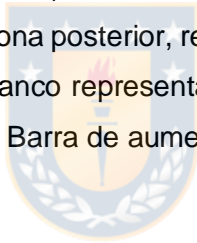
A**B**

Figura 19. La cantidad de células positivas a IIIIG9 citoplasmático sigue un gradiente caudorostral en el epitelio del ventrículo lateral de rata de 7 días postnatal. Inmunofluorescencia de la superficie ventricular utilizando *wholemout* marcado contra IIIIG9 (verde), Pan-cadherina (rojo), vimentina (blanco). El esquema de la zona superior permite identificar el lugar de la disección (**A**) y las áreas de análisis (**B**). Estadío P7 posterior (**C, E, G, I**) y anterior (**D, F, H, J**). Se observa una mayor cantidad de células que presentan IIIIG9 citoplasmático en la zona posterior, respecto de la zona anterior, de manera correlativa a vimentina. Cuadro en blanco representa aumento digital en P7 posterior (**C', E', G', I'**) y P7 anterior (**D', F', H', J'**). Barra de aumento 200 μm .



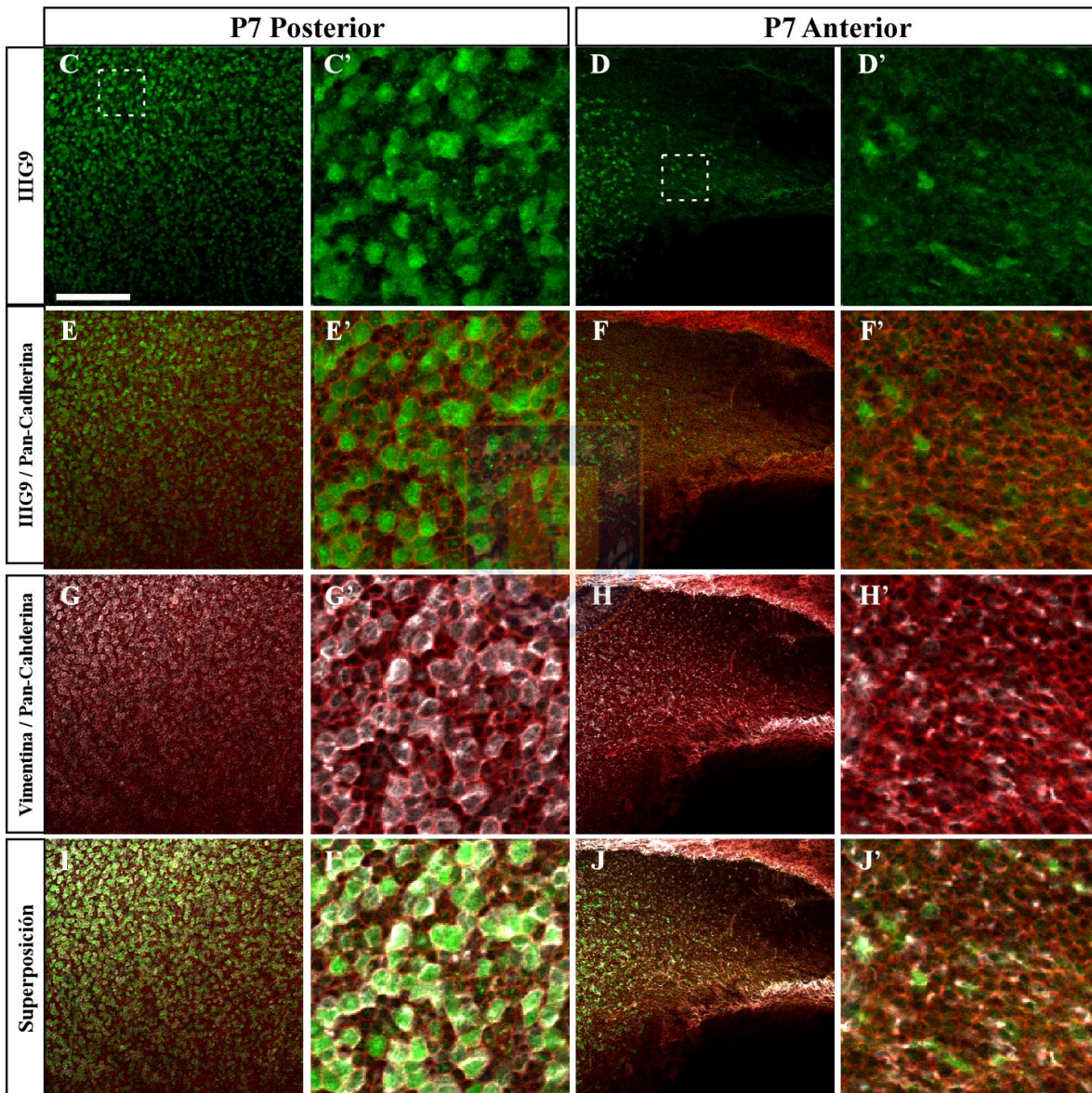
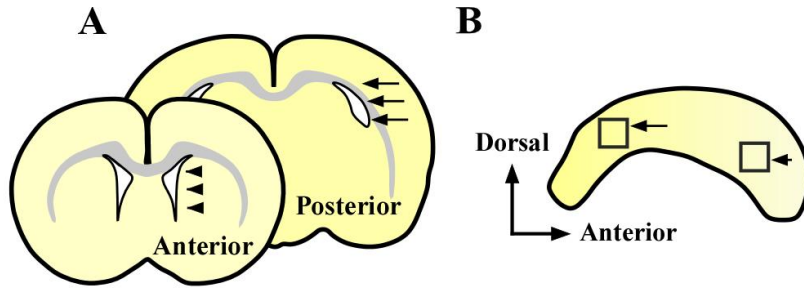
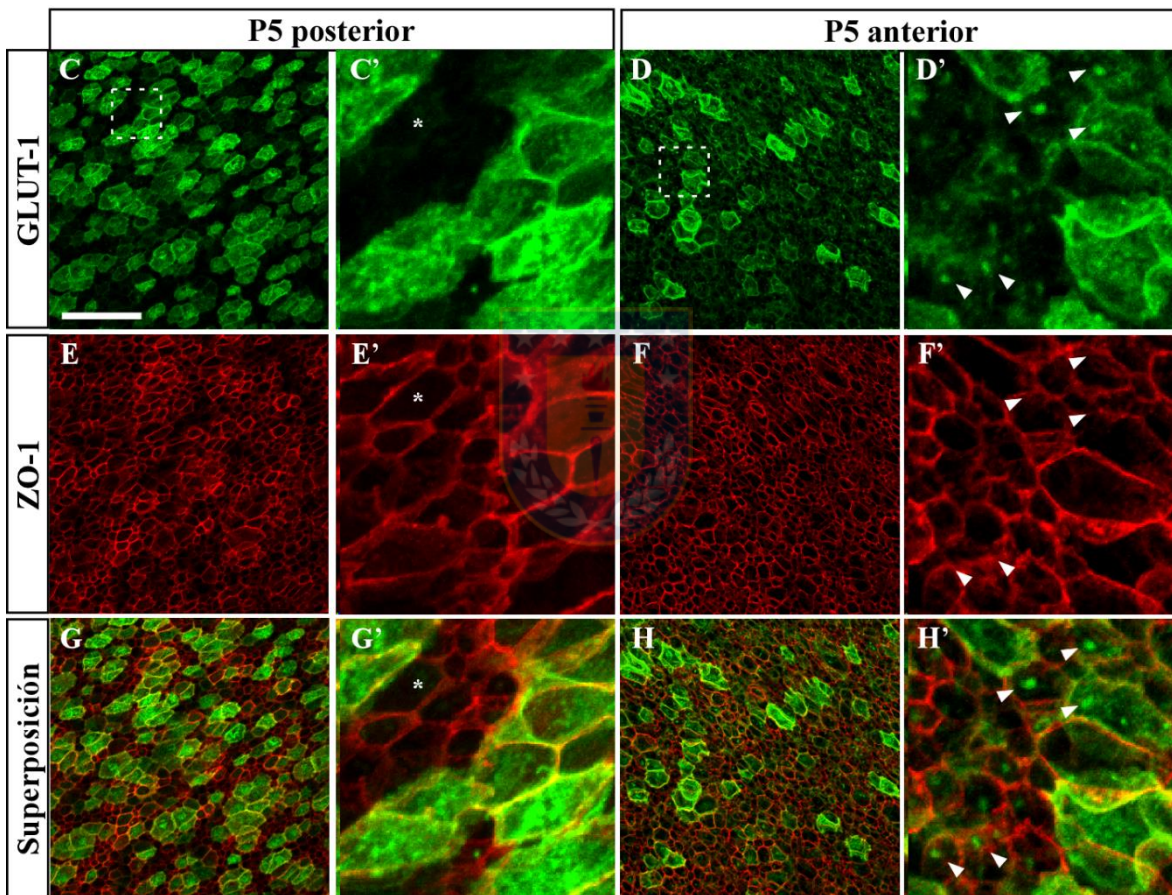
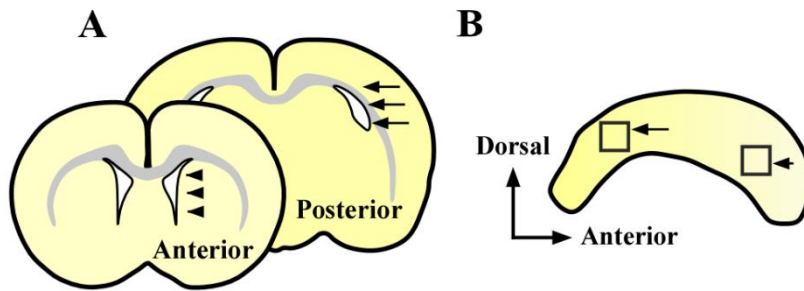


Figura 20. La cantidad de células positivas a GLUT1 citoplasmático sigue un gradiente caudorostral en el epitelio del ventrículo lateral de rata de 5 días postnatal. Inmunofluorescencia de la región anterior y posterior del ventrículo lateral de rata de 5 días postnatal, utilizando la técnica de *wholemout* marcada contra GLUT1 (verde) y ZO-1 (rojo). El esquema de la zona superior permite identificar el lugar de la disección (**A**) y las áreas de análisis (**B**). Estadío P5 posterior (**C, E, G,**) y anterior (**D, F, H**). Se observa una mayor cantidad de células que presentan GLUT1 a nivel de la membrana citoplasmática, en la zona posterior respecto de la zona anterior. En la zona anterior algunas células que carecen de marcaje de GLUT1 intenso, presentan un punto discreto (cabeza de flecha), lo cual no ocurre en la zona posterior (asterisco). Cuadro en blanco representa aumento digital en P5 posterior (**C', E', G'**) y P5 anterior (**D', F', H'**). Barra de aumento, 100 µm.



4.2.2. Análisis del fenotipo resultante de la pérdida de función de IIIG9 *in vitro* e *in vivo*.

La expresión de IIIG9 comienza en estadíos tempranos del desarrollo, y logramos detectar su expresión y localización en el estadío E13-E15, cuando ocurre el proceso de especificación de la glía radial hacia célula endimaria (Spassky y col. 2005). La distribución de IIIG9, durante el desarrollo embrionario y postnatal, está asociada a los complejos de unión de la glía radial, lo cual es indicativo de una posible función en la adhesión celular. Además, en los estadíos postnatales aparecen células altamente positivas para IIIG9, probablemente representando un evento requerido para la correcta polarización endimaria. Para evaluar la función de IIIG9 en los estadíos postnatales tempranos, decidimos analizar el fenotipo resultante de la pérdida de IIIG9 *in vitro* e *in vivo*. Nuestro laboratorio cuenta con adenovirus que permiten la inhibición de la traducción del ARN mensajero de IIIG9 (AdsiIIIG9), o la inhibición de β gal (AdsiBgal), utilizado como control negativo.

En primera instancia, utilizamos un modelo *in vitro* para evaluar la inhibición de IIIG9. Decidimos analizar el fenotipo de la inhibición de IIIG9 en un cultivo primario de neuroesferas, proveniente de la corteza de rata, E17. Adicionalmente detectamos la expresión del mensajero de IIIG9 en las células en cultivo (Fig. 12, Carril 9). Tras 24 horas, las esferas en suspensión fueron traspasadas a un nuevo frasco, y se agregó adenovirus inhibidor de IIIG9 (Ad-siIIIG9) o control (Ad-si β gal). Luego de 48 horas, las NE fueron sembradas en vidrio tratado con poli-L-lisina y se realizó inmunomarcaje para IIIG9, GFAP como marcador de linaje astrocítico y tubulina- β III como marcador de linaje neuronal. Observamos que las neuroesferas

tratadas con Ad-sIIIIG9, representaron el doble de las neuroesferas tratadas con Ad-si β gal (Fig. 21B). Tanto en la condición control como en la inhibición de IIIIG9, se observó una transducción parcial de los esferoides (Fig. 21C, G). En la condición control, la neuroesfera presenta IIIIG9 citoplasmático, marcaje para tubulina- β III (Fig. 21E) y un marcaje heterogéneo y discreto para GFAP (Fig. 21F). Observamos que al inhibir IIIIG9 en las neuroesferas, el inmunomarcaje para IIIIG9 disminuye, el marcaje para tubulina- β III también disminuye levemente (Fig. 21I), y de manera interesante, el marcaje para GFAP aumenta y se generan células de morfología alargada (Fig. 21J). Estos resultados indican (si el modelo de cultivo emula la condición de desarrollo embrionario), que la inhibición de IIIIG9 podría interferir en la generación de células positivas a tubulina- β III, y promover la formación de células GFAP positivas de morfología alargada.

En una segunda instancia, realizamos la inhibición de IIIIG9 *in vivo*. Decidimos evaluar el fenotipo resultante de la inhibición de IIIIG9 en ventrículo lateral de rata hacia el inicio de la diferenciación endimaria, desde el estadio P1, donde se realizó una inyección única de adenovirus control (Fig. 22 **A, C, E G**) o inhibidor (Fig. 22 **B, D, F, H**), que fueron mantenidos hasta P7, para su análisis. Los resultados del ensayo inmunohistoquímico mostraron que, en los animales controles, la pared endimaria mantiene su integridad (continuidad); junto con la localización de astrocitos subventriculares y en el parénquima cerebral. Estos resultados indican que la administración única del virus control al ventrículo lateral, (mantenido por 7 días), no genera eventos de gliosis reactiva como respuesta al virus, y mantiene un fenotipo equivalente al de un animal postnatal no inyectado. En los animales

inyectados con el virus inhibidor, en cambio, se genera una gliosis reactiva, (Fig. 22 D, F, líneas punteadas), donde el marcaje para GFAP se exagera. También se observa un engrosamiento de la pared ventricular y se genera un cúmulo de células transducidas positivas a GFP, hacia la zona ventricular, que está siendo rodeada por la cicatriz astrogliosa.

Esta respuesta secundaria ocurre cuando existe injuria en el sistema nervioso central, y se genera una cicatriz glial que permite aislar la zona de daño o de infección. Utilizando nuestro protocolo, no observamos dicho evento al inyectar el virus control, por lo que la gliosis podría ser una consecuencia secundaria de la disrupción de la zona ventricular generada por la inhibición de IIIIG9 en el estadio postnatal. El análisis inmunohistoquímico realizado no fue capaz de sugerir la naturaleza de este cúmulo de células transducidas que obstruye el ventrículo lateral.

Tabla 3. Evaluación de características fenotípicas presentes en el epitelio del ventrículo lateral de rata de 7 días postnatal, sometida a inyección única

Fenotipo evaluado	Ad si-βgal	Ad si-IIIIG9
Transducción pared ventricular lateral	6/6	3/3
Transducción de plexos coroideos	6/6	3/3
Procesos radiales subventriculares GFP+	6/6	0/3
Neuroblastos migratorios GFP+ en parénquima cerebral	6/6	0/3
Cúmulos de células GFP+ hacia el ventrículo lateral	0/6	2/3

Analizamos cortes seriados de animales transducidos con **Ad si-βgal** o **Ad si-IIIIG9** en la búsqueda de características fenotípicas diferenciales, entre estas dos

condiciones de trabajo (Tabla 3). Seis animales control fueron analizados, mientras que 3 animales con inhibición de IIIIG9 fueron analizados. En todos los casos evaluados, existe transducción de la pared ventricular. Todos los animales evaluados también presentaron transducción de los plexos coroídeos. En el caso del control, se observó una transducción intensa de la pared ventricular, de morfología tisular equivalente a un animal no transducido. También se observó la presencia de numerosos procesos radiales elongados, que corresponderían a los procesos de la glía radial postnatal, que toman contacto con la superficie pial. Adicionalmente, observamos neuroblastos que migran a través de dichos procesos, en el ventrículo lateral de los 6 animales control evaluados. En el caso de la pared ventricular de los animales sometidos a la inhibición de IIIIG9, observamos ciertas áreas ventriculares, donde no se detectó transducción adenoviral. No se observan procesos radiales subventriculares, así como tampoco se observan neuroblastos GFP+, en ninguno de los 3 animales evaluados. En 2 de 3 animales sometidos a Ad si-IIIIG9, se detectaron cúmulos de células transducidas que ocluyen el ventrículo lateral (Fig. 22H como muestra representativa).

Los resultados presentados en este capítulo muestran que IIIIG9 se expresa en estadios embrionarios, desde E11. En los estadios embrionarios se localiza en la zona subventricular y ventricular, y se codistribuye con marcadores de adhesión celular. En los estadios P3-P5, adicional a la localización de IIIIG9 en los bordes celulares, aparecen células de marcaje citoplasmático intenso para IIIIG9, que siguen un gradiente posterior-anterior durante el período de maduración endimaria. Además, la inhibición de IIIIG9 durante el proceso de polarización del

epitelio endotelial postnatal afecta de manera negativa el número de procesos radiales y por consiguiente de neuroblastos migratorios generando una interrupción de la continuidad de la pared ventricular y un proceso de gliosis reactiva de manera similar al inhibir IGF9 en el epitelio endotelial adulto.



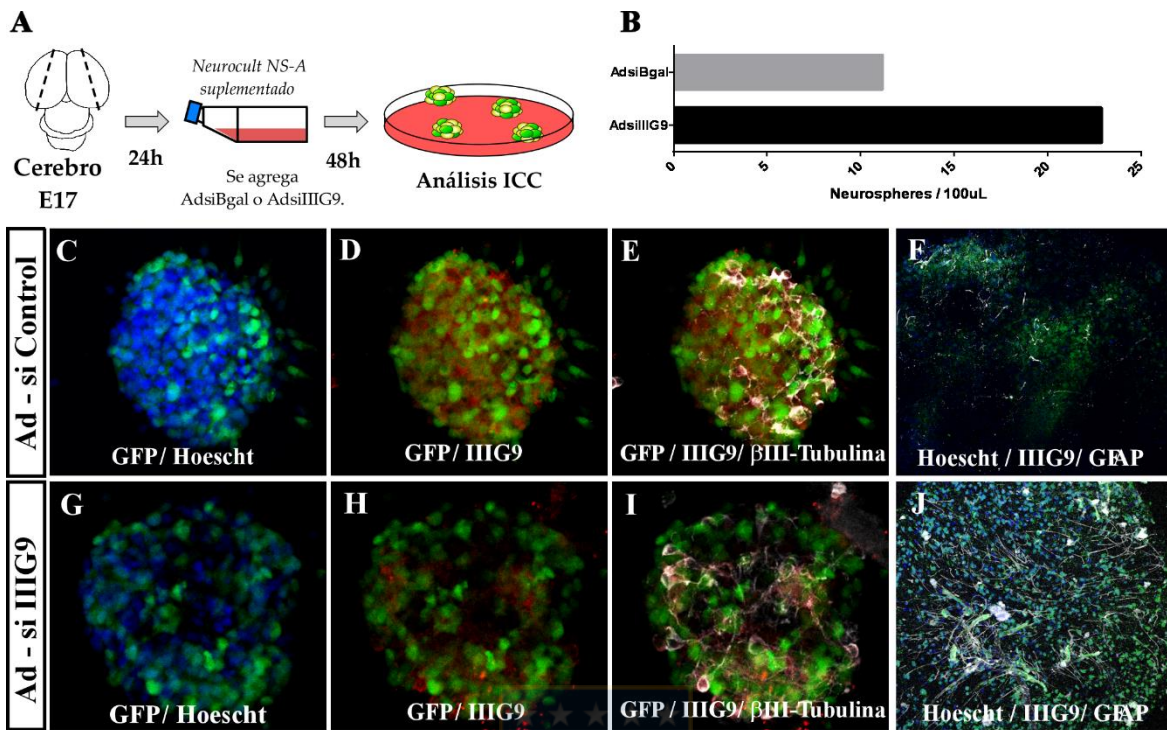
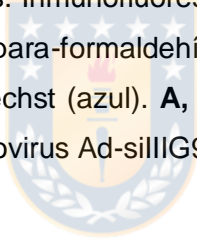
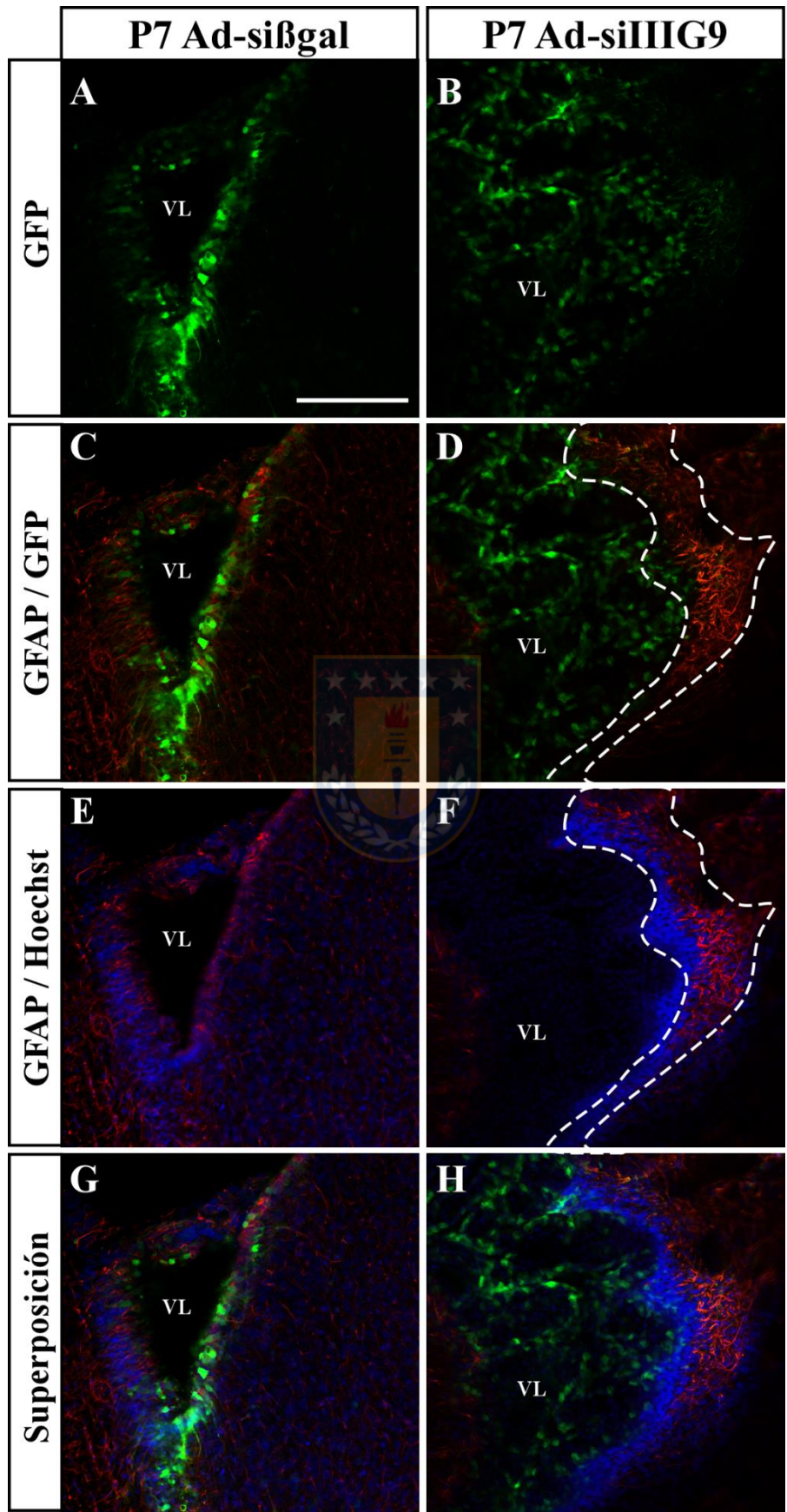


Figura 21. La inhibición adenoviral de IIIG9 en modelo de neuroesferas *in vitro* altera el número de neuroesferas y la expresión de marcadores astrocíticos y neuronales. Inmunocitoquímica de neuroesferas transducidas con virus inhibidor de IIIG9 (Ad-siIIIG9) o virus que inhibe β gal (Ad siControl), las cuales fueron incubadas con anticuerpos anti IIIG9 (rojo), anti BIII tubulina (E, I en blanco) o GFAP (F, J en blanco); GFP verde y Hoechst azul. **A.** Esquema de protocolo utilizado para el cultivo de neuroesferas en condiciones de suspensión. **B.** cuantificación del número de neuroesferas por cada 100 uL de medio suplementado en las condiciones de cultivo. **C-F.** Análisis inmunocitoquímico en neuroesferas transducidas con adenovirus inhibidor de si β gal (Ad-siControl). **G-J.** Análisis inmunocitoquímico en neuroesferas transducidas con adenovirus inhibidor de IIIG9 (Ad-siIIIG9).

Figura 22. La inhibición neonatal de IIG9 genera gliosis reactiva y desorganización de la citoarquitectura ventricular a los 7 días postnatal. En el estadio P1, se inyectaron adenovirus control (Ad-si β gal) o inhibidor de IIG9 (Ad-siIIG9) en ventrículo lateral y fueron mantenidos hasta P7 para su análisis. Inmunofluorescencia en cortes coronales de 40 μ m de cerebro de rata P7 fijada con para-formaldehído e inmunomarcado contra GFAP; transducción con GFP (verde) y Hoechst (azul). **A, C, E G.** Inyección de adenovirus Ad-si β gal. **B, D, F, H.** Inyección de adenovirus Ad-siIIG9. Barra de aumento 200 μ m.





4.3. Capítulo 3. Análisis del efecto de la ganancia de función de IIIG9 en la línea celular de endimoma DKFZ-EP1NS.

La glía radial de rata expresa y localiza IIIG9 durante el desarrollo embrionario, y aumenta su expresión durante el proceso de maduración y polarización endimaria postnatal en condiciones fisiológicas. En humano adulto, IIIG9 se expresa en tejidos multiciliados (Ivliev y col. 2012), sin embargo, aún queda por dilucidar si la glía radial humana también expresa y localiza IIIG9.

En el contexto fisiopatológico humano, la glía radial humana puede generar un subtipo de tumores conocidos como endimomas. Los endimomas presentan características ultraestructurales, inmunohistoquímicas, moleculares y genéticas similares a la glía radial (Taylor y col. 2005). Dentro de los endimomas que pueden ocurrir asociados a las cavidades ventriculares, existe un subgrupo de endimoma supratentorial, altamente metastásico conocido como “Rela-Fusión” (Parker y col. 2014), el cual fue caracterizado genéticamente, y presenta rearrreglos aberrantes hacia el brazo largo del cromosoma 11. En humano, el locus del gen que codifica a IIIG9 se ubica dentro de dicha área de rearrreglos patológicos, lo cual genera la interrogante sobre la expresión y localización de IIIG9 en un modelo de endimoma derivado de la glía radial humana.

Nuestro laboratorio cuenta con la línea celular de endimoma llamada DKFZ-EP1NS, obtenida a partir de endimoma de paciente infantil. Esta línea celular fue caracterizada y presenta la característica de “Rela-Fusión” (Sabnis y col. 2019). En este capítulo evaluamos la presencia de IIIG9 en esta línea celular, su comportamiento en cultivo, y los efectos de la sobreexpresión de IIIG9.

En una primera instancia, realizamos un estudio para evaluar el comportamiento de la línea celular en el tiempo, utilizando la tecnología de análisis en célula viva Incucyte®. Esta tecnología permite el análisis de las características morfológicas de una línea celular en cultivo, en tiempo real, ya que cuenta con la posibilidad de tomar fotografías dentro de la estufa de cultivo, y el software de su fabricante permite la cuantificación de diversos parámetros, y evaluamos el porcentaje de confluencia del cultivo en el tiempo (Fig. 23). Observamos un aumento de la confluencia en los primeros días de cultivo. Desde el cuarto día en cultivo, el porcentaje de confluencia disminuye significativamente desde un 20% a los 4 días hasta un 8% en noveno día de cultivo (Fig. 23A).

Al analizar las imágenes, observamos que existe una primera etapa de proliferación, seguida de una etapa de formación de esferoides. Estos esferoides, cuando están cercanos entre ellos, comienzan a fusionar sus estructuras para formar un esferoide de mayor tamaño (Fig. 23B). Esto genera un aumento del volumen (aumento plano Z), y por consiguiente una disminución del área cuantificada por el software de Incucyte®. Esto corrobora que esta línea celular posee poca adherencia en la placa, utilizando nuestro protocolo de cultivo, ya que, en cultivo, un porcentaje de estos esferoides se mantiene en suspensión.

Posteriormente, evaluamos la expresión del mensajero de IIIIG9 en esta línea celular de ependimoma. Para esto utilizamos partidores específicos para amplificar un producto de PCR de 233 pb. (Fig. 24). Validamos la especificidad de los partidores amplificando a partir de un plásmido de expresión de IIIIG9 humano (pCMV-sport6-hIIIIG9L). Luego utilizamos distintas temperaturas de alineamiento,

utilizando cDNA de EP1NS que fue mantenida en cultivo durante 7 días, dando una temperatura óptima de 60°C. Estos resultados muestran que el ARN mensajero de IIIG9 humano se expresa en la línea celular de ependimoma EP1NS.

Luego quisimos evaluar la localización de IIIG9 a nivel de proteína en esta línea celular. Para lo cual, realizamos un análisis inmunocitoquímico de esferoides de EP1NS. Las células fueron cultivadas por 7 días. Posteriormente, los esferoides formados fueron fijados y procesados para su análisis (Fig. 25). Mediante la utilización de este anticuerpo, no logramos localizar IIIG9 en la estructura esferoidal (Fig. 25A). Pan-cadherina marca los complejos de unión célula-célula (Fig. 25B), sin embargo, también se encuentra en el citoplasma en un porcentaje importante. Este anticuerpo fue generado en conejo utilizando IIIG9 de rata recombinante como inmunógeno. Existe un 85% de identidad de secuencia entre IIIG9 de rata y IIIG9 humano, por lo que pudiese existir la posibilidad de que este anticuerpo no detecte IIIG9 humano. Para responder esta interrogante, utilizamos un anticuerpo comercial (HPA039067), dirigido contra IIIG9 humano. Realizamos un ensayo de Western Blot (Fig. 26) para determinar la presencia de IIIG9 a nivel de proteína en la línea celular EP1NS. Para esto, utilizamos extractos de proteínas totales de EP1NS de 4 y 7 días de cultivo. En ambas condiciones, no fue posible localizar IIIG9 (Fig. 26, carril 2-4). Para validar estos resultados, sobreexpresamos IIIG9 humano mediante la transfección plasmidial en la línea celular HEK293T. Utilizando 5 µg y 100 µg, de proteínas totales de HEK 293T sin transducir, no detectamos señal para IIIG9 en dicha línea celular (Fig. 26, carril 7 y 9). En el caso de la transfección, detectamos tres bandas intensas cercanas a los 42, 30 y 25 kDa (Fig. 4, carril 8) utilizando 5 µg

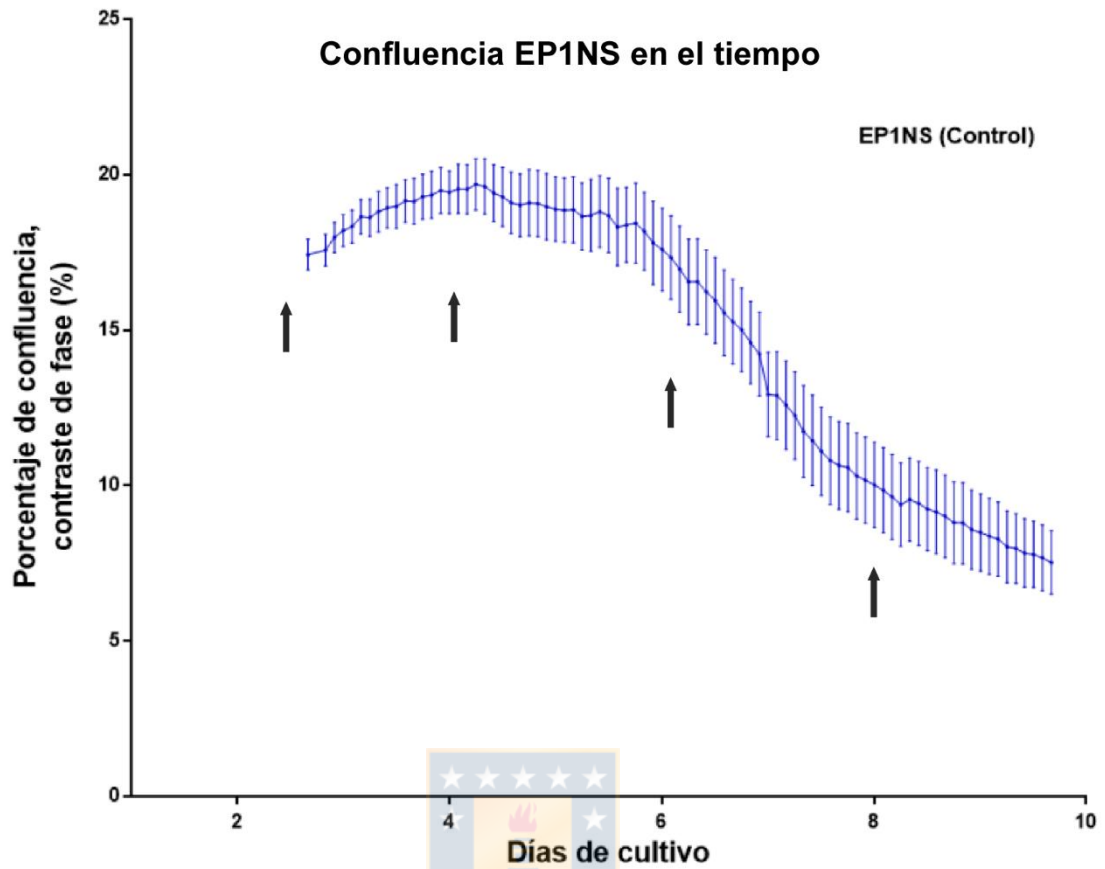
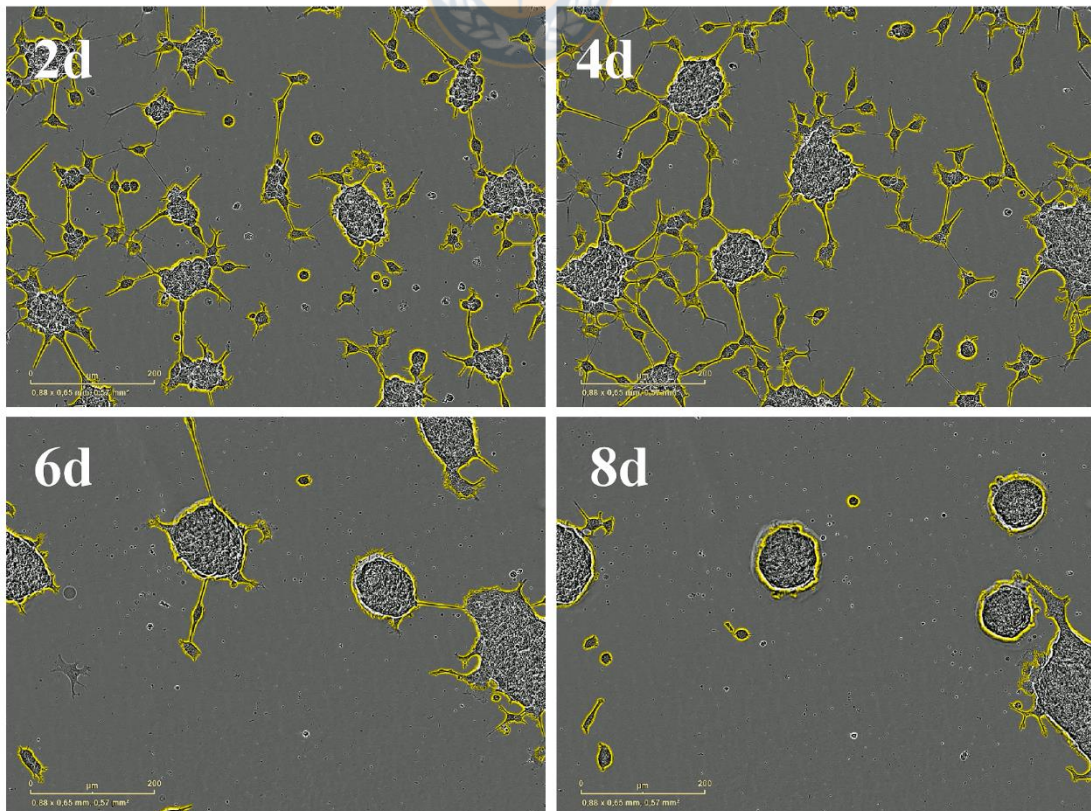
de proteínas totales. Adicionalmente utilizamos proteínas totales de epéndimo (Fig. 26, carril 5) y testículo (Fig. 26, carril 5) de rata adulta, para determinar si este anticuerpo permite la localización de IIIIG9 de otra especie. En el caso de epéndimo, IIIIG9 no fue inmunodetectado, mientras que, en testículo, se observa una única banda tenue, en los 45 kDa (Fig. 4, carril 5). Estos resultados validan la especificidad del anticuerpo, el cual detecta IIIIG9 humano de manera específica, y permite detectar parcialmente IIIIG9 de rata.

Nuestros resultados de Western blot indican que la línea celular EP1NS no expresa la proteína IIIIG9 en nuestras condiciones de cultivo. Un detalle importante a considerar, es la presencia de múltiples bandas al sobreexpresar IIIIG9 en una línea celular, que en condiciones normales de cultivo no la expresa.

La línea celular EP1NS, aun cuando expresa el mensajero de IIIIG9, no logra traducir este mensajero a proteína en niveles detectables. Considerando que es una línea "Rela-Fusión", es posible que el gen de IIIIG9 presente mutaciones que impidan su traducción a proteína. Posteriormente, nos preguntamos cuál sería el fenotipo resultante de la sobreexpresión de IIIIG9 en esta línea celular. En nuestro laboratorio contamos con vectores de pasaje pCR-Blunt TOPO que tienen inserto la isoforma corta o larga de IIIIG9 de rata, con extremos de corte para BamHI, el cual fue utilizado para el subclonamiento en el vector de expresión bicistrónico pAAV-Ires-GFP (Fig. 31, Anexo). Se obtuvo un vector que presenta la isoforma corta (pAAV4-rIIIIG9s-Ires-GFP) y un vector con la isoforma larga (pAAV4-rIIIIG9L-Ires-GFP) orientados

Figura 23. La línea de ependimoma EP1NS disminuye su confluencia en condiciones de cultivo para generar esferoides. La línea celular EP1NS fue cultivada en medio neurobasal suplementado con EGF, FGF y heparina, se sembraron 20.000 células por pocillo en placas de 96 pocillos. Tras el sembrado, las placas fueron mantenidas en cultivo por 10 días, y durante dicho tiempo fueron analizadas mediante el sistema de análisis en célula viva Incucyte®. Se tomaron 4 fotografías por pocillo, cada 2 horas, por 10 días utilizando el objetivo 10x. **A.** Comportamiento de la confluencia en EP1NS en el tiempo. Existe una disminución en la confluencia debido a la formación de esferoides que disminuyen el área de adhesión a la placa. **B.** Imágenes representativas de un cultivo de línea celular EP1NS a los 2, 4, 6 y 8 posteriores al sembrado de la placa. Barra de tamaño, 200 μm .



A**B**

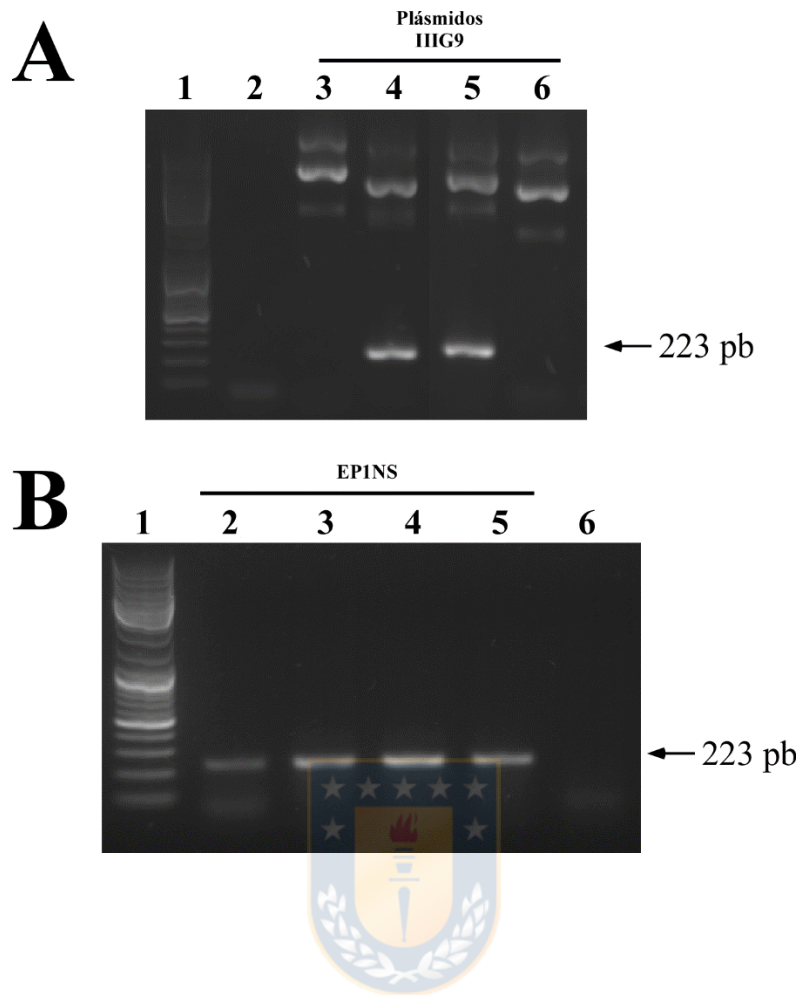


Figura 24. La línea celular EP1NS expresa el ARNm de IIIG9. Estandarización de partidores y detección del ARNm de IIIG9 en línea celular EP1NS. **A.** Carril 1: marcador de peso molecular. Carril 2: control sin plásmido. Carril 3 y 5: Se utilizó el vector de expresión plasmidial de IIIG9 de rata (pAAV-4 rIIIG9L-Ires-GFP9 para amplificación por PCR. Carril 4 y 6: Se utilizó el vector de expresión plasmidial de IIIG9 humano (pCMV-Sport6-hIIIG9L) para amplificación por PCR. Carril 3 y 4: Amplificación de un producto de 223 pb utilizando partidores dirigido a la secuencia de IIIG9 humana. Carril 5 y 6: Amplificación de un producto de 277 pb utilizando partidores dirigidos contra la secuencia de IIIG9 de rata. **B.** Estandarización de temperatura de alineamiento óptima utilizando partidores que amplifican un producto de 223 pb a partir de la secuencia de IIIG9 humana. Se utilizó cDNA de EP1NS mantenida en cultivo durante 7 días. Carril 1: marcador de peso molecular. Carril 2: temperatura de alineamiento de 55°C. Carril 3: 58°C. Carril 4: 60°C. Carril 5: 62°C.

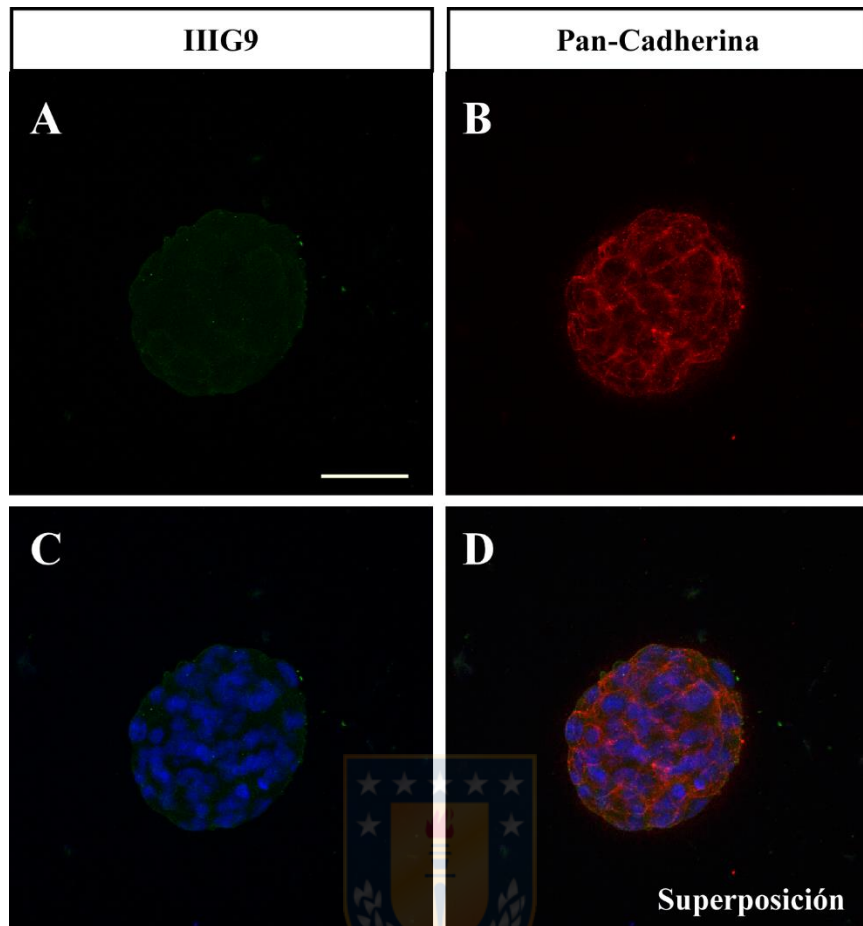


Figura 25. IIIIG9 no es localizado en la línea celular EP1NS mediante inmunocitoquímica. La línea celular fue mantenida en cultivo por 7 días, se tomó el sobrenadante, las células fueron pegadas a vidrios con poli-L-lisina, fijadas con paraformaldehído, inmunomarcadas con anticuerpos contra IIIIG9 y pan cadherina, y analizadas mediante microscopía confocal. **A.** IIIIG9 no es localizado en la línea celular EP1NS utilizando el anticuerpo descrito previamente. **B.** Los complejos de unión son inmunomarcados en la estructura esférica, sin embargo, también se encuentra en citoplasma en un porcentaje importante. **C.** Marcaje para IIIIG9 y marcaje nuclear. **D.** superposición de inmunofluorescencia. Barra de tamaño 50 μm .

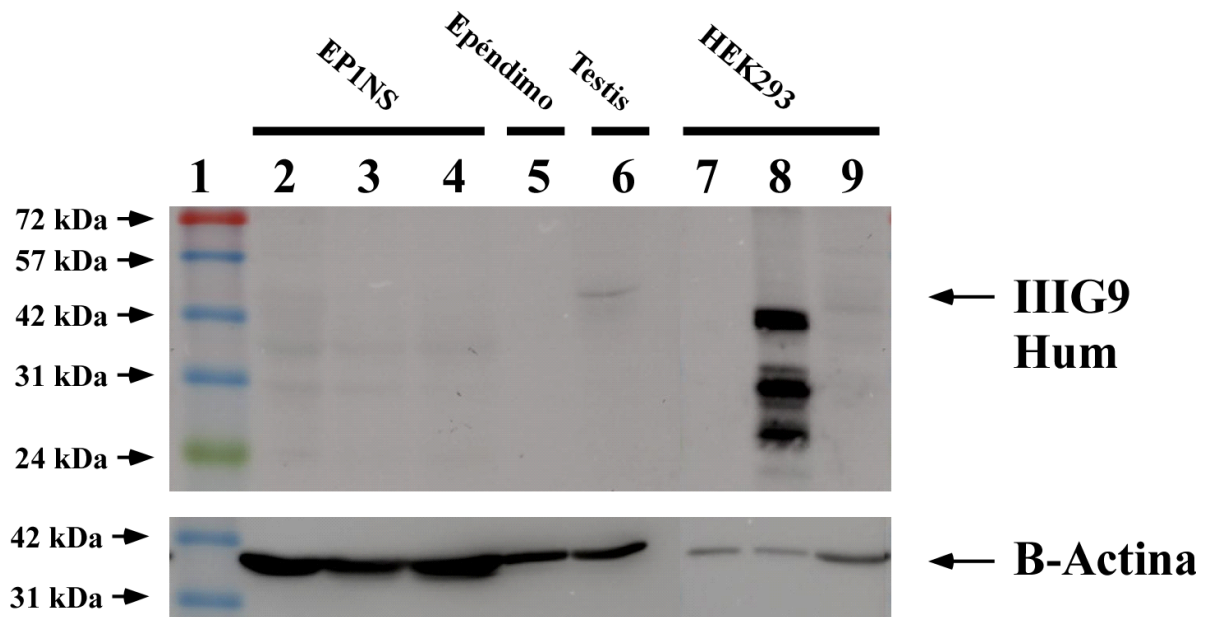


Figura 26. IIIIG9 no es detectado en la línea celular EP1NS.

Análisis de western blot para IIIIG9 en extractos de proteínas totales de diversos tejidos y líneas celulares, utilizando como control un extracto de proteína con IIIIG9 humano sobreexpresado. Carril 1: Marcador de peso molecular. Carril 2: Extracto de proteínas totales (EPT) de línea celular EP1NS de 4 días en cultivo (100 μ g). Carril 3: EPT de línea celular EP1NS de 7 días en cultivo, transducida con adenovirus Adsi β gal por 3 días. Carril 4: EPT de línea celular EP1NS de 7 días en cultivo transducida con adenovirus inhibidor de IIIIG9 AdsiIIIIG9. Carril 5. EPT de epéndimo de rata adulta (100 μ g). Carril 6: EPT de testículo de rata adulta (100 μ g). Carril 7: EPT de línea celular HEK293T (5 μ g). Carril 8: EPT de línea celular HEK293T transducida con plásmido de sobreexpresión de la isoforma larga de IIIIG9 humano, hIIIIG9L (5 μ g). Carril 9: EPT de línea celular HEK293T (100 μ g). Las muestras de EPT fueron tratadas con b-mercaptoetanol, calentadas por 8 min a 95°C, cargadas en gel de 10% acrilamida, transferidas por 1 hora a 100V a membrana de PVDF, e incubadas con anticuerpo policlonal anti IIIIG9-humano (HPA039067).

correctamente y validados mediante secuenciación, mostrando un 100% de identidad con las secuencias de las isoforma larga (AY032665.1) y corta (AY032664.1) de IIIIG9 de rata. Los plásmidos generados permiten la expresión de IIIIG9 y GFP como proteínas separadas, a partir de un mismo ARN mensajero. Para verificar la expresión de las isoformas, se transfectaron los vectores pAAV-IIIIG9s-Ires-GFP (Fig. 27 A-F) y pAAV-IIIIG9L-Ires-GFP (Fig. 27G-L). Tras 48 hrs post-transfección, las células fueron fijadas, se realizó inmunodetección de IIIIG9 asociada a fluorescencia y se analizó por microscopía confocal. Observamos que tanto la isoforma corta (Fig. 27A-F) como la isoforma larga (Fig. 27G-L) de IIIIG9 son inmunodetectadas en células que expresan GFP. La intensidad de fluorescencia de GFP tiene relación con la intensidad de marcaje para IIIIG9. No se detecta IIIIG9 en células no transfectadas circundantes. El porcentaje de transfección a las 48 hrs varió entre un 20-40%, dependiendo del campo escogido. La distribución de GFP es uniforme a nuclear dentro de la célula, mientras que la distribución de IIIIG9 es principalmente citoplasmática. No se detectó IIIIG9 en células transfectadas con el vector vacío (datos no mostrados).

Luego, utilizamos el vector que permite la expresión de la isoforma larga de IIIIG9 (pAAV4-rIIIIG9L-Ires-GFP) para evaluar el efecto de la expresión de IIIIG9 en la línea celular EP1NS. Para esto, utilizamos el sistema de análisis en célula viva Incucyte®. Analizamos el parámetro de confluencia, sin embargo, no se observó una disminución similar a lo observado en la figura 23. Uno de los factores que pudieron influir en este cambio es el protocolo utilizado para la transfección. Tras la transfección, el medio de cultivo no fue reemplazado, para evitar cambios en los

valores entregados producto del movimiento al remover y devolver la placa al sistema Incucyte. Se analizó el área de las células GFP+ transfectadas (Fig. 28). Desde el día 2 se inicia el aumento del área de fluorescencia en ambas condiciones experimentales, indicativo del proceso de mitosis de las células transfectadas en cultivo. Cinco días posterior a la transfección, se observó un área promedio significativamente mayor, utilizando el vector de expresión de IIIIG9, con respecto al vector control. Dicho comportamiento se mantiene hasta 6,5 días post-transfección. Las células EP1NS que expresan IIIIG9 aumentarían su superficie respecto del control. Sin embargo, esta aproximación experimental no logra inducir un alto porcentaje de transfección dentro de la placa, utilizando nuestro protocolo, lo cual podría indicar que dicho fenotipo podría ser más pronunciado. Una aproximación para optimizar el porcentaje de células positivas a GFP correspondería a la utilización de adenovirus, o virus adeno-asociado para inducir la expresión de IIIIG9.

Los resultados de este capítulo muestran que la línea celular de ependimoma EP1NS disminuye su confluencia al disminuir su área mediante la formación de esferoides. Esta línea celular expresa el mensajero para IIIIG9, pero no es detectado a nivel de proteína, lo cual puede ser indicativo de mutaciones o deleciones en su secuencia, evento característico de los ependimomas "Rela-Fusión". La expresión de IIIIG9 en esta línea celular genera un aumento del área de las células GFP+, revirtiendo parcialmente el comportamiento del cultivo donde ocurre una disminución del área de cultivo producto de la formación de esferoides.

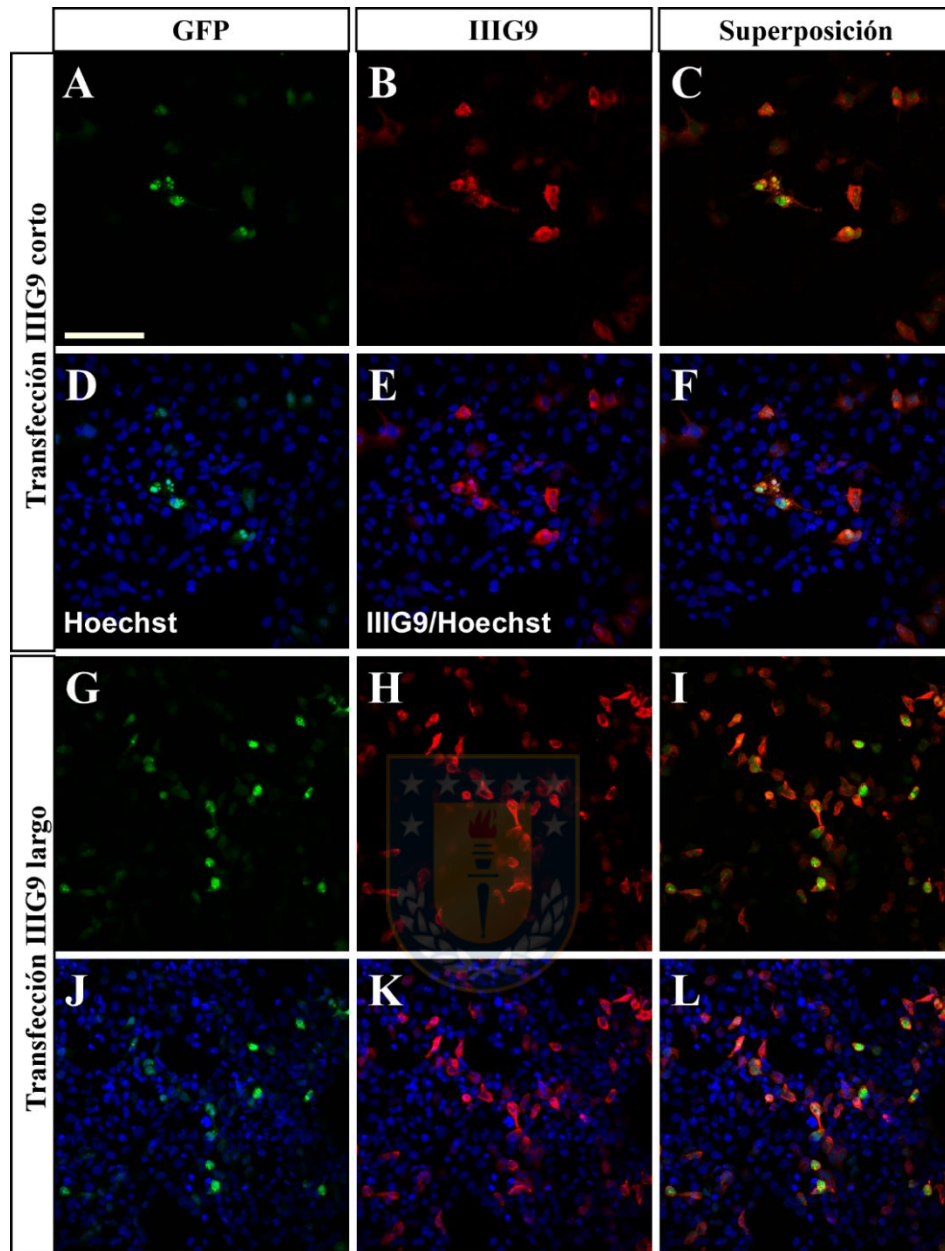
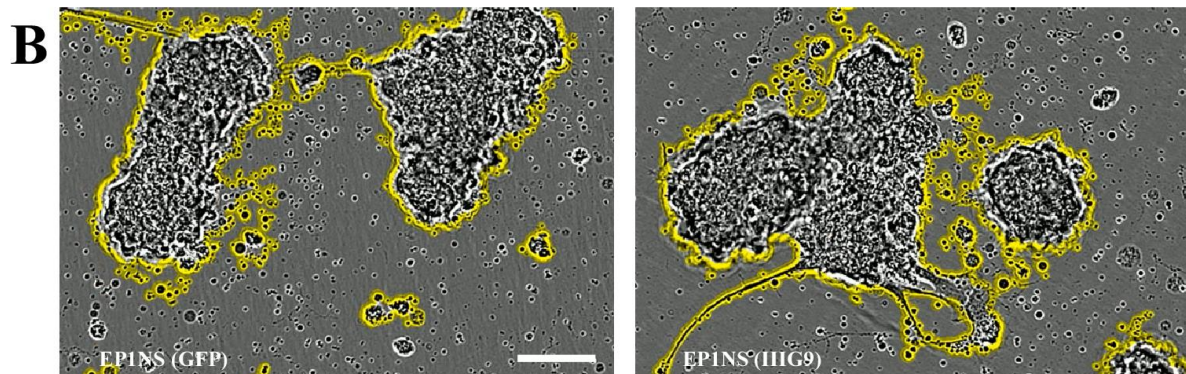
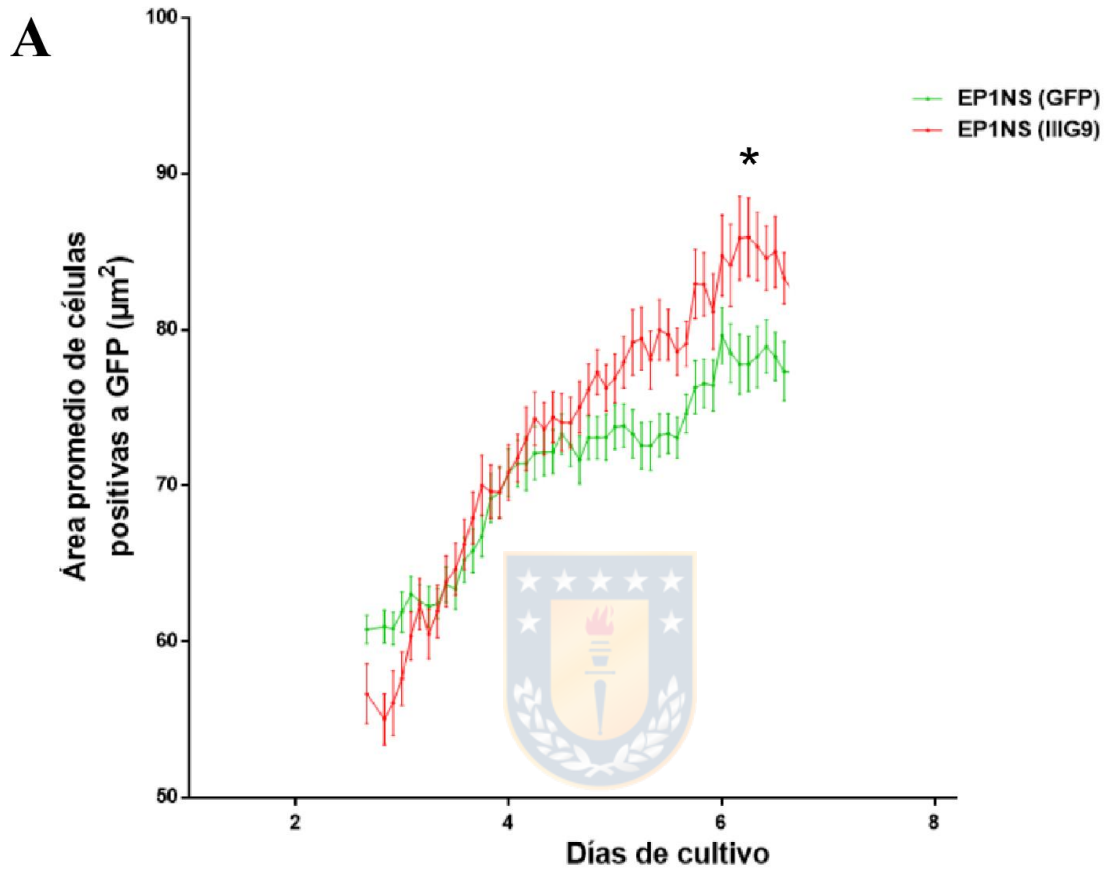


Figura 27. Análisis inmunocitoquímico de IIIIG9 en células HEK293AAV transfectadas con los vectores pAAV IIIIG9s-lres-GFP y pAAV IIIIG9L-lres-GFP. Las células fueron fijadas 24 hrs post-transfección y se realizó marcaje para IIIIG9 (rojo) y núcleo (azul). **A-F.** Células transfectadas con vector de expresión de la isoforma corta de IIIIG9 y GFP. **G-L.** Células transfectadas con vector de expresión de la isoforma larga de IIIIG9 y GFP. Aumento 20X.

Figura 28. El área de las células EP1NS que sobreexpresan IIIG9 presentan un incremento respecto al control. La línea celular EP1NS fue cultivada en medio neurobasal suplementado con EGF, FGF y heparina, se sembraron 20.000 células por pocillo en placas de 96 pocillos. Un día tras el sembrado fueron transfectadas con un vector de expresión bicistrónico para IIIG9 y GFP (pAAV-IIIG9L-Ires-GFP, línea roja) o un vector que solo expresa GFP (pAAV-Ires-GFP, línea verde) utilizando lipofectamina, las placas fueron mantenidas en cultivo por hasta 6 días, y durante dicho tiempo fueron analizadas mediante el sistema de análisis en célula viva Incucyte®. Se tomaron 4 fotografías por pocillo, cada 2 horas, por 10 días utilizando el objetivo 10X. 5 días posterior a la transfección, se observó un área promedio significativamente mayor utilizando el vector de expresión de IIIG9. Dicho comportamiento se mantiene hasta los 6,5 días post-transfección. **A.** Análisis de área promedio de células positivas a GFP. **B.** Imágenes representativas de un cultivo de línea celular EP1NS a los 2, 4, 6 y 8 posteriores al sembrado de la placa. **B.** Imágenes representativas del cultivo de la línea celular EP1NS a los 6 días en las condiciones de trabajo. Barra de tamaño, 50 μ m.



5. DISCUSIÓN

Numerosas patologías asociadas a una disfuncionalidad ciliar conocidas como ciliopatías generan cuadros clínicos como inversión visceral (*situs inversus*), infecciones respiratorias, debido a un bajo *clearance* mucociliar, infertilidad o hidrocefalia (Fliegau y col. 2007). Existe un creciente interés en investigar las distintas proteínas asociadas al cilio, y cientos de proteínas ya han sido descritas en detalle. Recientemente, se han realizado estudios enfocados en identificar el proteoma de las células multiciliadas (Patir y col. 2020; Sim y col. 2019), sin embargo, dichos esfuerzos se han enfocado en identificar algunos candidatos, sin abarcar a cabalidad estudios funcionales asociados. Un mayor entendimiento sobre las proteínas efectoras involucradas en la diferenciación, maduración y funcionalidad del epitelio multiciliado, podrá entregar herramientas para generar estrategias clínicas dirigidas al mantenimiento y la reparación de este tipo particular de epitelio. Uno de estos factores es IIIG9, que ha sido de interés reciente en nuestro laboratorio, y el enfoque principal de este trabajo. En esta tesis nos dirigimos a evaluar la expresión de IIIG9 en el sistema nervioso central (SNC) de rata adulta y durante el desarrollo, y el efecto de la inhibición o sobreexpresión de IIIG9 en distintos modelos *in vitro* e *in vivo*.

5.1. Localización de IIIG9 en los cilios móviles

La localización tisular de IIIG9 reportada previamente mediante el uso de un anticuerpo comercial inducido contra la secuencia humana, indica que esta proteína se localiza a nivel de los cilios presentes en células de la tráquea, trompas de Falopio, cerebelo, bronquios y testículo humano (Uhlen y col., 2015; Ivliev y col., 2012)(<http://www.proteinatlas.org/ENSG00000162148-PPP1R32/tissue>).

Generamos un anticuerpo policlonal en conejo contra la isoforma corta de IIIG9 de rata (Cifuentes y col. 2018) para caracterizar la localización de IIIG9 en el sistema ventricular del SNC de rata adulta. Nuestros resultados demostraron que IIIG9 se localiza en los ventrículos laterales, tercer ventrículo dorsal y cuarto ventrículo de la pared endimaria multiciliada, mientras que no es detectado a nivel del órgano subcomisural o los plexos coroideos. Mediante el análisis inmunohistoquímico, IIIG9 se localizó principalmente en el citoplasma y los cilios endimarios. No realizamos una caracterización hacia el canal espinal, pero se ha demostrado la presencia del ARN mensajero para IIIG9 en el canal espinal de ratón adulto (Allen Spinal Cord Atlas 2008) (<http://mousespinal.brain-map.org/imageseries/show.html?id=100019141>), lo que indica que es probable que IIIG9 se localice en las células endimarias del canal espinal, al menos durante el estadio adulto.

Un aspecto interesante es la ausencia de localización de IIIG9 en la pared del tercer ventrículo ventral, donde el epitelio endimario es reemplazado por distintas subpoblaciones de tanicitos. Los tanicitos son células que se diferencian a partir de la glía radial, y en rata este proceso ocurre entre los últimos dos días embrionarios, y las primeras semanas de vida postnatal (Rodríguez y col, 2005).

Tanto la morfología como las funciones de los tanicitos son notoriamente diferentes a la de las células endoteliales. Su cara apical llega al lumen ventricular y están en contacto directo con el LCR, presentan numerosas microvellosidades, y solo uno o dos cilios (López-Gamero y col. 2019). Nuestros resultados de cuantificación del mensajero de IIG9, en las distintas subpoblaciones celulares del tercer ventrículo mediante qRT-PCR, mostraron que los tanicitos α presentan el mensajero de IIG9 en baja concentración respecto a las células endoteliales (E1), sin embargo, IIG9 no es inmunolocalizado en tanicitos α o β . La diferencia entre la presencia del mensajero y la ausencia de localización de IIG9 en tanicitos α pudiese explicarse por la cercanía de estos tanicitos a las células endoteliales en el tercer ventrículo, lo que dificulta una separación precisa mediante la técnica de microdissección láser.

Recientemente se identificaron los distintos subtipos celulares presentes en el tercer ventrículo mediante *wholemout* (Mirzadeh y col. 2017), y se determinó la presencia de células E2 que corresponden a los tanicitos α y presentan dos cilios de estructura axonemal (9+2), mientras que los tanicitos β presentan un cilio de estructura axonemal (9+0) inmóvil. La estructura (9+2) de las células E2 supone que estos cilios podrían ser móviles (Alfaro-Cervello y col. 2012). Sin embargo, es poco probable que las E2 contribuyan de manera significativa al flujo del LCR en el tercer ventrículo, por lo que pudiese tener funciones sensoriales similares a las del cilio primario (Mirzadeh y col. 2017). La presencia del mensajero de IIG9 en los tanicitos α podría ser un indicio de la motilidad de dichos cilios, o de un origen celular distinto entre ambos tipos de tanicitos, permitiendo que IIG9 sea expresado en tanicitos α y no en tanicitos β . Para el desarrollo de esta tesis enfocamos nuestro interés en

los ventrículos laterales, por lo que no tenemos información detallada de la codistribución subcelular de IIG9 con marcadores ciliares o marcadores de uniones célula-célula en tercer ventrículo. Esto será de interés para futuras evaluaciones en la identificación de una posible localización ciliar de IIG9 en los tanicitos α . Estudios de inmunohistoquímica utilizando nuestro anticuerpo dirigido contra IIG9 mediante *wholemout* nos permitirá entregar mayores detalles al respecto. Esto a futuro podría permitir generar un método complementario a la determinación de subtipos celulares en el epitelio ventricular, basado en la dinámica de localización subcelular de IIG9 hacia la zona apical, o también utilizando otros marcadores que clásicamente han sido utilizados para identificar a las células endimarias, como vimentina o GLUT-1, utilizando la inmunohistoquímica del epitelio ventricular desde la cara apical (*wholemout*).

De manera similar al caso de los tanicitos α , la presencia de cilios que poseen motilidad transiente en las células epiteliales de los plexos coroideos (Narita y col. 2012) sugiere que IIG9 podría estar presente en este epitelio de forma transiente. Nuestros resultados de inmunohistoquímica en el SNC adulto mostraron que los plexos coroideos no son inmunomarcados utilizando nuestro anticuerpo. No tenemos antecedentes acerca de la expresión del ARN mensajero IIG9 en plexos coroideos, sin embargo, no sería de sorprender que el mensajero de IIG9 pudiese ser expresado por los plexos coroideos de manera similar a lo mostrado para los tanicitos α o las células endimarias del canal espinal, al menos en baja proporción respecto de las células endimarias E1.

5.2. IIIIG9 y el cilio primario

El cilio primario se proyecta como un único organelo en la superficie de la mayoría de los tipos celulares en vertebrados. Este nace a partir de un cuerpo basal capacitado desde el centriolo madre. El cilio primario posee una composición única de receptores que le permite funcionar como una antena en la transducción de señales y es capaz de sensor distintas moléculas (Ishikawa y Marshall, 2011). Hasta la fecha, no ha existido una asociación de IIIIG9 con el cilio primario, y nuestras conclusiones previas estaban dirigidas a su asociación exclusiva al cilio móvil.

Durante el desarrollo postnatal temprano, nuestros resultados mostraron puntos únicos discretos positivos a IIIIG9, en la zona apical de algunas células de la pared ventricular durante el desarrollo postnatal. Estos son fácilmente identificables entre los estadios P7 y P10. Las células que presentan este punto discreto poseen un tamaño apical menor que la célula ependimaria. Es posible que este tipo celular corresponda a la glía radial postnatal, o a astrocitos B1 nacientes, y que estos puntos únicos discretos positivos a IIIIG9 correspondan al cilio primario de estas células.

Una mayor tasa proliferativa de las células presentes en la pared ventricular embrionaria respecto de la pared ventricular postnatal podría explicar una mejor identificación de estos puntos discretos positivos a IIIIG9. Durante el ciclo celular, las células que están en estado G0 pueden ensamblar un cilio primario, mientras que, durante el proceso de división celular, este organelo es desensamblado. Se ha determinado que las células B1 son principalmente quiescentes luego de su generación embrionaria (Fuentealba y col. 2015). IIIIG9 podría estar siendo

distribuido al cilio primario en las células ventriculares de los estadios postnatales tempranos, puesto que hay más células en la pared que están en estado G0 respecto de su contraparte embrionaria. La localización de IIG9 en puntos únicos discretos, en la zona apical de las células que no localizan IIG9 citoplasmático, sugiere que son cilios primarios presentes en la glía radial postnatal o en las células B1.

Recientemente, se realizó un análisis de proteómica evolutiva respecto de las asociaciones del cilio y diversas vías de señalización. En este trabajo se utilizó un modelo *in vitro* para la generación de cilio primario utilizando la línea celular IMCD3, que proviene desde los túbulos colectores de riñón de ratón. Se utilizó esta línea celular para realizar un screening de proteínas para determinar su localización en el cilio primario, entre ellas IIG9 (Sigg y col. 2017). Los resultados mostraron que la proteína de fusión IIG9-GFP es capaz de localizarse en la base del cilio primario (Figura 32, Anexo). También se ha determinado que ciertas proteínas ciliares se localizan solo en el cilio primario, mientras que otras solo en los cilios móviles, así como proteínas que están presentes en ambos (Sigg y col. 2017). Esta corresponde a la primera evidencia de que IIG9 podría asociarse al cilio primario además del cilio móvil reportado por nuestro laboratorio (Cifuentes y col. 2017).

Es posible que IIG9 posea una secuencia de importe ciliar que le permita localizarse tanto en los múltiples cilios móviles, así como también en el cilio primario. Sin embargo, nuestros resultados son insuficientes para determinar que estos puntos discretos correspondan realmente a una localización de IIG9 en el cilio primario. Esta localización representa un resultado importante para iniciar la

búsqueda de IIG9 en otros tejidos. Nosotros hipotetizamos que IIG9 podría estar presente en el cilio primario de la glía radial postnatal en etapa G0. Posteriormente, durante la transición de glía radial a célula B1, dicho marcaje se pierde. Futuros estudios podrán determinar esta posible localización de IIG9 a nivel del cilio primario durante el desarrollo de la glía radial especificada a célula endimaria.

5.3. IIG9 y las uniones célula-célula

Se ha determinado que muchas, sino todas las proteínas ciliares se localizan y poseen funciones fuera del cilio. Estas funciones extraciliares incluyen la regulación del ciclo celular, regulación del citoesqueleto y el tráfico de proteínas al interior de la célula. Estas proteínas se han observado en el núcleo, el aparato de Golgi, e incluso en la sinapsis inmune de las células T, que corresponden a células no ciliadas (Hua y col. 2018). Dentro de las localizaciones extraciliares, poco se conoce de proteínas de localización ciliar en los bordes celulares. Una de ellas, RPGR (*retinitis pigmentosa GTPase regulator*), además de regular la formación del cilio primario, regula la estabilidad de los filamentos de actina. Un knock-down de RPGR disminuye la adhesión a fibronectina, disminuye la activación de la cinasa de adhesión focal FAK (*focal adhesion kinase*), y las células expresan menores niveles de integrina $\beta 1$ a nivel de superficie, afectando la formación de adhesiones focales y disminuyendo la adhesión celular (Gakovic y col. 2011).

Nuestro trabajo postula que IIG9 cumple una función en la mantención de las uniones célula-célula. Los resultados mostrados en este trabajo han demostrado una codistribución de IIG9 junto a marcadores de unión célula-célula como β -

catenina y Pan-cadherina en las células endimarias adultas. La localización de IIG9 se mantiene en los bordes celulares en células endimarias aisladas. Además, durante el desarrollo embrionario, la glía radial presente en la zona ventricular localiza IIG9 en los bordes celulares desde el estadio E13, y se observa la codistribución precisa de IIG9 con pan-cadherina en *wholmount* de ventrículo de rata E17, lo cual demuestra la localización extraciliar de IIG9 tanto en el período de especificación y diferenciación endimaria, así como también en el estadio adulto.

Un comportamiento inesperado corresponde al aumento del inmunomarcaje citoplasmático para IIG9 durante el estadio P1-P7 con una distribución tipo mosaico, además del marcaje mencionado hacia los bordes celulares. Este es el período en el cual comienza la maduración endimaria, así como también la expansión ventricular durante el estadio postnatal temprano. Se ha determinado en ratón, que el área de la superficie ventricular se duplica desde el estadio E17,5 al P15 (3,19 mm² a 5,97 mm²), mientras que el área no varía significativamente entre los estadios P15 al P40 (Redmond y col. 2019). Esto demuestra que la dilatación ventricular es un proceso crítico que ocurre en los estadios embrionarios tardíos y postnatales tempranos, período donde ocurre la diferenciación y maduración endimaria. De manera contraintuitiva, el número de células durante este período disminuye hasta un 44%, y las células endimarias E1 en proceso de maduración aumentan su área apical respecto de las células B1 (Redmond y col. 2019). **Esta expansión del área endimaria va en directa relación con el aumento del**

tamaño de las células que sobreexpresan IIIIG9, a nivel del citoplasma en estadios postnatales.

Este notorio aumento citoplasmático de IIIIG9 podría ser un evento temprano requerido para la formación o localización de los cuerpos basales o el ensamblaje ciliar en las células endimarias inmaduras. Se ha demostrado que las células con cuerpos basales en P3 comienzan progresivamente a formar clusters de células, que aumenta hasta el estadio P11 donde la mayoría del epitelio endimario posee cuerpos basales (Zerihun, L. *Honors Thesis*, 2016). De manera similar nuestros resultados mostraron que desde el estadio P3-P5 se observan clusters de células endimarias inmaduras positivas a IIIIG9 citoplasmático. Es posible que dichos *clusters* de células provengan de una misma glía radial progenitora.



5.4. Efectos de la inhibición de IIIIG9

La posibilidad de reparar tejidos dañados por injuria es fundamental para la biología de los vertebrados, y esencial para la sobrevivencia. En el sistema nervioso central, las células gliales mantienen la citoarquitectura y la regulación homeostática de la zona ventricular/subventricular, y son las primeras en responder ante insultos. Su respuesta depende de la etiología y duración del daño a nivel de SNC (Burda y col. 2014).

Para evaluar la función de IIIIG9 en las uniones célula-célula y la mantención del fenotipo endimario, en este trabajo hemos estudiado estrategias para la inhibición de IIIIG9 *in vitro* e *in vivo* mediante la transducción adenoviral de un ARN

de interferencia. Realizamos la inhibición en un modelo *in vitro* de neuroesferas en suspensión que emula el desarrollo embrionario de la corteza cerebral embrionaria, en modelo *in vivo* neonatal, período donde se inicia la maduración ependimaria, y en un modelo *in vivo* adulto, para evaluar el efecto de la inhibición sobre la polarización ependimaria y la mantención de la citoarquitectura ventricular.

Nuestros resultados mostraron que el cultivo de neuroesferas en suspensión expresa y localiza IIG9. La inhibición de IIG9 en este modelo provocó el aumento de la cantidad de neuroesferas en la placa de cultivo, y se observaron células positivas a GFAP que poseen una morfología alargada. Estos resultados son relevantes, ya que valida la utilización de este modelo *in vitro* en futuros estudios funcionales de IIG9, puesto que la gran mayoría de las líneas celulares en cultivo no expresan esta proteína. Analizamos también los efectos de la inhibición de IIG9 en animales P1 mediante la inyección única del virus inhibidor en ventrículo lateral, mantenido durante 7 días. La pared de los ventrículos laterales es transducida al igual que los plexos coroideos. Encontramos procesos radiales positivos a GFP, que corresponderían a la glía radial remanente; también observamos neuroblastos migratorios positivos a GFP en parénquima cerebral, usualmente asociados a estos procesos radiales positivos a GFP. Esto corresponde al proceso de migración de neuroblastos desde la zona ventricular hacia el espesor cortical. El proceso apical se une a la glía radial adyacente vía uniones adherentes basadas en cadherinas.

Las adhesiones célula-célula basadas en cadherinas son requeridas para la adhesión y la polaridad de los progenitores embrionarios (Kuo y col. 2006). Durante el período gliogénico (E16-P15) algunas células de la glía radial pierden las uniones

adherentes y su contacto apical para transformarse en astrocitos. Otras células radiales retraen su proceso basal manteniendo sus uniones adherentes para diferenciarse en células endimarias (Rasin y col. 2007). La inhibición de IIIIG9 afecta negativamente la migración de neuroblastos desde la zona ventricular hacia la zona pial. Este resultado es interesante ya que podría indicar que la migración cortical perinatal requiere de la expresión de IIIIG9 en la zona ventricular para sostener la citoarquitectura ventricular-subventricular. Se generó una desorganización de la citoarquitectura ventricular en la cual cúmulos de células invaden la cavidad ventricular, siendo rodeada por una cicatriz glial formada principalmente por astrocitos que sobreexpresan GFAP. La inhibición de IIIIG9 podría afectar las uniones célula-célula de la glía radial postnatal provocando una desorganización exacerbada y posterior pérdida de estos procesos radiales.

Posteriormente, analizamos los efectos de la inhibición de IIIIG9 en epéndimo adulto mediante la inyección continua de adenovirus. Nuestros resultados corroboran la eficacia de la inhibición de virus Ad-sIIIIG9-GFP *in vivo*, ya que el análisis por inmuno-marcaje demostró que células transducidas no expresaron IIIIG9. La inhibición de IIIIG9 *in vivo* genera gliosis reactiva característica de una respuesta secundaria, como activación de astrocitos y oligodendrocitos en respuesta a una injuria en el sistema nervioso central (Deren y col. 2010; Xu y col. 2012), generando una cicatriz glial que es independiente del protocolo utilizado para la inhibición, ya que el control genera un fenotipo equivalente a los animales no tratados. La disrupción de la citoarquitectura epitelial en la cavidad ventricular transducida generó una deslocalización del marcaje para IIIIG9 en las células no

transducidas, lo cual sugiere que la localización de IIIIG9 en los complejos de unión es requerida para la mantención de la polarización endimaria. La inhibición de IIIIG9 también genera un cúmulo celular en la cavidad ventricular la cual presenta células transducidas en verde.

Es posible que la pérdida de células endimarias y la presencia de virus en el ventrículo induzcan la Infiltración leucocitaria en la zona de la lesión (Burda y col. 2014). Estos leucocitos pueden ser a su vez transducidos por la administración continua de virus expresando GFP. Otra aproximación que podría explicar este fenómeno es que la inhibición continua de IIIIG9 provocaría la transformación del epitelio endimario transducido en células neoplásicas, las cuales pudiesen desarrollar un tumor ventricular (Moynihan y col. 2003). Otra opción es la generación de neuroblastos en el área de denudación endimaria, lo que generaría estos cúmulos celulares (Gomez-Roldan y col. 2008). Una última explicación sería la apoptosis generada por la inhibición de IIIIG9 en las células endimarias. Una identificación detallada utilizando marcadores de linaje neuronal o linaje leucocitario, o de caspasa-3 clivada podrán resolver esta interrogante.

Durante la transición de glía radial a célula endimaria, la expresión de GFAP se pierde, mientras que aumenta la expresión de marcadores endimarios S100B y vimentina. En un modelo murino Knock-Out para la proteína p73, se ha demostrado que su deficiencia altera el proceso de diferenciación y maduración de la glía radial hacia célula endimaria: se observaron células con marcaje triple para S100B, vimentina y GFAP, y algunas de ellas positivas para GLAST (Gonzalez-Cano y col. 2016). Nuestros resultados mostraron que las células endimarias

transducidas con el virus inhibidor de IIIIG9 pierden la polaridad, y se encuentra rodeadas de una cicatriz glial. Es posible que a diferencia del ejemplo de p73, donde la inhibición de esta proteína causa una deficiencia en la maduración, el efecto de la inhibición de IIIIG9 sea más nocivo, generando apoptosis, lo que explicaría el fenómeno de denudación endimaria y posterior gliosis reactiva.

Tanto en adulto como en postnatal, la inhibición de IIIIG9 genera una denudación endimaria, es decir, una disrupción y pérdida de la continuidad del epitelio endimario, ya sea parcial (en postnatal) como total (en adulto), y posteriormente esta denudación gatilla una respuesta de gliosis reactiva secundaria, como ha sido reportado en otros modelos de denudación endimaria (Gomez-Roldan y col. 2008; Luo y col. 2008; Feldner y col. 2017; Salazar y col, 2018). ¿Qué mecanismos estarían involucrados en la disrupción endimaria generada por la inhibición de IIIIG9? Diversos estudios muestran que la inhibición de proteínas claves para el movimiento ciliar genera hidrocefalia, pero no comprometen mayormente la morfología del cilio (Lechtreck y col. 2008); en cambio una disrupción de las uniones adherentes genera apoptosis endimaria y/o denudación de la pared ventricular (Rodriguez y col. 2012; Oliver y col. 2013).

Independiente de estas dos aproximaciones basadas en la localización ciliar o en las uniones adherentes, en ambos casos IIIIG9 podría funcionar como una proteína que recluta a la proteína fosfatasa-1 para regular los niveles de fosforilación, en ambas localizaciones subcelulares. Más de 500 proteínas pueden unirse a PP1. Estas proteínas pueden ser inhibidores, sustratos, especificadores de sustratos, o subunidades de anclaje. La mayoría se une a todas las isoformas,

aunque algunas también presentan mayor afinidad por ciertas isoformas de PP1. Las múltiples combinaciones posibles entre las isoformas catalíticas y las subunidades regulatorias resulta en una gran variedad de holoenzimas de PP1 que regulan virtualmente todos los procesos celulares. Estudios han demostrado que la isoforma catalítica PP1 α regula el mantenimiento de las uniones estrechas en la línea celular MDCK, mediando la defosforilación de Par-3, formando un complejo funcional con Par-3 y aPKC en los dominios apicales de las células epiteliales (Traweger y col. 2008). PP1 α ha sido relacionado a la regulación del complejo de cadherina-catenina en las uniones adherentes para facilitar la migración colectiva en un modelo de migración celular en *Drosophila* (Chen y col. 2020). De manera similar, el análisis del interactoma de E-cadherina mostró que PP1 α y Par-3 son candidatos de interacción biológica (Guo y col. 2014). En este contexto, IIIG9 podría funcionar como un candidato de anclaje que facilita la interacción entre PP1 y las proteínas asociadas a la unión célula-célula en el epitelio endotelial, y posiblemente, en el resto de los epitelios multiciliados. La denudación endotelial podría estar provocada por una desregulación en los niveles de fosforilación de los complejos multiprotéicos de unión célula-célula, producto de la inhibición adenoviral de IIIG9 en un modelo adulto y perinatal.

Otras proteínas de andamiaje han sido estudiadas, las cuales apuntan a un fenotipo relativamente estereotipado de disrupción endotelial o un retraso en la maduración endotelial con una astrogliosis reactiva secundaria:

MPDZ (*multi-PDZ domain protein*), es una proteína de andamiaje asociada a proteínas de unión célula-célula (Claudina-1, ZO-3, Par6, Nectina) presente en la

pared endimaria. Se ha demostrado que en animales Knock-out para esta proteína, que se genera apoptosis detectado como un aumento del marcador de apoptosis caspasa-3 clivada y denudación endimaria parcial, acompañada de astrogliosis reactiva, lo que provoca una estenosis acueductal y la consecuente hidrocefalia (Feldner y col. 2017). Un modelo homocigoto de hidrocefalia en el cual se generó una mutación en la proteína JHY (*Junctional Cadherin Complex Regulator* o *C11orf63*), demostró que la pérdida de esta proteína genera defectos en la organización microtubular en cilios, se retrasa temporalmente y morfológicamente la diferenciación de la glía radial en célula endimaria, y genera una deslocalización anormal de las proteínas N-cadherina y B-catenina (Muniz-Talavera y col. 2017). En este caso los autores no atribuyen una denudación ventricular aparente. En otro modelo murino, las mutaciones a un gen que codifica para la proteína *Hydin* generan un epitelio endimario que presenta cilios estructuralmente normales, mientras que son inmóviles producto de defectos a nivel de microtúbulos, lo que provoca una hidrocefalia perinatal (Lechtrek y col. 2008). Un último modelo que es interesante comparar es la generación de un modelo knock-out de PPP1R35 (subunidad regulatoria 35 de la proteína fosfatasa-1) que fisiológicamente participa en la maduración del centriolo a centrosoma (Fong y col. 2018). La delección de PPP1R35 mostró que afecta la formación del cilio primario y genera alteraciones desde el estadio embrionario E8 (Archambault y col. 2020). Nuestro trabajo mostró que la inhibición de IIG9 en estadios perinatales generan una disrupción a nivel del epitelio endimario, mientras que no realizamos aproximaciones experimentales para realizar la inhibición en estadios embrionarios. Es posible que el fenotipo resultante sea aún más agresivo que lo observado en la inhibición adulta o perinatal,

en el caso que IIIIG9 también cumpla ciertas funciones a nivel de cilio primario en el epitelio ventricular durante el estadio embrionario.

En este trabajo, hemos demostrado que la inhibición de IIIIG9 afecta negativamente la integridad de la pared endimaria *in vivo*, generando una astrogliosis secundaria en la zona subventricular. Postulamos que IIIIG9 regula la polarización del epitelio endimario adulto y la diferenciación postnatal mediante la regulación de las uniones intercelulares en el área ventricular. Un análisis detallado del fenotipo generado por la inhibición de IIIIG9 en tiempos más cortos podrá entregar mayores herramientas para resolver esta interrogante. De manera similar, la inhibición de IIIIG9 en estadios embrionarios podrá entregar mayores antecedentes acerca de los efectos de la inhibición de IIIIG9 en la glía radial y los efectos sobre la diferenciación previo al nacimiento, para evaluar el desarrollo de un fenotipo hidrocefálico perinatal.



5.5. IIIIG9 en un modelo tumoral derivado de la glía radial humana.

En el contexto fisiopatológico humano, la glía radial humana puede generar un tipo de tumores conocidos como endimomas. Los endimomas presentan características ultraestructurales, inmunohistoquímicas, moleculares y genéticas similares a la glía radial (Taylor y col. 2005). Sin embargo, el estudio clínico de los endimomas se ha visto obstaculizado por la falta de modelos preclínicos para la investigación de esta patología. La línea celular EP1NS presente en nuestro laboratorio muestra la expresión de marcadores de célula troncal, auto-renovación, capacidad de formación de esferoides *in vitro* y tumorigenicidad *in vivo* (Milde y col.

2011), por lo cual se convierte en un excelente modelo para el estudio de esta patología. Esta línea celular fue caracterizada y presenta la característica de un subgrupo de ependimoma conocido como “Rela-Fusión” (Sabnis y col. 2019), subgrupo que presenta deleciones y rearrreglos aberrantes, hacia el brazo largo del cromosoma 11, entre los segmentos 11q12.1 a 11q13.3 (Parker y col. 2014). En humano, IIG9 está presente en el locus 11q12.2 (Taylor y col. 2006), por lo que, en principio, este gen podría estar sujeto a estos cambios genómicos aberrantes, alterando su expresión o su función. Nuestros resultados mostraron que esta línea celular expresa el ARN mensajero para IIG9, sin embargo, no fue detectado a nivel de proteína. La presencia de mutaciones que impidan la correcta traducción de IIG9 podría ser la causa principal asociada a su ausencia. Analizamos el efecto de la ganancia de función de IIG9 en la línea celular de ependimoma, y encontramos que el área promedio de las células positivas a GFP aumenta respecto del control al aumentar los días en cultivo, comportamiento que se mantuvo hasta los 6,5 días post-transfección. Este aumento del área promedio provocada por la expresión ectópica de IIG9 podría indicar que esta proteína cumple funciones en la reorganización del citoesqueleto facilitando la expansión celular, e incluso podría revertir ciertas características de la transformación tumoral de esta línea celular. La sobreexpresión de IIG9 *in vitro* en distintas líneas celulares no relacionadas con los epitelios multiciliados podrá dar indicios acerca de una función de IIG9 sobre el aumento del área superficial, si la expresión de IIG9 es suficiente, o requiere de más interactores transcripcionalmente relacionados con las vías de señalización de los epitelios multiciliados.

Las células endimarias aumentan notablemente su área durante el proceso de diferenciación y maduración, período crítico donde las células sobreexpresan IIIIG9 en su citoplasma. Mencionado anteriormente, un estudio determinó que la dilatación ventricular en el estadio postnatal temprano está relacionada con el aumento del área apical en las células E1 en proceso de maduración respecto de las células B1 (Redmond y col. 2019). El aumento del área apical endimaria se relaciona con el aumento fisiológico del tamaño de las células que sobreexpresan IIIIG9 a nivel del citoplasma. La expresión transiente de IIIIG9 en la línea celular de endimoma genera un fenotipo equivalente, donde las células transfectadas (GFP+) presentan una mayor área respecto al control. La función de IIIIG9 estaría asociada a la mantención de las uniones célula-célula, permitiendo un aumento del área de la célula. La recuperación de la función de IIIIG9 podría retardar la transformación tumoral en un modelo de endimoma. Futuros estudios que evalúen una disminución de las propiedades tumorigénicas *in vivo* al xeno-transplantar esta línea celular que previamente sobreexpresen IIIIG9, será crítico para profundizar en esta hipótesis.

5.6. Funcionalidad de IIIIG9 durante el desarrollo

El gen de IIIIG9, también llamado PPP1R32 corresponde a una subunidad reguladora de la proteína fosfatasa 1 (PP1). PP1 es una fosfatasa de serina/treonina, conservada y ubicua, que cataliza un tercio de todas las desfosforilaciones de proteínas en células eucariontes. Se han descrito diversos interactores de PP1 que poseen en común motivos de anclaje a esta fosfatasa,

siendo RvXF el más importante. La localización, especificidad y actividad de esta fosfatasa depende de la formación de complejos oligoméricos con estas proteínas interactoras de PP1 (Korrodí-Gregorio y col. 2014). IIG9 posee este motivo de anclaje y se ha demostrado su interacción (Hendrickx y col. 2009; Fardilha y col., 2011). Nosotros postulamos que IIG9 podría funcionar como proteína de andamiaje, para la correcta localización de PP1 en los bordes celulares, regulando la mantención de las uniones célula-célula. Sin embargo, la relación entre las proteínas reguladoras, PP1 y las uniones adherentes sigue pobremente descrita en mamíferos. Se ha demostrado que tanto PP1 como PP2A son fosfatasas involucradas en la regulación de uniones intercelulares estrechas y adherentes. Estudios *in vitro* han demostrado que las fosfatasas PP1 y PP2A regulan las uniones intercelulares mediadas por ocludina y ZO-1 (Seth y col. 2007; McCole, 2013). Es posible que la inhibición de IIG9 provoque una redistribución de PP1 perdiendo afinidad hacia las uniones intercelulares, lo cual generaría una disminución de la adhesión celular producto de la deslocalización de PP1. Finalmente, la inhibición de uniones intercelulares produce la pérdida del epitelio endimario con una respuesta de gliosis reactiva. Para comprobar esta hipótesis es necesario realizar estudios de localización de PP1 en epitelio endimario normal y epitelio transducido con adenovirus sIIG9-GFP a tiempos cortos en busca de una redistribución de la marca para PP1.

El análisis de nuestros resultados y los de otros autores es sintetizado en nuestro modelo de estudio (Fig. 29). Durante el estadio neurogénico, ocurre la especificación de la glía radial que se diferencia a célula endimaria, período en el

cual IIIIG9 está localizado en las cavidades ventriculares y mantiene una distribución en las uniones célula-célula. En el estadio postnatal temprano, aparecen células endimarias en proceso de maduración que localizan IIIIG9 citoplasmático intenso, que luego es polarizado hacia los cilios móviles, adicional a los complejos de unión. La inhibición de IIIIG9 genera una disrupción endimaria y una gliosis reactiva secundaria a la inhibición tanto en estadio postnatal como adulto. En un contexto patológico, la transformación tumoral de la glía radial humana genera endimomas, y uno de los subtipos agresivos de esta patología falla al localizar IIIIG9 a nivel de proteína.

En conjunto, los resultados de esta tesis muestran que IIIIG9 posee funciones pleiotrópicas además de su función ciliar. La inhibición de IIIIG9 genera una disrupción de las uniones célula-célula de manera agresiva, por lo que ocurre una gliosis reactiva secundaria al fenotipo desorganizado a nivel ventricular, tanto en el estadio adulto, como durante el desarrollo postnatal. IIIIG9 es requerido para la mantención de las uniones célula-célula durante el período de diferenciación y maduración del epitelio endimario y se sugiere que la recuperación de función de IIIIG9 en un modelo de endimoma podría retardar su capacidad tumorigénica.

Nuestro trabajo cobra relevancia al vincular el fenotipo patológico generado por la inhibición de IIIIG9 con una función extraciliar de IIIIG9 en la mantención de las uniones célula-célula. Más trabajo es requerido para descifrar y distinguir sus funciones ciliares y no ciliares y el contexto en el cual estas proteínas podrían estar regulando la mantención de las uniones célula-célula en el epitelio multiciliado. Esto es relevante en el caso del epitelio endimario, ya que solo se genera una vez

durante el desarrollo, y un mayor estudio respecto de los factores que promueven su diferenciación y maduración, podrán a futuro generar estrategias para promover la reparación de la citoarquitectura ventricular en condiciones patológicas.



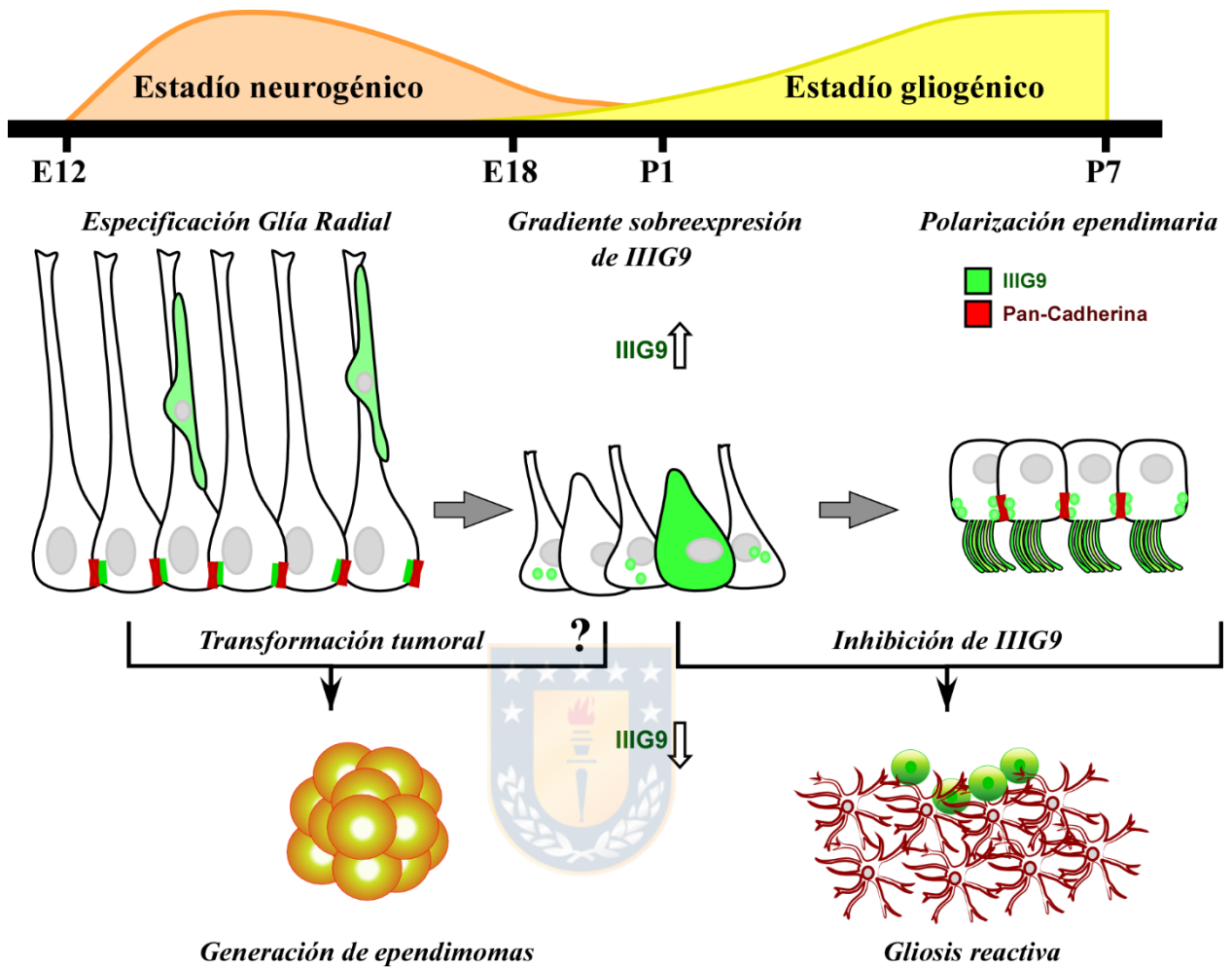


Figura 29. Modelo de la localización espacio-temporal de IIIG9 durante el desarrollo embrionario y postnatal del neuroepitelio. IIIG9 se localiza en las paredes ventriculares durante el período de especificación endimaria, y mantiene una localización en las uniones célula-célula hasta el nacimiento. Posteriormente, las células endimarias en proceso de maduración sobre-expresan IIIG9 a nivel citoplasmático en un gradiente postero-anterior. En el estadio adulto, IIIG9 se localiza en los bordes celulares y los cilios móviles. La inhibición de IIIG9 genera una disrupción endimaria y una gliosis reactiva secundaria a la inhibición.

6. CONCLUSIONES

1. En la pared ependimaria adulta, la inhibición de IIIG9 desorganiza la estructura epitelial, demostrando que es una proteína requerida en la interacción célula-célula en este epitelio diferenciado.

2. La inhibición de la expresión de IIIG9 (neonatal) interfiere con la formación de la pared ependimaria, afectando la cito-arquitectura ventricular. Esto permite postular un rol esencial en la mantención de las uniones célula-célula en el epitelio ventricular en diferenciación.

3. Nuestros datos preliminares, nos permiten proponer, que la disminución de los niveles de IIIG9 en células ependimarias con características embrionarias, podría potenciar el crecimiento celular, y eventualmente la agresividad tumoral.

7. ANEXO

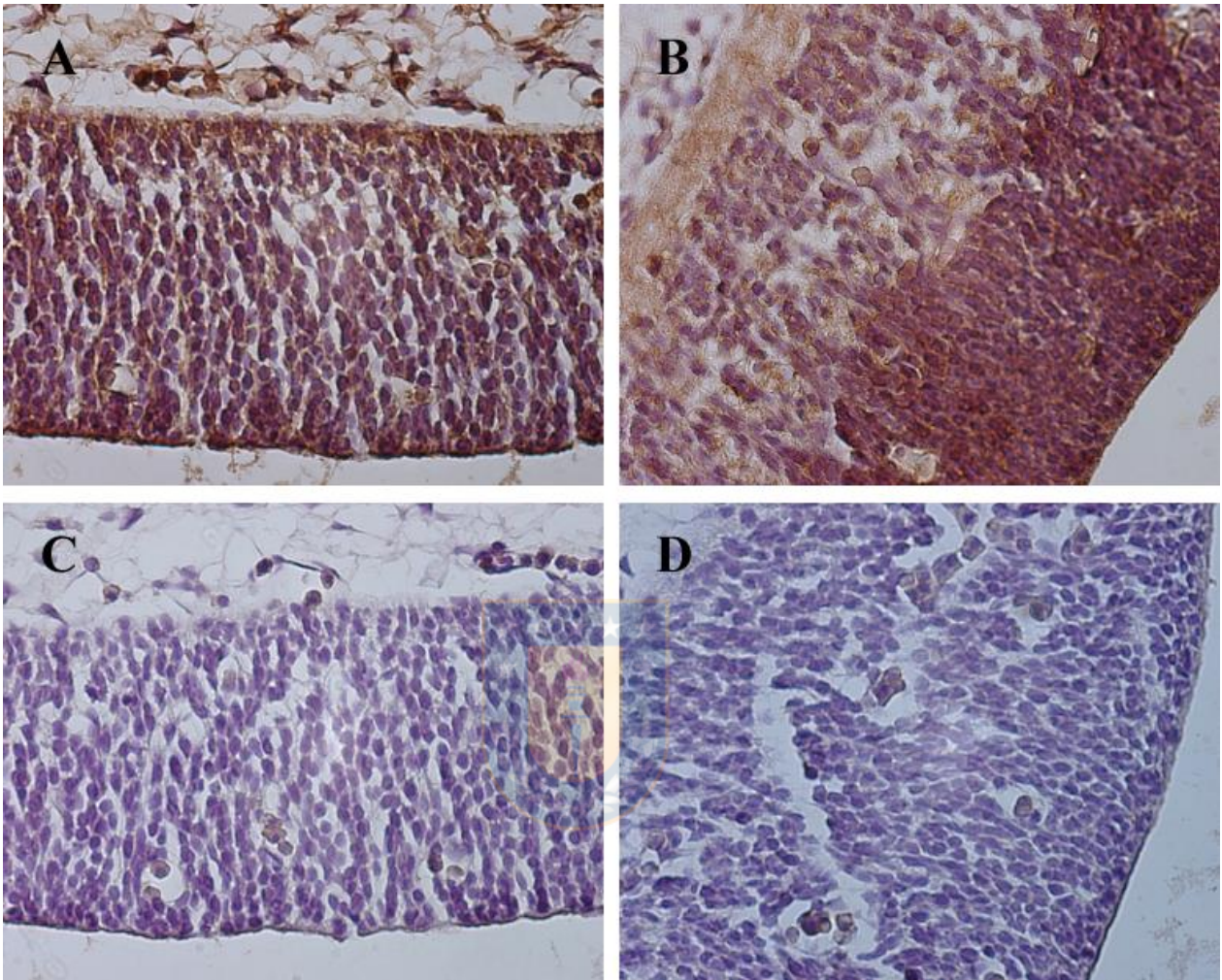


Figura 30. Estandarización de inmunoreactividad para III G9 en cortes de embrión E15.

Inmunohistoquímica con peroxidasa en cortes transversales de embrión de rata de 15 días. A y B control negativo incubado sin el anticuerpo primario. C y D. Inmunorreacción obtenida al incubar el anticuerpo primario dirigido contra III G9 en la dilución de trabajo. Aumento: 40X.

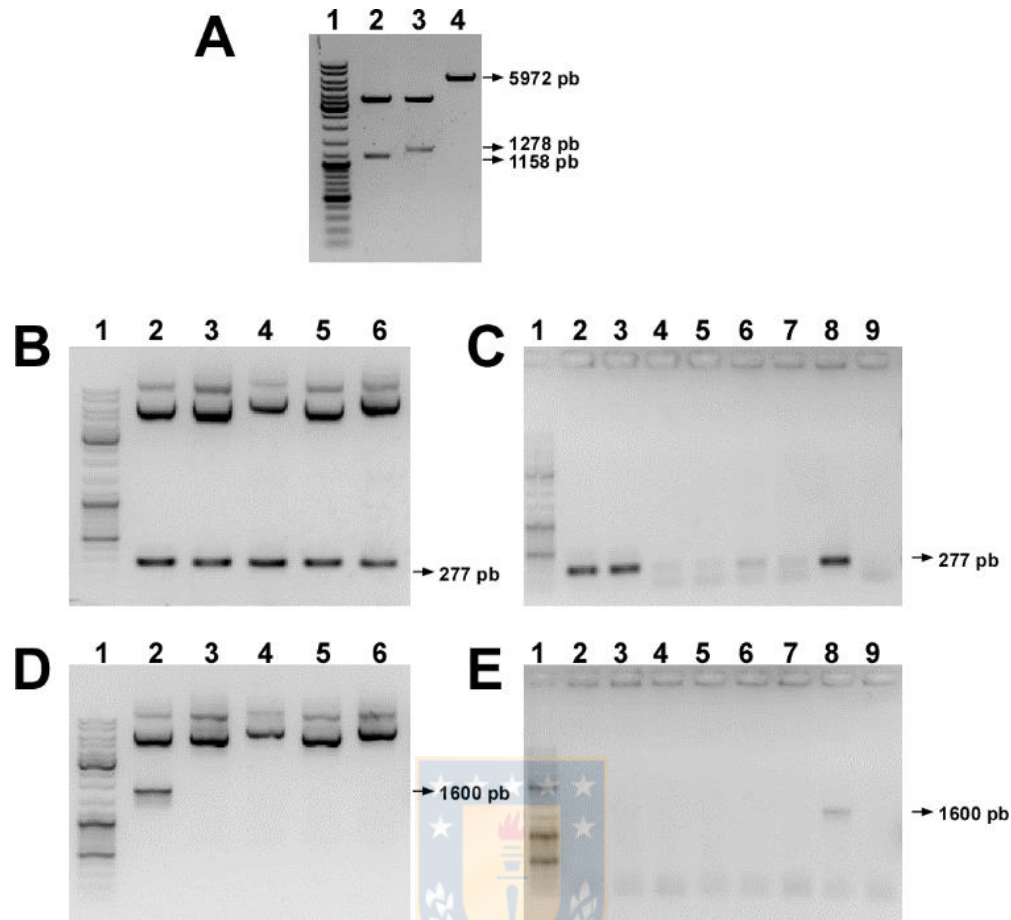


Figura 31. Estrategia de clonamiento de las isoformas larga y corta de IIIG9 en vector de expresión pAAV-Ires-GFP a partir de vectores de pasaje TOPO-Blunt. **A.** Digestión con BamHI de vectores TOPO que contienen la isoforma corta (Carril 2) o larga (carril 3) de IIIG9 de rata con extremos BamHI o vector de expresión pAAV-Ires-GFP linealizado (carril 4). **B.** Análisis de PCR de distintos clones del vector de expresión ligado a la isoforma corta de IIIG9 (pAAV-IIIG9s-Ires-GFP). La presencia de una banda de 277pb es indicativa de la presencia de la isoforma corta (carriles 2-6). **C.** Análisis de PCR de colonias transformadas con el producto de ligación de la isoforma larga de IIIG9 y el vector de expresión. Carriles 2, 3 y 8 presentan IIIG9L. **D.** Determinación de orientación de IIIG9s dentro del vector de expresión mediante PCR, donde la amplificación de un fragmento de 1600pb es indicativo de orientación correcta (carril 2). **E.** Determinación de orientación de IIIG9L en el vector de expresión mediante PCR donde el carril 8 presenta un tamaño esperado para la orientación correcta.

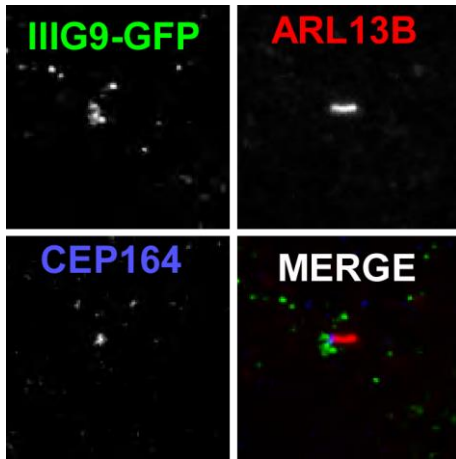


Figura 32. IIIIG9 se localiza en la base del cilio primario en un modelo in vitro. Se utilizó la línea celular IMCD3 en la cual se sobreexpresó IIIIG9 unida a GFP, y se depletó de suero para inducir la formación del cilio primario en fase G0. Inmunofluorescencia para el marcador ciliar ARL13B (rojo) y el componente del cuerpo basal CEP164 (azul). En verde se observa que IIIIG9 se distribuye en la base del cilio primario (Modificado de Sigg y col. *Developmental Cell*. 2017).



8. REFERENCIAS

1. Alfaro-Cervello C, Soriano-Navarro M, Mirzadeh Z, Alvarez-Buylla A and Garcia-Verdugo JM (2012) Biciliated ependymal cell proliferation contributes to spinal cord growth. *J Comp Neurol* 520:3528-52. doi: 10.1002/cne.23104
2. Alvarez JI and Teale JM (2007) Differential changes in junctional complex proteins suggest the ependymal lining as the main source of leukocyte infiltration into ventricles in murine neurocysticercosis. *J Neuroimmunol* 187:102-13. doi: 10.1016/j.jneuroim.2007.05.005
3. Archambault D, Cheong A, Iverson E, Tremblay KD and Mager J (2020) Protein phosphatase 1 regulatory subunit 35 is required for ciliogenesis, notochord morphogenesis, and cell-cycle progression during murine development. *Dev Biol* 465:1-10. doi: 10.1016/j.ydbio.2020.06.011
4. Barry D and McDermott K (2005) Differentiation of radial glia from radial precursor cells and transformation into astrocytes in the developing rat spinal cord. *Glia* 50:187-97. doi: 10.1002/glia.20166
5. Bertocchi C, Vaman Rao M and Zaidel-Bar R (2012) Regulation of adherens junction dynamics by phosphorylation switches. *J Signal Transduct* 2012:125295. doi: 10.1155/2012/125295
6. Bolborea M and Dale N (2013) Hypothalamic tanycytes: potential roles in the control of feeding and energy balance. *Trends Neurosci* 36:91-100. doi: 10.1016/j.tins.2012.12.008
7. Boon M, Wallmeier J, Ma L, Loges NT, Jaspers M, Olbrich H, Dougherty GW, Raidt J, Werner C, Amirav I, Hevroni A, Abitbul R, Avital A, Soferman R, Wessels M, O'Callaghan C, Chung EM, Rutman A, Hirst RA, Moya E, Mitchison HM, Van Daele S, De Boeck K, Jorissen M, Kintner C, Cuppens H and Omran H (2014) MCIDAS mutations result in a mucociliary clearance disorder with reduced generation of multiple motile cilia. *Nat Commun* 5:4418. doi: 10.1038/ncomms5418
8. Bouille C, Mesnil M, Barriere H and Gabrion J (1991) Gap junctional intercellular communication between cultured ependymal cells, revealed by lucifer yellow CH transfer and freeze-fracture. *Glia* 4:25-36. doi: 10.1002/glia.440040104
9. Braun DA and Hildebrandt F (2017) Ciliopathies. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 9. doi: 10.1101/cshperspect.a028191

10. Brightman MW and Reese TS (1969) Junctions between intimately apposed cell membranes in the vertebrate brain. *J Cell Biol* 40:648-77. doi: 10.1083/jcb.40.3.648
11. Burda JE and Sofroniew MV (2014) Reactive gliosis and the multicellular response to CNS damage and disease. *Neuron* 81:229-48. doi: 10.1016/j.neuron.2013.12.034
12. Campos-Ordonez T, Herranz-Perez V, Chaichana KL, Rincon-Torroella J, Rigamonti D, Garcia-Verdugo JM, Quinones-Hinojosa A and Gonzalez-Perez O (2014) Long-term hydrocephalus alters the cytoarchitecture of the adult subventricular zone. *Exp Neurol* 261:236-44. doi: 10.1016/j.expneurol.2014.05.011
13. Cifuentes M, Baeza V, Arrabal PM, Visser R, Grondona JM, Saldivia N, Martinez F, Nualart F and Salazar K (2017) Expression of a Novel Ciliary Protein, I11G9, During the Differentiation and Maturation of Ependymal Cells. doi: 10.1007/s12035-017-0434-5
14. Cortes-Campos C, Elizondo R, Carril C, Martinez F, Boric K, Nualart F and Garcia-Robles MA (2013) MCT2 expression and lactate influx in anorexigenic and orexigenic neurons of the arcuate nucleus. *PLoS One* 8:e62532. doi: 10.1371/journal.pone.0062532
15. Chen Y, Kotian N, Aranjuez G, Chen L, Messer CL, Burtscher A, Sawant K, Ramel D, Wang X and McDonald JA (2020) Protein phosphatase 1 activity controls a balance between collective and single cell modes of migration. *Elife* 9. doi: 10.7554/eLife.52979
16. Chiasserini D, van Weering JR, Piersma SR, Pham TV, Malekzadeh A, Teunissen CE, de Wit H and Jimenez CR (2014) Proteomic analysis of cerebrospinal fluid extracellular vesicles: a comprehensive dataset. *J Proteomics* 106:191-204. doi: 10.1016/j.jprot.2014.04.028
17. Danielson PE, Sautkulis LN, Foye PE, Hedlund PB and Carson MJ (2002) A novel mRNA expressed along brain ventricles. *Brain Res Gene Expr Patterns* 1:83-8.
18. Del Bigio MR (2010) Ependymal cells: biology and pathology. *Acta Neuropathol* 119:55-73. doi: 10.1007/s00401-009-0624-y
19. Del Carmen Gómez-Roldán M, Pérez-Martín M, Capilla-González V, Cifuentes M, Pérez J, García-Verdugo JM and Fernández-Llebrez P (2008) Neuroblast proliferation on the surface of the adult rat striatal wall after focal ependymal loss by intracerebroventricular injection of neuraminidase. *Journal of Comparative Neurology* 507:1571-1587.
20. Deren KE, Packer M, Forsyth J, Milash B, Abdullah OM, Hsu EW and McAllister JP, 2nd (2010) Reactive astrocytosis, microgliosis and inflammation in rats with neonatal hydrocephalus. *Exp Neurol* 226:110-9. doi: 10.1016/j.expneurol.2010.08.010

21. Dermietzel R (1975) Junctions in the central nervous system of the cat. V. The junctional complex of the pia-arachnoid membrane. *Cell Tissue Res* 164:309-29. doi: 10.1007/BF00223012
22. Di Curzio DL, Nagra G, Mao X and Del Bigio MR (2018) Memantine treatment of juvenile rats with kaolin-induced hydrocephalus. *Brain Res* 1689:54-62. doi: 10.1016/j.brainres.2018.04.001
23. Doetsch F, Garcia-Verdugo JM and Alvarez-Buylla A (1997) Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain. *J Neurosci* 17:5046-61.
24. Doetsch F, Petreanu L, Caille I, Garcia-Verdugo JM and Alvarez-Buylla A (2002) EGF converts transit-amplifying neurogenic precursors in the adult brain into multipotent stem cells. *Neuron* 36:1021-34. doi: 10.1016/s0896-6273(02)01133-9
25. Eichele G, Bodenschatz E, Ditte Z, Gunther AK, Kapoor S, Wang Y and Westendorf C (2020) Cilia-driven flows in the brain third ventricle. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 375:20190154. doi: 10.1098/rstb.2019.0154
26. Fardilha M, Esteves SL, Korrodi-Gregorio L, Vintem AP, Domingues SC, Rebelo S, Morrice N, Cohen PT, da Cruz e Silva OA and da Cruz e Silva EF (2011) Identification of the human testis protein phosphatase 1 interactome. *Biochem Pharmacol* 82:1403-15. doi: 10.1016/j.bcp.2011.02.018
27. Faubel R, Westendorf C, Bodenschatz E and Eichele G (2016) Cilia-based flow network in the brain ventricles. *Science* 353:176-8. doi: 10.1126/science.aae0450
28. Feldner A, Adam MG, Tetzlaff F, Moll I, Komljenovic D, Sahm F, Bauerle T, Ishikawa H, Schrotten H, Korff T, Hofmann I, Wolburg H, von Deimling A and Fischer A (2017) Loss of Mpdz impairs ependymal cell integrity leading to perinatal-onset hydrocephalus in mice. *EMBO Mol Med* 9:890-905. doi: 10.15252/emmm.201606430
29. Felten DL, Cummings JP and Burnett BT (1981) Ontogeny of caudal fourth ventricular tanycytes in the rabbit brain: a Golgi study. *Anat Rec* 200:321-30. doi: 10.1002/ar.1092000312
30. Fliegauf M, Benzing T and Omran H (2007) When cilia go bad: cilia defects and ciliopathies. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8:880-93. doi: 10.1038/nrm2278
31. Fong CS, Ozaki K and Tsou MB (2018) PPP1R35 ensures centriole homeostasis by promoting centriole-to-centrosome conversion. *Mol Biol Cell* 29:2801-2808. doi: 10.1091/mbc.E18-08-0525

32. Fuentealba LC, Rompani SB, Parraguez JI, Obernier K, Romero R, Cepko CL and Alvarez-Buylla A (2015) Embryonic Origin of Postnatal Neural Stem Cells. *Cell* 161:1644-55. doi: 10.1016/j.cell.2015.05.041
33. Gakovic M, Shu X, Kasioulis I, Carpanini S, Moraga I and Wright AF (2011) The role of RPGR in cilia formation and actin stability. *Hum Mol Genet* 20:4840-50. doi: 10.1093/hmg/ddr423
34. Godfraind C (2009) Classification and controversies in pathology of ependymomas. *Childs Nerv Syst* 25:1185-93. doi: 10.1007/s00381-008-0804-4
35. Gonzalez-Cano L, Fuertes-Alvarez S, Robledinos-Anton N, Bizy A, Villena-Cortes A, Farinas I, Marques MM and Marin MC (2016) p73 is required for ependymal cell maturation and neurogenic SVZ cytoarchitecture. *Dev Neurobiol* 76:730-47. doi: 10.1002/dneu.22356
36. Grondona JM, Granados-Duran P, Fernandez-Llebrez P and Lopez-Avalos MD (2013) A simple method to obtain pure cultures of multiciliated ependymal cells from adult rodents. *Histochem Cell Biol* 139:205-20. doi: 10.1007/s00418-012-1008-2
37. Grusche FA, Hidalgo C, Fletcher G, Sung HH, Sahai E and Thompson BJ (2009) Sds22, a PP1 phosphatase regulatory subunit, regulates epithelial cell polarity and shape [Sds22 in epithelial morphology]. *BMC Dev Biol* 9:14. doi: 10.1186/1471-213X-9-14
38. Guan S, Shen R, Lafortune T, Tiao N, Houghton P, Yung WK and Koul D (2011) Establishment and characterization of clinically relevant models of ependymoma: a true challenge for targeted therapy. *Neuro Oncol* 13:748-58. doi: 10.1093/neuonc/nor037
39. Guemez-Gamboa A, Coufal NG and Gleeson JG (2014) Primary cilia in the developing and mature brain. *Neuron* 82:511-21. doi: 10.1016/j.neuron.2014.04.024
40. Guo Z, Neilson LJ, Zhong H, Murray PS, Zanivan S and Zaidel-Bar R (2014) E-cadherin interactome complexity and robustness resolved by quantitative proteomics. *Sci Signal* 7:rs7. doi: 10.1126/scisignal.2005473
41. Haubensak W, Attardo A, Denk W and Huttner WB (2004) Neurons arise in the basal neuroepithelium of the early mammalian telencephalon: a major site of neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:3196-201. doi: 10.1073/pnas.0308600100
42. Hendrickx A, Beullens M, Ceulemans H, Den Abt T, Van Eynde A, Nicolaescu E, Lesage B and Bollen M (2009) Docking motif-guided mapping of the interactome of protein phosphatase-1. *Chem Biol* 16:365-71. doi: 10.1016/j.chembiol.2009.02.012
43. Heroes E, Lesage B, Gornemann J, Beullens M, Van Meervelt L and Bollen M (2013) The PP1 binding code: a molecular-lego strategy that governs specificity. *FEBS J* 280:584-95. doi: 10.1111/j.1742-4658.2012.08547.x

44. Hua K and Ferland RJ (2018) Primary cilia proteins: ciliary and extraciliary sites and functions. *Cell Mol Life Sci* 75:1521-1540. doi: 10.1007/s00018-017-2740-5
45. Ibanez-Tallon I, Heintz N and Omran H (2003) To beat or not to beat: roles of cilia in development and disease. *Hum Mol Genet* 12 Spec No 1:R27-35. doi: 10.1093/hmg/ddg061
46. Ishikawa H and Marshall WF (2011) Ciliogenesis: building the cell's antenna. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12:222-34. doi: 10.1038/nrm3085
47. Ivliev AE, t Hoen PA, van Roon-Mom WM, Peters DJ and Sergeeva MG (2012) Exploring the transcriptome of ciliated cells using in silico dissection of human tissues. *PLoS One* 7:e35618. doi: 10.1371/journal.pone.0035618
48. Jacquet BV, Salinas-Mondragon R, Liang H, Therit B, Buie JD, Dykstra M, Campbell K, Ostrowski LE, Brody SL and Ghashghaei HT (2009) FoxJ1-dependent gene expression is required for differentiation of radial glia into ependymal cells and a subset of astrocytes in the postnatal brain. *Development* 136:4021-31. doi: 10.1242/dev.041129
49. Jacquet BV, Muthusamy N, Sommerville LJ, Xiao G, Liang H, Zhang Y, Holtzman MJ and Ghashghaei HT (2011) Specification of a Foxj1-dependent lineage in the forebrain is required for embryonic-to-postnatal transition of neurogenesis in the olfactory bulb. *J Neurosci* 31:9368-82. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0171-11.2011
50. Jara N, Cifuentes M, Martinez F, Salazar K and Nualart F (2016) Cytoarchitecture, Proliferative Activity and Neuroblast Migration in the Subventricular Zone and Lateral Ventricle Extension of the Adult Guinea Pig Brain. *Stem Cells* 34:2574-2586. doi: 10.1002/stem.2430
51. Jiang Y, Scott KL, Kwak SJ, Chen R and Mardon G (2011) Sds22/PP1 links epithelial integrity and tumor suppression via regulation of myosin II and JNK signaling. *Oncogene* 30:3248-60. doi: 10.1038/onc.2011.46
52. Jimenez AJ, Dominguez-Pinos MD, Guerra MM, Fernandez-Llebrez P and Perez-Figares JM (2014) Structure and function of the ependymal barrier and diseases associated with ependyma disruption. *Tissue Barriers* 2:e28426. doi: 10.4161/tisb.28426
53. Knowles MR, Daniels LA, Davis SD, Zariwala MA and Leigh MW (2013) Primary ciliary dyskinesia. Recent advances in diagnostics, genetics, and characterization of clinical disease. *Am J Respir Crit Care Med* 188:913-22. doi: 10.1164/rccm.201301-0059CI
54. Korrodi-Gregorio L, Esteves SL and Fardilha M (2014) Protein phosphatase 1 catalytic isoforms: specificity toward interacting proteins. *Transl Res* 164:366-91. doi: 10.1016/j.trsl.2014.07.001

55. Kotsis F, Boehlke C and Kuehn EW (2013) The ciliary flow sensor and polycystic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant* 28:518-26. doi: 10.1093/ndt/gfs524
56. Kratzer I, Ek J and Stolp H (2020) The molecular anatomy and functions of the choroid plexus in healthy and diseased brain. *Biochim Biophys Acta Biomembr* 1862:183430. doi: 10.1016/j.bbamem.2020.183430
57. Kriegstein A and Alvarez-Buylla A (2009) The glial nature of embryonic and adult neural stem cells. *Annu Rev Neurosci* 32:149-84. doi: 10.1146/annurev.neuro.051508.135600
58. Kuo CT, Mirzadeh Z, Soriano-Navarro M, Rasin M, Wang D, Shen J, Sestan N, Garcia-Verdugo J, Alvarez-Buylla A, Jan LY and Jan YN (2006) Postnatal deletion of Numb/Numbl like reveals repair and remodeling capacity in the subventricular neurogenic niche. *Cell* 127:1253-64. doi: 10.1016/j.cell.2006.10.041
59. Kutna V, Sevc J, Gombalova Z, Matiasova A and Daxnerova Z (2014) Enigmatic cerebrospinal fluid-contacting neurons arise even after the termination of neurogenesis in the rat spinal cord during embryonic development and retain their immature-like characteristics until adulthood. *Acta Histochem* 116:278-85. doi: 10.1016/j.acthis.2013.08.004
60. Kyrousi C, Lygerou Z and Taraviras S (2017) How a radial glial cell decides to become a multiciliated ependymal cell. *Glia* 65:1032-1042. doi: 10.1002/glia.23118
61. Langlet F, Mullier A, Bouret SG, Prevot V and Dehouck B (2013) Tanycyte-like cells form a blood-cerebrospinal fluid barrier in the circumventricular organs of the mouse brain. *J Comp Neurol* 521:3389-405. doi: 10.1002/cne.23355
62. Lavado A and Oliver G (2011) Six3 is required for ependymal cell maturation. *Development* 138:5291-300. doi: 10.1242/dev.067470
63. Lehtreck KF, Delmotte P, Robinson ML, Sanderson MJ and Witman GB (2008) Mutations in Hydin impair ciliary motility in mice. *J Cell Biol* 180:633-43. doi: 10.1083/jcb.200710162
64. Lewis M and Stracker TH (2021) Transcriptional regulation of multiciliated cell differentiation. *Semin Cell Dev Biol* 110:51-60. doi: 10.1016/j.semcdb.2020.04.007
65. Lim DA and Alvarez-Buylla A (2016) The Adult Ventricular-Subventricular Zone (V-SVZ) and Olfactory Bulb (OB) Neurogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 8. doi: 10.1101/cshperspect.a018820
66. Lippoldt A, Jansson A, Kniesel U, Andbjør B, Andersson A, Wolburg H, Fuxe K and Haller H (2000) Phorbol ester induced changes in tight and adherens junctions in the choroid

plexus epithelium and in the ependyma. *Brain Res* 854:197-206. doi: 10.1016/s0006-8993(99)02355-0

67. López-Gambero A, Martínez F, Salazar K, Cifuentes M and Nualart F (2019) Brain glucose-sensing mechanism and energy homeostasis. *Molecular neurobiology* 56:769-796.

68. Lun MP, Monuki ES and Lehtinen MK (2015) Development and functions of the choroid plexus-cerebrospinal fluid system. *Nat Rev Neurosci* 16:445-57. doi: 10.1038/nrn3921

69. Luo J, Shook BA, Daniels SB and Conover JC (2008) Subventricular zone-mediated ependyma repair in the adult mammalian brain. *J Neurosci* 28:3804-13. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0224-08.2008

70. Malatesta P, Hartfuss E and Gotz M (2000) Isolation of radial glial cells by fluorescent-activated cell sorting reveals a neuronal lineage. *Development* 127:5253-63.

71. Malatesta P, Hack MA, Hartfuss E, Kettenmann H, Klinkert W, Kirchhoff F and Gotz M (2003) Neuronal or glial progeny: regional differences in radial glia fate. *Neuron* 37:751-64. doi: 10.1016/s0896-6273(03)00116-8

72. Marichal N, Garcia G, Radmilovich M, Trujillo-Cenoz O and Russo RE (2012) Spatial domains of progenitor-like cells and functional complexity of a stem cell niche in the neonatal rat spinal cord. *Stem Cells* 30:2020-31. doi: 10.1002/stem.1175

73. McCole DF (2013) Phosphatase regulation of intercellular junctions. *Tissue Barriers* 1:e26713. doi: 10.4161/tisb.26713

74. Meletis K, Barnabe-Heider F, Carlen M, Evergren E, Tomilin N, Shupliakov O and Frisen J (2008) Spinal cord injury reveals multilineage differentiation of ependymal cells. *PLoS Biol* 6:e182. doi: 10.1371/journal.pbio.0060182

75. Merkle FT, Tramontin AD, Garcia-Verdugo JM and Alvarez-Buylla A (2004) Radial glia give rise to adult neural stem cells in the subventricular zone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:17528-32. doi: 10.1073/pnas.0407893101

76. Merkle FT, Mirzadeh Z and Alvarez-Buylla A (2007) Mosaic organization of neural stem cells in the adult brain. *Science* 317:381-4. doi: 10.1126/science.1144914

77. Milde T, Pfister S, Korshunov A, Deubzer HE, Oehme I, Ernst A, Starzinski-Powitz A, Seitz A, Lichter P, von Deimling A and Witt O (2009) Stepwise accumulation of distinct genomic aberrations in a patient with progressively metastasizing ependymoma. *Genes Chromosomes Cancer* 48:229-38. doi: 10.1002/gcc.20635

78. Milde T, Kleber S, Korshunov A, Witt H, Hielscher T, Koch P, Kopp HG, Jugold M, Deubzer HE, Oehme I, Lodrini M, Grone HJ, Benner A, Brustle O, Gilbertson RJ, von

- Deimling A, Kulozik AE, Pfister SM, Martin-Villalba A and Witt O (2011) A novel human high-risk ependymoma stem cell model reveals the differentiation-inducing potential of the histone deacetylase inhibitor Vorinostat. *Acta Neuropathol* 122:637-50. doi: 10.1007/s00401-011-0866-3
79. Milde T, Hielscher T, Witt H, Kool M, Mack SC, Deubzer HE, Oehme I, Lodrini M, Benner A, Taylor MD, von Deimling A, Kulozik AE, Pfister SM, Witt O and Korshunov A (2012) Nestin expression identifies ependymoma patients with poor outcome. *Brain Pathol* 22:848-60. doi: 10.1111/j.1750-3639.2012.00600.x
80. Mirzadeh Z, Merkle FT, Soriano-Navarro M, Garcia-Verdugo JM and Alvarez-Buylla A (2008) Neural stem cells confer unique pinwheel architecture to the ventricular surface in neurogenic regions of the adult brain. *Cell Stem Cell* 3:265-78. doi: 10.1016/j.stem.2008.07.004
81. Mirzadeh Z, Doetsch F, Sawamoto K, Wichterle H and Alvarez-Buylla A (2010) The subventricular zone en-face: wholemount staining and ependymal flow. *J Vis Exp*. doi: 10.3791/1938
82. Mirzadeh Z, Kusne Y, Duran-Moreno M, Cabrales E, Gil-Perotin S, Ortiz C, Chen B, Garcia-Verdugo JM, Sanai N and Alvarez-Buylla A (2017) Bi- and unciliated ependymal cells define continuous floor-plate-derived tanycytic territories. *Nat Commun* 8:13759. doi: 10.1038/ncomms13759
83. Moreno MD (2016) Estudio de la organización celular y capacidad proliferativa en el tercer ventrículo de mamíferos adultos. Universitat de València.
84. Mori T, Buffo A and Gotz M (2005) The novel roles of glial cells revisited: the contribution of radial glia and astrocytes to neurogenesis. *Curr Top Dev Biol* 69:67-99. doi: 10.1016/S0070-2153(05)69004-7
85. Moynihan TJ (2003) Ependymal tumors. *Curr Treat Options Oncol* 4:517-23. doi: 10.1007/s11864-003-0052-5
86. Muniz-Talavera H and Schmidt JV (2017) The mouse *Jhy* gene regulates ependymal cell differentiation and ciliogenesis. *PLoS One* 12:e0184957. doi: 10.1371/journal.pone.0184957
87. Narita K, Kawate T, Kakinuma N and Takeda S (2010) Multiple primary cilia modulate the fluid transcytosis in choroid plexus epithelium. *Traffic* 11:287-301. doi: 10.1111/j.1600-0854.2009.01016.x
88. Narita K, Kozuka-Hata H, Nonami Y, Ao-Kondo H, Suzuki T, Nakamura H, Yamakawa K, Oyama M, Inoue T and Takeda S (2012) Proteomic analysis of multiple

primary cilia reveals a novel mode of ciliary development in mammals. *Biol Open* 1:815-25. doi: 10.1242/bio.20121081

89. Noctor SC, Martinez-Cerdeno V, Ivic L and Kriegstein AR (2004) Cortical neurons arise in symmetric and asymmetric division zones and migrate through specific phases. *Nat Neurosci* 7:136-44. doi: 10.1038/nn1172

90. Noctor SC, Martinez-Cerdeno V and Kriegstein AR (2007) Neural stem and progenitor cells in cortical development. *Novartis Found Symp* 288:59-73; discussion 73-8, 96-8.

91. Nualart F, Godoy A and Reinicke K (1999) Expression of the hexose transporters GLUT1 and GLUT2 during the early development of the human brain. *Brain Res* 824:97-104. doi: 10.1016/s0006-8993(99)01078-1

92. Ohata S, Nakatani J, Herranz-Perez V, Cheng J, Belinson H, Inubushi T, Snider WD, Garcia-Verdugo JM, Wynshaw-Boris A and Alvarez-Buylla A (2014) Loss of Dishevelleds disrupts planar polarity in ependymal motile cilia and results in hydrocephalus. *Neuron* 83:558-71. doi: 10.1016/j.neuron.2014.06.022

93. Oliver C, Gonzalez CA, Alvial G, Flores CA, Rodriguez EM and Batiz LF (2013) Disruption of CDH2/N-cadherin-based adherens junctions leads to apoptosis of ependymal cells and denudation of brain ventricular walls. *J Neuropathol Exp Neurol* 72:846-60. doi: 10.1097/NEN.0b013e3182a2d5fe

94. Ortiz-Alvarez G, Daclin M, Shihavuddin A, Lansade P, Fortoul A, Faucourt M, Clavreul S, Lalioti ME, Taraviras S, Hippenmeyer S, Livet J, Meunier A, Genovesio A and Spassky N (2019) Adult Neural Stem Cells and Multiciliated Ependymal Cells Share a Common Lineage Regulated by the Geminin Family Members. *Neuron* 102:159-172 e7. doi: 10.1016/j.neuron.2019.01.051

95. Paez-Gonzalez P, Abdi K, Luciano D, Liu Y, Soriano-Navarro M, Rawlins E, Bennett V, Garcia-Verdugo JM and Kuo CT (2011) Ank3-dependent SVZ niche assembly is required for the continued production of new neurons. *Neuron* 71:61-75. doi: 10.1016/j.neuron.2011.05.029

96. Parker M, Mohankumar KM, Punchihewa C, Weinlich R, Dalton JD, Li Y, Lee R, Tatevossian RG, Phoenix TN, Thiruvankatam R, White E, Tang B, Orisme W, Gupta K, Rusch M, Chen X, Li Y, Nagahawhatte P, Hedlund E, Finkelstein D, Wu G, Shurtleff S, Easton J, Boggs K, Yergeau D, Vadodaria B, Mulder HL, Becksfort J, Gupta P, Huether R, Ma J, Song G, Gajjar A, Merchant T, Boop F, Smith AA, Ding L, Lu C, Ochoa K, Zhao D, Fulton RS, Fulton LL, Mardis ER, Wilson RK, Downing JR, Green DR, Zhang J, Ellison DW

and Gilbertson RJ (2014) C11orf95-RELA fusions drive oncogenic NF-kappaB signalling in ependymoma. *Nature* 506:451-5. doi: 10.1038/nature13109

97. Patir A, Fraser AM, Barnett MW, McTeir L, Rainger J, Davey MG and Freeman TC (2020) The transcriptional signature associated with human motile cilia. *Sci Rep* 10:10814. doi: 10.1038/s41598-020-66453-4

98. Ramsawhook A, Lewis L, Coyle B and Ruzov A (2017) Medulloblastoma and ependymoma cells display increased levels of 5-carboxylcytosine and elevated TET1 expression. *Clin Epigenetics* 9:18. doi: 10.1186/s13148-016-0306-2

99. Rao R (2009) Occludin phosphorylation in regulation of epithelial tight junctions. *Ann N Y Acad Sci* 1165:62-8. doi: 10.1111/j.1749-6632.2009.04054.x

100. Rasin MR, Gazula VR, Breunig JJ, Kwan KY, Johnson MB, Liu-Chen S, Li HS, Jan LY, Jan YN, Rakic P and Sestan N (2007) Numb and Numbl are required for maintenance of cadherin-based adhesion and polarity of neural progenitors. *Nat Neurosci* 10:819-27. doi: 10.1038/nn1924

101. Redmond SA, Figueres-Onate M, Obernier K, Nascimento MA, Parraguez JI, Lopez-Mascaraque L, Fuentealba LC and Alvarez-Buylla A (2019) Development of Ependymal and Postnatal Neural Stem Cells and Their Origin from a Common Embryonic Progenitor. *Cell Rep* 27:429-441 e3. doi: 10.1016/j.celrep.2019.01.088

102. Ren Y, Ao Y, O'Shea TM, Burda JE, Bernstein AM, Brumm AJ, Muthusamy N, Ghashghaei HT, Carmichael ST, Cheng L and Sofroniew MV (2017) Ependymal cell contribution to scar formation after spinal cord injury is minimal, local and dependent on direct ependymal injury. *Sci Rep* 7:41122. doi: 10.1038/srep41122

103. Rodriguez EM, Guerra MM, Vio K, Gonzalez C, Ortloff A, Batiz LF, Rodriguez S, Jara MC, Munoz RI, Ortega E, Jaque J, Guerra F, Sival DA, den Dunnen WF, Jimenez AJ, Dominguez-Pinos MD, Perez-Figares JM, McAllister JP and Johanson C (2012) A cell junction pathology of neural stem cells leads to abnormal neurogenesis and hydrocephalus. *Biol Res* 45:231-42. doi: 10.4067/S0716-97602012000300005

104. Rodríguez P and Bouchaud C (1996) The supra-ependymal innervation is not responsible for the repression of tight junctions in the rat cerebral ependyma. *Neurobiology (Bp)* 4:185-201.

105. Sabnis DH, Storer LCD, Liu JF, Jackson HK, Kilday JP, Grundy RG, Kerr ID and Coyle B (2019) A role for ABCB1 in prognosis, invasion and drug resistance in ependymoma. *Sci Rep* 9:10290. doi: 10.1038/s41598-019-46700-z

106. Salazar K, Cerda G, Martinez F, Sarmiento JM, Gonzalez C, Rodriguez F, Garcia-Robles M, Tapia JC, Cifuentes M and Nualart F (2014) SVCT2 transporter expression is post-natally induced in cortical neurons and its function is regulated by its short isoform. *J Neurochem* 130:693-706. doi: 10.1111/jnc.12793
107. Salazar K, Martínez M, Ulloa V, Bertinat R, Martínez F, Jara N, Espinoza F, Bongarzone ER and Nualart F (2016) SVCT2 overexpression in neuroblastoma cells induces cellular branching that is associated with ERK signaling. *Molecular neurobiology* 53:6668-6679.
108. Salazar K, Martínez F, Pérez-Martín M, Cifuentes M, Trigueros L, Ferrada L, Espinoza F, Saldivia N, Bertinat R and Forman K (2018) SVCT2 expression and function in reactive astrocytes is a common event in different brain pathologies. *Molecular neurobiology* 55:5439-5452.
109. Sawamoto K, Wichterle H, Gonzalez-Perez O, Cholfin JA, Yamada M, Spassky N, Murcia NS, Garcia-Verdugo JM, Marin O, Rubenstein JL, Tessier-Lavigne M, Okano H and Alvarez-Buylla A (2006) New neurons follow the flow of cerebrospinal fluid in the adult brain. *Science* 311:629-32. doi: 10.1126/science.1119133
110. Serres M, Grangeasse C, Haftek M, Durocher Y, Duclos B and Schmitt D (1997) Hyperphosphorylation of beta-catenin on serine-threonine residues and loss of cell-cell contacts induced by calyculin A and okadaic acid in human epidermal cells. *Exp Cell Res* 231:163-72. doi: 10.1006/excr.1996.3443
111. Seth A, Sheth P, Elias BC and Rao R (2007) Protein phosphatases 2A and 1 interact with occludin and negatively regulate the assembly of tight junctions in the CACO-2 cell monolayer. *J Biol Chem* 282:11487-98. doi: 10.1074/jbc.M610597200
112. Sigg MA, Menchen T, Lee C, Johnson J, Jungnickel MK, Choksi SP, Garcia G, 3rd, Busengdal H, Dougherty GW, Pennekamp P, Werner C, Rentzsch F, Florman HM, Krogan N, Wallingford JB, Omran H and Reiter JF (2017) Evolutionary Proteomics Uncovers Ancient Associations of Cilia with Signaling Pathways. *Dev Cell* 43:744-762 e11. doi: 10.1016/j.devcel.2017.11.014
113. Silva-Alvarez C, Carrasco M, Balmaceda-Aguilera C, Pastor P, Garcia Mde L, Reinicke K, Aguayo L, Molina B, Cifuentes M, Medina R and Nualart F (2005) Ependymal cell differentiation and GLUT1 expression is a synchronous process in the ventricular wall. *Neurochem Res* 30:1227-36. doi: 10.1007/s11064-005-8794-z

114. Sim HJ, Yun S, Kim HE, Kwon KY, Kim GH, Yun S, Kim BG, Myung K, Park TJ and Kwon T (2020) Simple Method To Characterize the Ciliary Proteome of Multiciliated Cells. *J Proteome Res* 19:391-400. doi: 10.1021/acs.jproteome.9b00589
115. Siyahhan B, Knobloch V, de Zelicourt D, Asgari M, Schmid Daners M, Poulikakos D and Kurtcuoglu V (2014) Flow induced by ependymal cilia dominates near-wall cerebrospinal fluid dynamics in the lateral ventricles. *J R Soc Interface* 11:20131189. doi: 10.1098/rsif.2013.1189
116. Spassky N, Merkle FT, Flames N, Tramontin AD, Garcia-Verdugo JM and Alvarez-Buylla A (2005) Adult ependymal cells are postmitotic and are derived from radial glial cells during embryogenesis. *J Neurosci* 25:10-8. doi: 10.1523/jneurosci.1108-04.2005
117. Spassky N and Meunier A (2017) The development and functions of multiciliated epithelia. *Nat Rev Mol Cell Biol*. doi: 10.1038/nrm.2017.21
118. Taylor MD, Poppleton H, Fuller C, Su X, Liu Y, Jensen P, Magdaleno S, Dalton J, Calabrese C, Board J, Macdonald T, Rutka J, Guha A, Gajjar A, Curran T and Gilbertson RJ (2005) Radial glia cells are candidate stem cells of ependymoma. *Cancer Cell* 8:323-35. doi: 10.1016/j.ccr.2005.09.001
119. Taylor TD, Noguchi H, Totoki Y, Toyoda A, Kuroki Y, Dewar K, Lloyd C, Itoh T, Takeda T, Kim DW, She X, Barlow KF, Bloom T, Bruford E, Chang JL, Cuomo CA, Eichler E, FitzGerald MG, Jaffe DB, LaButti K, Nicol R, Park HS, Seaman C, Sougnez C, Yang X, Zimmer AR, Zody MC, Birren BW, Nusbaum C, Fujiyama A, Hattori M, Rogers J, Lander ES and Sakaki Y (2006) Human chromosome 11 DNA sequence and analysis including novel gene identification. *Nature* 440:497-500. doi: 10.1038/nature04632
120. Tissir F, Qu Y, Montcouquiol M, Zhou L, Komatsu K, Shi D, Fujimori T, Labeau J, Tyteca D, Courtoy P, Poumay Y, Uemura T and Goffinet AM (2010) Lack of cadherins Celsr2 and Celsr3 impairs ependymal ciliogenesis, leading to fatal hydrocephalus. *Nat Neurosci* 13:700-7. doi: 10.1038/nn.2555
121. Tramontin AD, Garcia-Verdugo JM, Lim DA and Alvarez-Buylla A (2003) Postnatal development of radial glia and the ventricular zone (VZ): a continuum of the neural stem cell compartment. *Cereb Cortex* 13:580-7. doi: 10.1093/cercor/13.6.580
122. Traweger A, Wiggin G, Taylor L, Tate SA, Metalnikov P and Pawson T (2008) Protein phosphatase 1 regulates the phosphorylation state of the polarity scaffold Par-3. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:10402-7. doi: 10.1073/pnas.0804102105
123. Uhlen M, Fagerberg L, Hallstrom BM, Lindskog C, Oksvold P, Mardinoglu A, Sivertsson A, Kampf C, Sjostedt E, Asplund A, Olsson I, Edlund K, Lundberg E, Navani S,

- Szigyarto CA, Odeberg J, Djureinovic D, Takanen JO, Hober S, Alm T, Edqvist PH, Berling H, Tegel H, Mulder J, Rockberg J, Nilsson P, Schwenk JM, Hamsten M, von Feilitzen K, Forsberg M, Persson L, Johansson F, Zwahlen M, von Heijne G, Nielsen J and Ponten F (2015) Proteomics. Tissue-based map of the human proteome. *Science* 347:1260419. doi: 10.1126/science.1260419
124. Ulloa V, Saldivia N, Ferrada L, Salazar K, Martinez F, Silva-Alvarez C, Magdalena R, Oviedo MJ, Montecinos H, Torres-Vergara P, Cifuentes M and Nualart F (2019) Basal Sodium-Dependent Vitamin C Transporter 2 polarization in choroid plexus explant cells in normal or scorbutic conditions. *Sci Rep* 9:14422. doi: 10.1038/s41598-019-50772-2
125. van Deurs B and Koehler JK (1979) Tight junctions in the choroid plexus epithelium. A freeze-fracture study including complementary replicas. *J Cell Biol* 80:662-73. doi: 10.1083/jcb.80.3.662
126. van Deurs B (1980) Structural aspects of brain barriers, with special reference to the permeability of the cerebral endothelium and choroidal epithelium. *Int Rev Cytol* 65:117-91. doi: 10.1016/s0074-7696(08)61960-9
127. Virshup DM and Shenolikar S (2009) From promiscuity to precision: protein phosphatases get a makeover. *Mol Cell* 33:537-45. doi: 10.1016/j.molcel.2009.02.015
128. Wallmeier J, Al-Mutairi DA, Chen CT, Loges NT, Pennekamp P, Menchen T, Ma L, Shamseldin HE, Olbrich H, Dougherty GW, Werner C, Alsabah BH, Kohler G, Jaspers M, Boon M, Griese M, Schmitt-Grohe S, Zimmermann T, Koerner-Rettberg C, Horak E, Kintner C, Alkuraya FS and Omran H (2014) Mutations in CCNO result in congenital mucociliary clearance disorder with reduced generation of multiple motile cilia. *Nat Genet* 46:646-51. doi: 10.1038/ng.2961
129. Wirschell M, Yamamoto R, Alford L, Gokhale A, Gaillard A and Sale WS (2011) Regulation of ciliary motility: conserved protein kinases and phosphatases are targeted and anchored in the ciliary axoneme. *Arch Biochem Biophys* 510:93-100. doi: 10.1016/j.abb.2011.04.003
130. Xu H, Zhang SL, Tan GW, Zhu HW, Huang CQ, Zhang FF and Wang ZX (2012) Reactive gliosis and neuroinflammation in rats with communicating hydrocephalus. *Neuroscience* 218:317-25. doi: 10.1016/j.neuroscience.2012.05.004
131. Zerihun L The Planar Cell Polarity of Ependymal Cells in the SVZ Neurogenic Niche. Duke University.

132. Zhang Y, Guo Z, Zou L, Yang Y, Zhang L, Ji N, Shao C, Sun W and Wang Y (2015) A comprehensive map and functional annotation of the normal human cerebrospinal fluid proteome. *J Proteomics* 119:90-9. doi: 10.1016/j.jprot.2015.01.017

