



Universidad de Concepción
Dirección de Postgrado
Facultad de Ciencias Biológicas – Programa de Doctorado en Ciencias Biológicas
Área Biología Celular y Molecular

Función matricelular de OSC-espondina en el líquido cefalorraquídeo embrionario: Identificación de nuevos interactores proteicos

Tesis presentada a la facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de Concepción
para optar al grado académico de Doctor en Ciencias Biológicas Área Biología Celular y
Molecular

FELIPE MAURELIA GAETE

Agosto 2024

CONCEPCIÓN - CHILE

Profesora guía: Teresa Caprile Elola-Olaso
Depto. 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. Teresa Caprile

Profesora guía tesis
Universidad de Concepción

Dra. Amparo Uribe

Profesora evaluadora interna
Universidad de Concepción

Dra. María de los Ángeles García

Profesora evaluadora interna
Universidad de Concepción

Lorena Varela-Nallar

Profesora evaluadora externa
Universidad Andrés Bello

Ariel Castro

Director Programa Doctorado
Ciencias Biológicas, Área
Biología Celular y Molecular

Tesis de doctorado financiada por:

Proyecto FONDECYT Regular 1191860 (2019-2023)

Beca de Doctorado Nacional CONICYT 21191658 (2019-2023)

Beca Gastos Operacionales CONICYT 21191658 (2022-2024)

Apoyo asistencia eventos nacionales UDEC (2022)

Apoyo asistencia a eventos internacionales UDEC (2023)

Apoyo de Facultad para mantención noveno semestre EDPG-LRP-173 (2024)

AGRADECIMIENTOS

Sin duda, esta es la parte más amena y gratificante de escribir en esta tesis doctoral. Son innumerables las personas que me han acompañado, apoyado y aguantado a lo largo de estos cinco años, y a todas ellas les quiero expresar mi gratitud infinita.

En primer lugar, agradezco al programa de doctorado y a todo su equipo, quienes me han ayudado con las gestiones y trámites, incluso cuando he estado atrasado con los papeles. Un agradecimiento especial al profesor Ariel y a Margareth, por estar siempre atentos a mi proceso y brindarme su apoyo constante.

A mis compañeros de generación, Rocío, Angelymar y Diego, con quienes compartimos desde el primer día, viendo cómo crecíamos juntos, enfrentando retos y celebrando logros a lo largo de los años. También agradezco a mis compañeros del GDEP, especialmente al equipo de LADE, mi querido laboratorio amiwo.

A mis compañeros de laboratorio, los "pollos pequeños", Benjita, Roro y Franky, que llegaron a revitalizar el ambiente del laboratorio, a quienes los que llevamos más tiempo les hemos transmitido lo aprendido para que continúen avanzando en su propio desarrollo. A los "pollos grandes", ya un poco pasados del estadio HH30, conocidos como los OG, Jaime y Mayita, quienes presenciaron mis múltiples colapsos y, aun así, se mantuvieron firmes a mi lado, levantándome el ánimo y dándome la confianza para seguir adelante. Sin su apoyo, este camino habría sido mucho más difícil. A José, por sus chistes (aunque fomes) y sus conversaciones diarias que hicieron del laboratorio un verdadero hogar. Y a la profesora, por haber tenido la paciencia de aguantar mis cambios de ánimo a lo largo de estos años, por

guiarme en mi formación no solo como doctor, sino también como persona. Hoy me siento más pleno y en paz conmigo mismo, gracias a los empujones que me diste y que me permitieron avanzar.

Finalmente, quiero agradecer a mi familia, por estar siempre aquí, antes, ahora y siempre. A mis sobrinos, por su cariño incondicional, por hacerme sentir el mejor tío del mundo, aunque no sea el mejor con los cumpleaños ni con sus actividades. A mis hermanas y cuñados, por estar presentes cuando más los necesitaba. Y, por supuesto, a mis papás, que aunque no siempre comprendían lo que hacía, siempre los sentí a mi lado, acompañándome con sus risas y sus oraciones.

Por último, agradezco también a mis amigos, Monse, Mapi, Javi, Cris y Vale, quienes de una u otra forma fueron fundamentales para que pudiera culminar este proceso. Y, por supuesto, a mis roomies de siempre, Japhito y Carla Shuag, que se han mantenido a mi lado a pesar de conocerme, a los que quiero un montón y buscaré siempre la forma de manter cerca.

TABLA DE CONTENIDOS

RESUMEN	xiv
ABSTRACT	xvii
I. INTRODUCCION	1
1. Desarrollo del sistema nervioso central.	1
2. Líquido cefalorraquídeo embrionario (LCRe)	5
2.1. Origen del LCRe	6
2.2. Composición del LCRe	7
2.3. Rol morfogénico del LCRe sobre los progenitores neurales	10
2.3.1. Efecto de la presión hidrostática ejercida por el LCRe sobre el neuroepitelio	10
2.3.2. Función trófica del LCRe	11
3. Proteínas matricelulares	14
4. OSC-espondina	18
4.1. Expresión de OSCsp en el órgano subcomisural durante el desarrollo embrionario	19
4.2. Función de OSCsp durante el desarrollo embrionario	19
4.4.4. Función morfogénica de OSCsp	20
4.4.5. Funciones de OSCsp asociadas al flujo del LCRe e hidrocefalia	21
4.3. Glicosilaciones en OSCsp	21
4.4. Estructura de la OSCsp	23
4.4.1. Variantes proteicas de OSCsp	23
4.4.2. Dominios TSR	24
4.4.3. Dominios vWF-C	25
4.4.4. Dominio CTCK	26
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	28
III. HIPÓTESIS	28
IV. OBJETIVOS	29
V. MATERIALES	30
1. Animales de experimentación	30
2. Cepas bacterianas	30
3. Plásmidos	31
4. Kits comerciales	32
5. Líneas celulares y reactivos de cultivo celular.	33
5.1. Líneas celulares.	33
5.2. Reactivos y medios de cultivo celular.	34
6. Anticuerpos	35
7. Reactivos y soluciones generales	36

8	Materiales en general y equipos disponibles	37
VI.	MÉTODO	38
1	Western Blot	38
2	Co-inmunoprecipación de OSCsp y sus componentes asociados desde el LCRE.	38
3	Espectrometría de masa para la identificación de las proteínas que interactúan con OSCsp nativa en el LCRE.	39
4	Transformación de bacterias <i>E. coli</i> DH5α	42
5	Subclonamiento de la secuencia codificante para la región C-terminal de OSCsp en los vectores pSecTag2A y pIRES-RFP.	43
6	Cultivo celular	45
7	Transfección de células HEK-293T para obtención de proteína recombinante desde sobrenadante de cultivo.	46
8	Inmunofluorescencia de células HEK 293T transfectadas con pIRES-Cterm	47
9	“Pull-down” de las proteínas que interactúan con la región C-terminal de OSCsp en el LCRE.	48
10	Espectrometría de masa para la identificación de las proteínas que interactúan con la región C-terminal de OSCsp nativa en el LCRE.	48
11	Inmunofluorescencia de células N2A con marcadores de diferenciación y proliferación.	49
12	Electroporación de médula espinal de embriones <i>gallus gallus</i>	50
13	Inmunofluorescencia en tejido	51
13.1	En crióstato	51
13.2	En vibrátomo	52
14	Adquisición de imágenes	52
15	Análisis de imágenes	53
16	Análisis estadísticos	56
VII.	RESULTADOS	57
1	Objetivo I: Determinar los factores del LCRE que interactúan con OSCsp nativa y su región C-terminal.	57
2	Objetivo 2: Estudiar el efecto morfogénico de la interacción entre la región C-terminal de OSCsp con factores presentes en el LCRE en cultivo celular de línea celular de neuroblastoma (N2A).	99
3	Objetivo 3: Describir la importancia de la región C-terminal en embriones deficientes de OSCsp y transgénicos transitorios para estos dominios.	118

VIII. DISCUSIÓN	139
IX. CONCLUSIONES	156
X. BIBLIOGRAFÍA	157
XI. ANEXOS	179

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Formación del LCR_e tras el proceso de neurulación en embrión de <i>gallus gallus</i>.....	2
Figura 2. Esquema de las vesículas embrionarias primarias y secundarias.....	3
Figura 3. Sistema nervioso central de <i>Gallus gallus</i>.....	4
Figura 4. Identificación del proteoma del LCR_e en embrión de <i>gallus gallus</i> en estadio HH24.....	8
Figura 5. Red fibrilar en el LCR_e de embrión de <i>gallus gallus</i> en estadio HH23.....	9
Figura 6. Interacción de los dominios presentes en las proteínas matricelulares CCNs con factores de la matriz extracelular y componentes de la cara apical de la membrana celular	16
Figura 7. Dominios modulares presentes en proteínas matricelulares	17
Figura 8. Esquema representativo del método empleado para la co-inmunoprecipitación de OSCsp nativa y las proteínas con las que interacciona en el líquido cefalorraquídeo embrionario.....	59
Figura 9. Estandarización de la co-inmunoprecipitación de OSCsp nativa y sus complejos desde el líquido cefalorraquídeo embrionario.	60
Figura 10. Enriquecimiento de términos de ontología génica asociados a procesos biológicos de las proteínas que interaccionan con OSCsp nativa en el LCR_e.....	65
Figura 11. Enriquecimiento de términos de ontología génica asociados a componente celular de las proteínas que interaccionan con OSCsp nativa en el LCR_e	68
Figura 12. Enriquecimiento de términos de ontología génica asociados a función molecular de las proteínas que interaccionan con OSCsp nativa en el LCR_e.	71
Figura 13. Construcción del vector de expresión en células de mamífero pSecTag2A C-term OSCsp, para liberación de la región C-terminal de OSCsp hacia el medio extracelular.....	75
Figura 14. Cinética de liberación de la región C-terminal de OSCsp recombinante hacia el medio extracelular de células HEK293T transfectadas con el vector pSecTag2A C-term OSCsp.....	76

Figura 15. Construcción de un vector de expresión en células de mamífero bistrónico para la liberación de la región C-terminal de OSCsp y la proteína fluorescente roja (RFP).	77
Figura 16. Expresión de la región C-terminal de OSCsp en células HEK293T transfectadas con el vector pIRES C-term OSCsp.	78
Figura 17. Modificaciones post-traduccionales de la región C-terminal de OSCsp.	80
Figura 18. Pull-down de las proteínas interactoras de la región C-terminal de OSCsp. ..	82
Figura 19. Análisis de los espectrogramas de masa para la identificación de proteínas que interactúan con la región C-terminal de OSCsp recombinante.	83
Figura 20. Análisis de los valores cuantificación LFQ para las proteínas del LCRé que interactúan con la región C-terminal de OSCsp recombinante.	85
Figura 21. Análisis de volcano plot de abundancia relativa de las proteínas identificadas como interactores de la región C-terminal de OSCsp.	87
Figura 22. Enriquecimiento de términos de ontología génica asociados a componente celular de las proteínas que interactúan con la región C-terminal de OSCsp en el LCRé.	92
Figura 23. Enriquecimiento de términos de ontología génica asociados a proceso biológico de las proteínas que interactúan con la región C-terminal de OSCsp en el LCRé.	95
Figura 24. Enriquecimiento de términos de ontología génica asociados a función molecular de las proteínas que interactúan con la región C-terminal de OSCsp en el LCRé.	98
Figura 25. Análisis cuantitativo de los efectos proliferativos del LCRé y sobrenadante post-transfección sobre células N2A.	102
Figura 26. Efecto de la región C-terminal de OSCsp sobre la proliferación de células N2A inducida por el LCRé.	105
Figura 27. Línea de trabajo de análisis automatizado en Cellprofiler.	107
Figura 28. Efecto en el área y perímetro celular de la región C-terminal de OSCsp, en presencia y ausencia de LCRé.	110
Figura 29. Cambios en parámetros morfométricos de células N2A tratadas con la región C-terminal de OSCsp y LCRé.	114

Figura 30. Cambios en parámetros morfométricos asociados al citoplasma y formación de neuritas de las células N2A tratadas con la región C-terminal de OSCsp, en presencia y ausencia de LCre.....	117
Figura 31. Electroporación de médula espinal de embriones <i>gallus gallus</i> estadio HH12.	120
Figura 32. Inmunofluorescencia de cortes transversales del espécimen 1 de embrión <i>gallus gallus</i> electroporado con el vector pIRES C-term OSCsp contra el epítoto de histidinas (6xHis) y fosfo-histona III (pH3), junto con la marca fluorescente roja (RFP) endógena del vector.	122
Figura 33. Análisis de proliferación del neuroepitelio de la médula espinal tras la electroporación con pIRES C-term OSCsp.	125
Figura 34. Efecto anti-proliferativo de la región C-terminal de OSCsp sobre progenitores neurales de la médula espinal de <i>gallus gallus</i>.	127
Figura 35. Distribución de la marca RFP y del epítoto de histidinas (6xHis) en la región C-terminal de OSCsp.	131
Figura 36. Inmunofluorescencia de cortes transversales de embriones <i>gallus gallus</i> electroporado con el vector pIRES C-term OSCsp, usando un anticuerpo contra antígeno asociado a neurofilamento (3A10) y el epítoto de histidinas (6xHis) en conjunto con la señal fluorescente roja (RFP) endógena del vector.	133
Figura 37. Análisis de diferenciación de progenitores neurales en la región basal de la médula espinal tras la electroporación con pIRES C-term OSCsp.	135
Figura 38. Efecto de la región C-terminal de OSCsp sobre la diferenciación de progenitores neurales de la médula espinal de <i>gallus gallus</i>.....	138
Figura 39 Resumen gráfico de la posible función matricelular de OSCsp nativa y su región C-terminal en el LCre.	155

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Morfógenos identificados en el LCRé.....	12
Tabla 2. Efecto de la inhibición de factores individuales del LCRé en la diferenciación y proliferación del neuroepitelio.....	14
Tabla 3. Anticuerpos y marcadores fluorescentes empleados en este trabajo, diluciones empleadas y procedencia.....	35
Tabla 4. Parejas de partidores empleados para el subclonamiento de fragmentos de ADN codificantes para la región C-terminal de OSCsp.....	45
Tabla 5. Proteínas del LCRé que interaccionan con OSCsp nativa identificadas mediante espectrometría de masa.....	63
Tabla 6. Proteínas interactoras de OSCsp nativa clasificadas según términos de ontología génica asociados a procesos biológicos.....	66
Tabla 7. Proteínas interactoras de OSCsp nativa clasificadas según términos de ontología génica asociados a componente celular.....	69
Tabla 8. Proteínas interactoras de OSCsp nativa en el LCRé clasificados según términos de ontología génica asociados a función molecular.....	72
Tabla 9. Proteínas del LCRé identificadas como interactoras de la región C-terminal de OSCsp recombinante mediante análisis de expresión diferencial entre la última fracción de lavada y fracción eluida a través de pull down.....	89

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1: Etapas del desarrollo embrionario de Gallus gallus de Hamburger y Hamilton (1951).....	179
Anexo 2: Concentración de las proteínas en el LCRe por estadio	180
Anexo 3: Cortes transversales de especímenes electroporados, sometidos a inmunofluorescencia contra pH3.	181

RESUMEN

El sistema nervioso central se desarrolla a partir del tubo neural, una estructura hueca rodeada por neuroepitelio, dentro de la cual se encuentra el líquido cefalorraquídeo embrionario (LCRe). Numerosos estudios han demostrado una estrecha interrelación entre estos dos componentes, en donde las células neuroepiteliales secretan sustancias hacia el LCRe, y este a su vez, estimula la proliferación y diferenciación de estas células. Esto hace del LCRe un fluido biológico altamente dinámico durante el desarrollo embrionario temprano, con una composición que se ajusta a los requerimientos del neuroepitelio. Entre los componentes del LCRe se encuentran morfógenos, cuya función ha sido estudiada principalmente *in vitro*. Algunos de estos componentes incluyen a FGF-2, BMP-7, ácido retinoico, OSC-espondina y LDL, destacando que la inhibición o sobreexpresión de cualquiera de ellos afecta drásticamente (>50%) los procesos de diferenciación y proliferación neuroepitelial. Estos antecedentes sugieren que **los factores descritos no actúan de forma independiente y sumatoria**, sino que están interrelacionados *in vivo*, lo que permite un control más preciso en la diferenciación neuroepitelial. En la búsqueda de mecanismos que integren estos morfógenos, surge la posibilidad de que OSC-espondina actúe como una proteína matricelular, uniendo y modulando el efecto de diversos factores presentes en el LCRe. Las proteínas matricelulares se caracterizan por ser proteínas multidominio que interaccionan con proteínas de la matriz extracelular y de la membrana celular, modulando así la respuesta celular a factores extrínsecos. La OSC-espondina se caracteriza por su gran tamaño y por poseer múltiples dominios, los cuales han sido previamente caracterizados en otras proteínas matricelulares como facilitadores de la interacción con factores de la matriz extracelular, como es el caso de los dominios TSR, vWC y CTCK. Estos dominios se encuentran presentes una nueva variante proteica de OSCsp compuesta por su región C-terminal.

En esta tesis, se identificaron las proteínas que interaccionan con la OSCsp nativa y con su región C-terminal recombinante mediante ensayos de inmunoprecipitación y “pulldown”, respectivamente. Las proteínas identificadas por espectrometría de masa revelaron que tanto la proteína completa como su región C-terminal interaccionan con moléculas morfogénicas, así como con proteínas que forman parte de estructuras complejas en el LCRE. Esto sugiere la existencia de un macro-complejo en el LCRE, donde la OSCsp desempeñaría un papel activo como una proteína adaptadora, que facilita la interacción con otras proteínas.

Una vez caracterizadas las proteínas que interaccionan con la región C-terminal de OSCsp, se procedió a evaluar la funcionalidad de la interacción entre esta región con los componentes del LCRE. Para ello, se utilizó una estrategia *in vitro* en la que se trató a las células neuroprogenitoras N2A con la proteína recombinante, en conjunto con LCRE. La medición de señal asociada a proliferación reveló un efecto anti-proliferativo de la región C-terminal al ser empleada en conjunto con LCRE en el tratamiento de las células N2A. Además, los parámetros morfogénicos permitieron atribuir un efecto anti-diferenciador de la región C-terminal de OSCsp, caracterizado por una disminución en la longitud de las ramificaciones en las células N2A.

Para verificar los efectos observados *in vitro*, se realizó la electroporación de la médula espinal de embriones de *gallus gallus* con un vector que expresa la región C-terminal de OSCsp. La comparación entre regiones con electroporación masiva y aquellas con electroporación discreta reveló una disminución significativa en los niveles de proliferación y diferenciación, evaluados mediante los marcadores pH3 y 3A10, respectivamente. Estos resultados son coherentes con los hallazgos obtenidos en el tratamiento de células N2A con la región C-terminal de OSCsp.

En conjunto, este trabajo proporciona una comprensión detallada de la participación de la región C-terminal de OSCsp en la interacción con los componentes del LCRE, así como una atribución de su función morfogénica.

ABSTRACT

The central nervous system develops from the neural tube, a hollow structure surrounded by neuroepithelium, within which is the embryonic cerebrospinal fluid (CSF). Numerous studies have demonstrated a close interrelationship between these two components, where neuroepithelial cells secrete substances into the CSF, which in turn stimulates the proliferation and differentiation of these cells. This makes the CSF a highly dynamic biological fluid during early embryonic development, with a composition that adjusts to the needs of the neuroepithelium. Among the components of the CSF are morphogens, whose functions have been mainly studied *in vitro*. Some of these components include FGF-2, BMP-7, retinoic acid, SCO-spondin, and LDL. Notably, the inhibition or overexpression of any of these factors dramatically affects (>50%) neuroepithelial differentiation and proliferation. These findings suggest that the described factors do not act independently or additively, but are functionally interrelated *in vivo*, allowing for more precise control of neuroepithelial differentiation. In the search for mechanisms that integrate these morphogens, the possibility arises that SCO-spondin acts as a matricellular protein, binding and modulating the effects of various factors present in the CSF. Matricellular proteins are characterized by their multidomain nature, interacting with extracellular matrix and cell membrane proteins, thus modulating cellular responses to extrinsic factors. SCO-spondin is characterized by its large size and multiple domains, which have been previously identified in other matricellular proteins as facilitators of interaction with extracellular matrix factors, including the TSR, vWC, and CTCK domains found in a new protein variant of SCOsp comprising its C-terminal region.

In this thesis, the proteins interacting with native SCOSP and its recombinant C-terminal region were identified through immunoprecipitation and pulldown assays, respectively. Mass spectrometry analysis revealed that both the full protein and its C-terminal region interact with morphogenic molecules, as well as with proteins that are part of complex structures in the CSF. This suggests the existence of a macro-complex in the CSF, where SCOSP plays an active role as an adapter protein, facilitating interactions with other proteins.

After characterizing the proteins interacting with the C-terminal region of SCOSP, the functionality of this interaction with CSF components was evaluated. An *in vitro* strategy was employed, where neuroprogenitor N2A cells were treated with the recombinant protein along with CSF. Measurement of proliferation-associated signals revealed an anti-proliferative effect of the C-terminal region when used in conjunction with CSF in N2A cell treatment. Additionally, morphometric parameters indicated an anti-differentiation effect of the C-terminal region of SCOSP, characterized by a reduction in the length of cell branches in N2A cells.

To verify the *in vitro* observations, electroporation of the spinal cord of *Gallus gallus* embryos was performed with a vector expressing the C-terminal region of SCOSP. Comparison between regions with massive electroporation and those with localized electroporation revealed a significant decrease in proliferation and differentiation levels, assessed by the markers pH3 and 3A10, respectively. These results are consistent with the findings from the N2A cell treatment with the C-terminal region of SCOSP.

Overall, this work provides a detailed understanding of the role of the C-terminal region of SCOSP in interacting with CSF components, as well as its attribution of a morphogenic function.

I. INTRODUCCION

1. Desarrollo del sistema nervioso central.

A lo largo de la historia los embriones de la especie *Gallus gallus* se han empleado para realizar estudios de biología del desarrollo por la alta reproducibilidad en la identificación de los estadios, la facilidad en su manejo y de su extracción (Heanue et al., 2016; Le Douarin, 2004; Mok et al., 2015; Umur et al., 2022) . Su desarrollo abarca 21 días desde su fecundación, cuyas etapas y características han sido minuciosamente descritas y clasificadas en “estadios de Hamburger y Hamilton (HH)” (Hamburger & Hamilton, 1992) (Anexo 1). Al igual que en el resto de los vertebrados, todos los órganos y tejidos celulares de esta especie se originan a partir de una de las tres capas germinativas embrionarias: el ectodermo, mesodermo y endodermo (Figura 1). Específicamente, el sistema nervioso central (SNC) tiene su origen en el ectodermo durante la etapa de neurulación temprana, comprendida entre los estadios HH1 y HH3. En esta etapa, la notocorda, una estructura cilíndrica formada por células mesodermales, define la línea media embrionario y emite señales hacia el ectodermo suprayacente para facilitar el compromiso del linaje hacia la formación del neuroectodermo. Estas señales permiten que un subgrupo de células neuroectodérmicas se diferencien en células progenitoras neurales entre los estadios HH2 y HH7, dando lugar a la formación de la placa neural (Figura 1) (Jacobson & Gordon, 1976; Schoenwolf & Smith, 1990; Smith & Schoenwolf, 1997). A medida que avanza la neurulación, la placa neural en contacto con el líquido amniótico se pliega hasta que ambos extremos convergen, formando el tubo neural entre los estadios HH8 y HH9 (Figura 1). Desde el punto de vista morfológico, este proceso es un paso transcendental en el desarrollo embrionario, ya que implica la transición desde una estructura bidimensional hacia una estructura tubular tridimensional (Purves D., 2018).

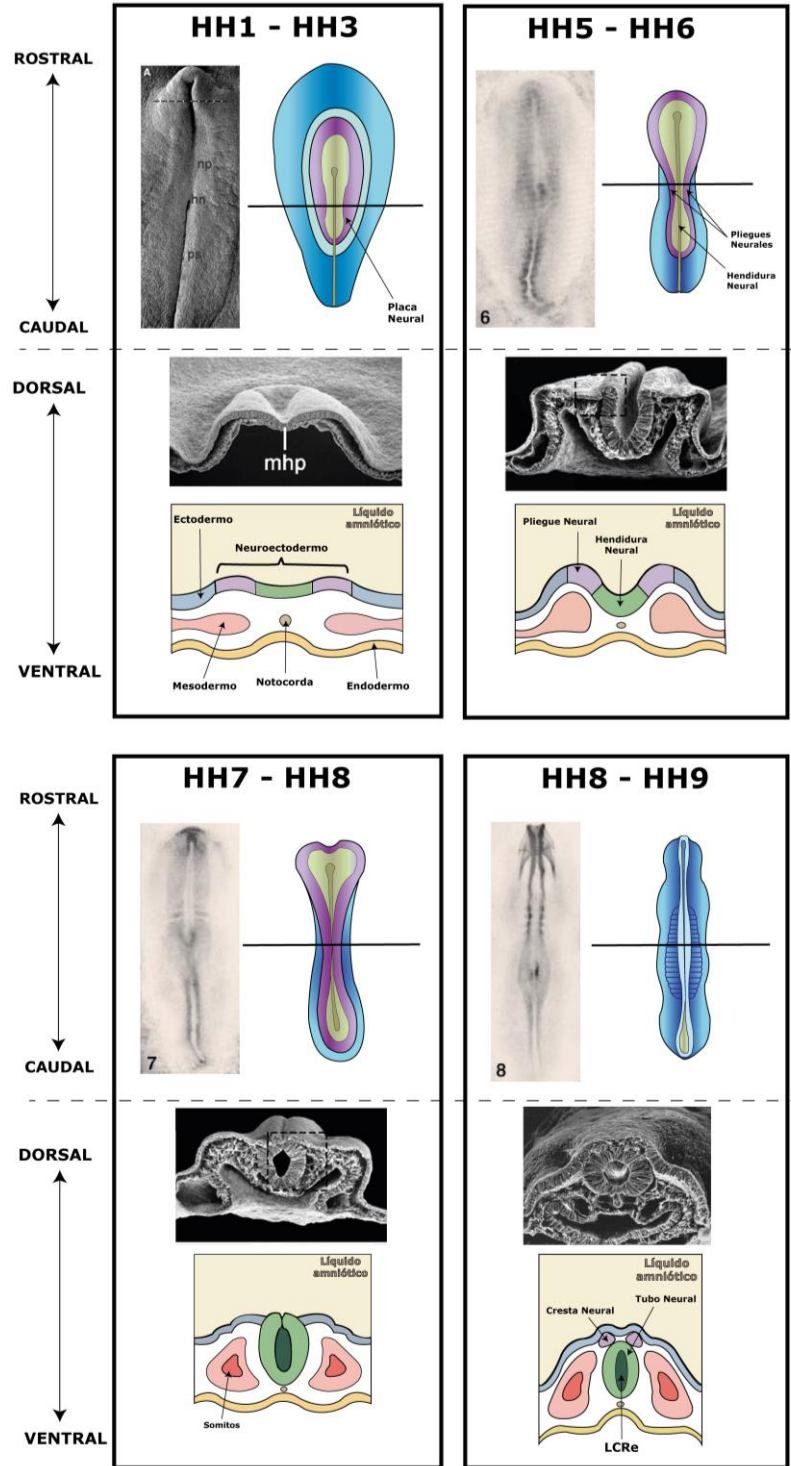


Figura 1. Formación del LCR tras el proceso de neurulación en embrión de *gallus gallus*. Imagen de elaboración propia, empleando figuras de microscopía electrónica de Schoenwolf (2018) (Schoenwolf, 2018) y de estadios clasificados por Hamburger & Hamilton, 1992.

Con la oclusión del neurocele, el tubo neural genera un sistema cerrado, específicamente entre los estadios HH11 y HH14 (Desmond & Levitan, 2002; Schoenwolf & Desmond, 1984). La pared del tubo neural se encuentra compuesta por un epitelio pseudoestratificado, en el cual se encuentran los progenitores neurales (Bjornsson et al., 2015) y desde el cual emergen tres vesículas: el prosencéfalo (que más adelante se divide en telencéfalo y diencefalo), el mesencéfalo y el romboencéfalo (que posteriormente se divide en metencéfalo y mielocéfalo) (Figura 2). Eventualmente, el neuroepitelio se desarrollará en todas las estructuras del cerebro adulto mediante la proliferación y diferenciación de los progenitores neurales que lo conforman. A su vez, el espacio delimitado por el neuroepitelio se encuentra lleno de un fluido denominado líquido cefalorraquídeo embrionario (LCRe) (Cushing, 1914; A. Gato & Desmond, 2009) (Figura 3A).

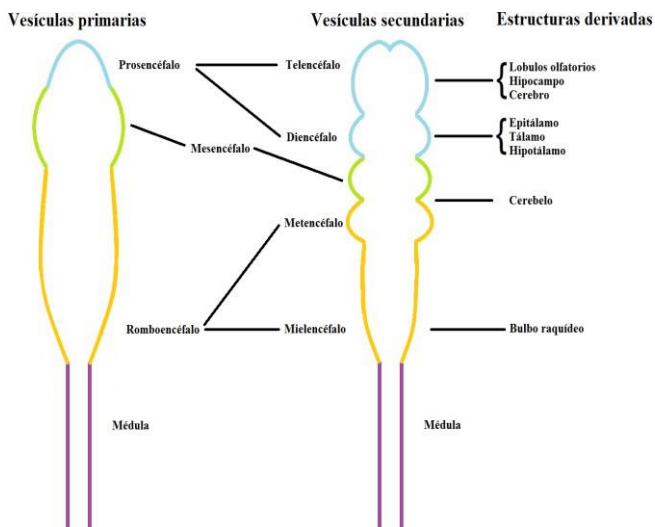


Figura 2. Esquema de las vesículas embrionarias primarias y secundarias.

Inicialmente el SNC está formado por tres vesículas primarias (prosencéfalo-celeste, mesencéfalo-verde y romboencéfalo-amarillo), que luego derivan en cinco vesículas secundarias (telencéfalo, diencefalo, mesencéfalo, metencéfalo y mielocéfalo), de las cuales finalmente se generarán los componentes del SNC adulto. Modificado de Gato y Desmond, 2009.

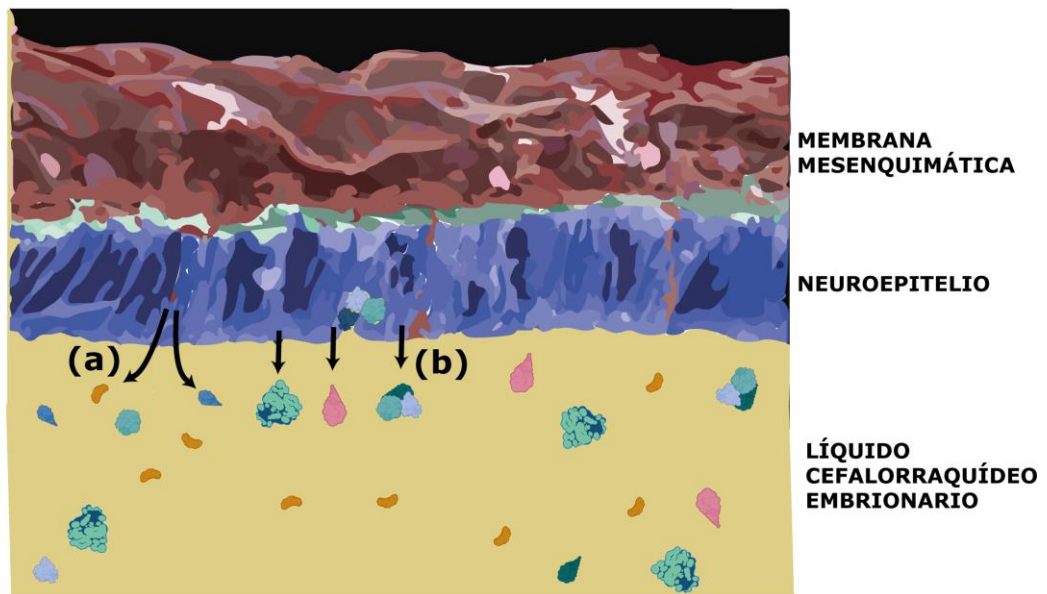
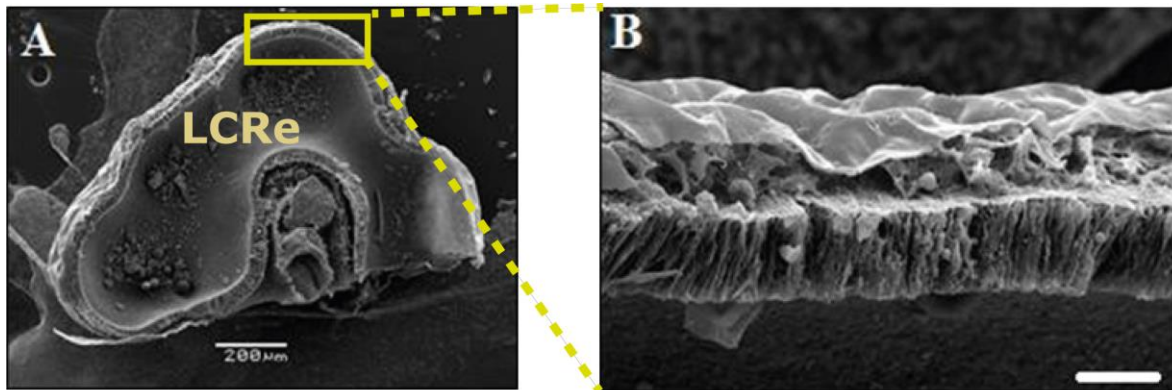


Figura 3. Sistema nervioso central de *Gallus gallus*. **A** y **B**: Cortes sagitales de embriones HH17 (52-64 h) observados mediante microscopio electrónico de barrido. **(A)** Se observan las vesículas secundarias y un encéfalo doblado con respecto al resto del cuerpo del embrión. **(B)** Aumento del techo diencefálico marcado en **(A)**, mostrando el neuroepitelio que recubre a las paredes ventriculares. Las barras de escala representan 200μm en **A** y 25μm en **B**. Adaptado desde Vera et al., 2013.

2. Líquido cefalorraquídeo embrionario (LCRe)

A lo largo de los años, el estudio del líquido cefalorraquídeo se ha vuelto fundamental para comprender los procesos implicados en el desarrollo y funcionamiento del sistema nervioso central, así como a las patologías asociadas a él. En adultos, el LCR actúa como un componente clave de nichos neurogénicos en la zona subventricular, lugar donde las células neuroprogenitoras mantienen el potencial de generar neuronas en la edad adulta, influenciada en parte por señales en el LCR con el que están en contacto (Kokovay et al., 2012; Silva-Vargas et al., 2016).

Durante el desarrollo embrionario, un flujo normal de LCRe es crucial para el transporte de moléculas desde los ventrículos cerebrales hacia la médula espinal (Daems et al., 2020), permitiendo así el adecuado desarrollo de ambas estructuras (Desmond & Jacobson, 1977; Pexieder & Jelínek, 1970). En condiciones patológicas, se ha observado que anomalías en la composición del LCRe conducen a condiciones patológicas como la hidrocefalia en el embrión, que pueden resultar en la muerte del embrión o generar comorbilidades en adultos, como déficit de memoria y aprendizaje, así como epilepsia (Bräutigam et al., 2019).

El LCRe está constantemente produciéndose, circulando y reabsorbiéndose, lo que hace que su composición cambie dinámicamente durante el desarrollo (Chau et al., 2015). Aunque sus funciones clásicamente descritas se han asociado a procesos homeostáticos relacionados con nutrición, protección y eliminación de desechos (Wichmann et al., 2022), una función más reciente es la de actuar como un medio esencial en el que se encuentran señales extrínsecas que regulan los eventos de proliferación y diferenciación del neuroepitelio con el que está en contacto, contribuyendo al desarrollo del SNC durante la embriogénesis (Alonso et al., 2017; Bueno et al., 2020; Fame & Lehtinen, 2020; Lehtinen & Walsh, 2011; H. Xu et al., 2021).

2.1. Origen del LCR

La formación de los sistemas ventriculares, en los cuales circula el LCR, requiere de una serie de eventos altamente conservados y regulados (Lowery & Sive, 2009; Massarwa & Niswander, 2013; Wilde et al., 2014). Antes del cierre del tubo neural, el neuroectodermo que forma la placa neural está en contacto con el líquido amniótico. Después de la formación del tubo neural, el líquido amniótico atrapado en su interior forma el primer LCR durante el desarrollo (Bjornsson et al., 2015; Chau et al., 2015; Panchision & McKay, 2002). En el desarrollo embrionario temprano, no existen estructuras especializadas encargadas de la producción de LCR, ya que los plexos coroides se desarrollan en etapas más tardías (El-Gammal, 1981). Debido a esto, se han propuesto dos mecanismos para la producción de LCR (A. Gato et al., 2014); el primero implica el transporte y secreción apical de componentes desde los vasos sanguíneos que revisten las cavidades a través del neuroepitelio, como son los proteoglicanos condroitín sulfato responsables del aumento de tamaño de la cavidad mediante presión hidrostática (A. Gato et al., 1993; Parvas et al., 2008; Parvas & Bueno, 2010). El segundo es la secreción directa desde el neuroepitelio de moléculas, incluyendo iones (Lowery & Sive, 2009), proteínas de nutrición (Castells et al., 2012) y factores que actúan como regulares de la proliferación y diferenciación del neuroepitelio, conocidas como morfógenos (Figura 3b) (Lamus et al., 2020; Martin et al., 2009). En etapas posteriores, los plexos coroides son los principales responsables de la producción de LCR hasta la etapa adulta (Bueno et al., 2014; Cushing, 1914; Oshio et al., 2005; Šťastný & Rychter, 1976).

2.2 Composición del LCR_e

Un componente crucial de LCR_e son las proteínas, cuya concentración cambia dinámicamente durante el desarrollo embrionario pudiendo llegar a alcanzar concentraciones hasta 30 veces mayores que en el LCR adulto (Birge et al., 1974; Dziegielewska et al., 1980). En *gallus gallus*, se ha determinado que la concentración promedio en el estadio HH23 (4 dpi.) es de 2,5 µg/µL, alcanzando un pico de 5,2 µg/µL en estadio HH37 (11 dpi.), para luego descender a 1,5 µg/µL en el estadio HH45 (19-20 dpi.) (Anexo 2) (Birge et al., 1974; Fielitz et al., 1984; A. Gato et al., 2004; González Loyola, 2015).

En cuanto a la identidad de las proteínas contenidas en el LCR_e, estudios proteómicos han identificado diversos tipos, como proteínas de unión a hormonas, reguladores de presión osmótica, transportadores lipídicos, enzimas, diversos factores de crecimiento y proteasas (Cavanagh et al., 1983; Chau et al., 2015; Dziegielewska et al., 1981; Parada et al., 2005, 2006; Zappaterra et al., 2007). Para *gallus gallus*, en particular, se analizó el proteoma del LCR_e en estadio HH24 (4,5 dpi.), ya que es una de las etapas con mayor proliferación de progenitores neuroepiteliales y el inicio de la diferenciación neural (Hollyday, 2001). Las proteínas fueron identificadas mediante electroforesis bidimensional, digestión en gel y espectrometría de ionización por electrospray (Figura 4) (Parada et al., 2006). A partir de este estudio, se clasificaron estas proteínas en 7 grupos según sus características funcionales; (1) de matriz extracelular, (2) asociadas a la regulación de la presión osmótica y transporte de iones, (3) de transporte lipídico o asociadas al metabolismo, (4) antioxidantes y antimicrobianas, (5) transporte de retinol y vitamina D, (6) relacionadas a sobrevivencia, proliferación y diferenciación celular, también conocidas como morfógenos.

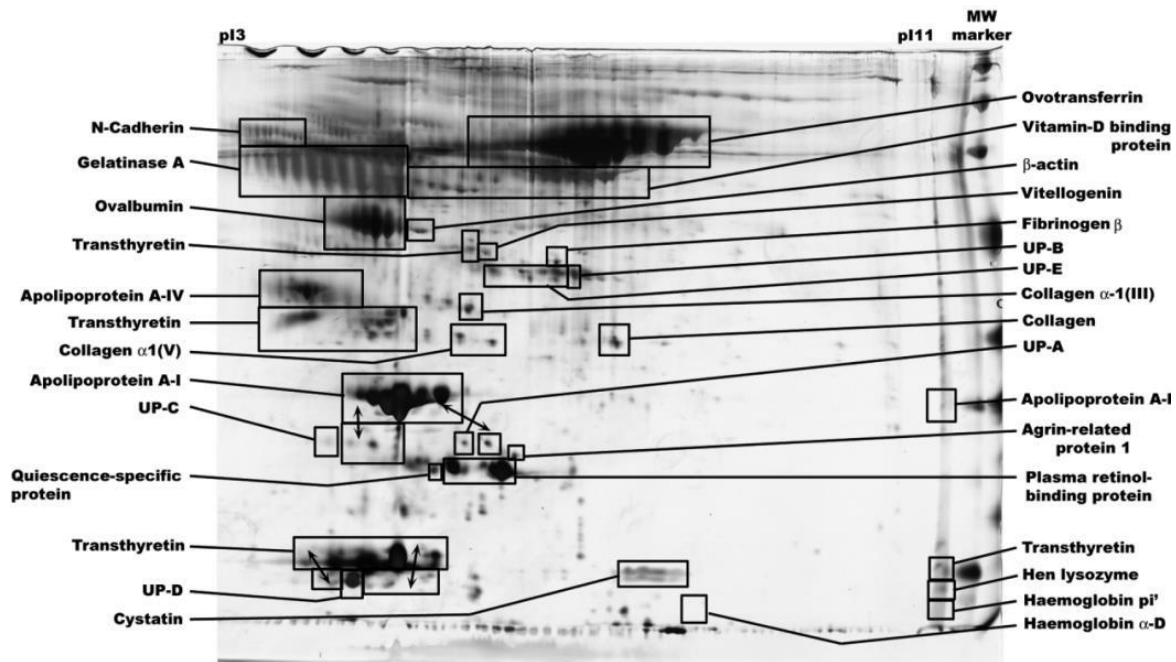


Figura 4. Identificación del proteoma del LCRe en embrión de *Gallus gallus* en estadio HH24. Las proteínas del LCRe fueron identificadas empleando electroforesis bidimensional acoplada a espectrometría de masa ionizante por electrospray de las distintas bandas observadas en el gel mediante tinción de plata (Parada et al., 2006).

A pesar de que el líquido cefalorraquídeo embrionario (LCRe) suele ser considerado un medio en el que las proteínas se encuentran en estado libre, un estudio en embriones de *Gallus gallus* en el estadio HH23 reveló la presencia de un entramado fibrilar abundante en el interior de las vesículas mesencefálicas, observado mediante microscopía electrónica de barrido (Figura 5). Este entramado mostró inmunorreactividad frente a proteoglicanos heparán sulfato y se encontró revestido por vesículas liberadas por las células neuroepiteliales (A. Gato et al., 1993). A pesar de la relevancia potencial de un componente estructural en el LCRe, no se han realizado estudios adicionales que determinen el mecanismo de formación de la red fibrilar ni la función de las vesículas observadas.

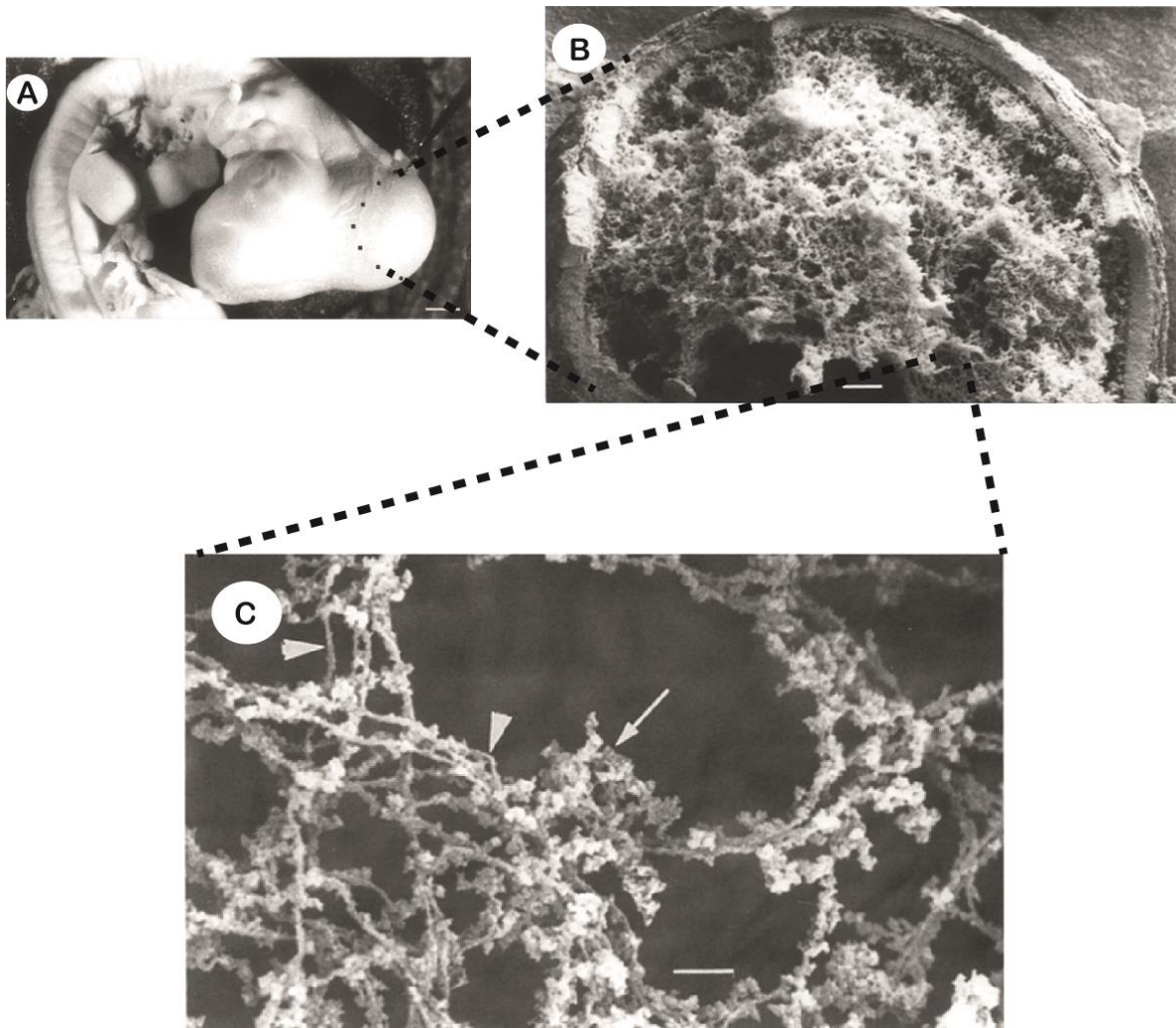


Figura 5. Red fibrilar en el LCR de embrión de *gallus gallus* en estadio HH23. Microscopía de barrida de embriones con corte en el mesencéfalo (A) para exponer un entramado en su interior (B) compuesto por una red fibrilar recubierta con vesículas (C). Extraído y adaptado de (A. Gato et al., 1993).

2.3 Rol morfogénico del LCRe sobre los progenitores neurales

Una de las características principales del LCRe es su interacción con la superficie apical del neuroepitelio. A medida que el desarrollo del encéfalo progresa, las células neuroepiteliales se dividen rápidamente para expandir la población de progenitores neurales (Bjornsson et al., 2015). El comportamiento celular de los progenitores neuroepiteliales durante el desarrollo temprano depende de dos propiedades fisicoquímicas del LCRe, presión y composición o función trófica: (1) el aumento de volumen de LCRe genera un aumento de presión dentro de la cavidad cerebral en desarrollo, lo que facilita el crecimiento del cerebro y una morfogénesis normal del neuroepitelio (Desmond, 1985; Desmond & Jacobson, 1977). Este mecanismo también está asociado con la formación de las vesículas embrionarias primarias, basado en la diferencia de crecimiento en la porción cefálica del tubo neural (A. Gato & Desmond, 2009). (2) El constante flujo de LCRe (Thouvenin et al., 2020), junto con la presencia de factores de crecimiento y morfógenos en el LCRe, que regulan el comportamiento celular del neuroepitelio (Bueno et al., 2020).

2.3.1 Efecto de la presión hidrostática ejercida por el LCRe sobre el neuroepitelio

La presión hidrostática ejercida por el LCRe sobre el neuroepitelio se debe en parte a la presencia de proteoglicanos y sodio (Alonso et al., 1998; A. Gato et al., 1993). El sodio se mantiene en el LCRe en altas concentraciones gracias a las bombas ATPasas Na^+/K^+ ubicadas en la cara apical de las células neuroepiteliales (Alonso et al., 1998). Debido a su carga positiva, el sodio interactúa con las cargas negativas de glucosaminoglicanos (GAGs) presentes en los proteoglicanos del LCRe, como son los condroitin sulfatos y el ácido hialurónico. Dado que los GAGs son de naturaleza polar, el agua ingresa a los ventrículos, favoreciendo la acumulación

de LCR_e y la generación de una presión hidrostática positiva (Alonso et al., 1998; Desmond et al., 2005; A. Gato et al., 1993; A. Gato & Desmond, 2009). La tensión sobre el neuroepitelio causada por la presión hidrostática del LCR_e promueve la proliferación de las células neuroepiteliales, gatillada por la sobreexpresión y activación de quinasas de adhesión focal (FAKs) en la cara apical de dichas células (Desmond et al., 2005, 2014).

2.3.2 Función trófica del LCR_e

Además de los efectos asociados a la presión hidrostática ejercida por el LCR_e en la proliferación del neuroepitelio, se han observado efectos del LCR_e que son independiente de esta presión. Para confirmar que el efecto del LCR_e es parcialmente independiente de la presión ejercida sobre el neuroepitelio, se cultivaron explantes de mesencéfalo en presencia de LCR_e, lo que resultó en un aumento en la proliferación, supervivencia celular y diferenciación de las células neuroepiteliales hacia un fenotipo neuronal (Á. Gato et al., 2005). Del mismo modo, al cultivar neuroesferas preparadas a partir de mesencéfalo de ratón en distintos estadios de desarrollo, se observó que el LCR_e es suficiente para el mantenimiento óptimo de la identidad de los progenitores neurales, así como para su proliferación y diferenciación hacia neuronas. Interesantemente, el efecto del LCR_e varía dependiendo del estadio del que se obtiene (Chau et al., 2015; Lehtinen et al., 2011). El efecto morfogénico del LCR_e también influye en la proliferación y diferenciación de progenitores neurales en nichos neurogénicos adultos, como se ha demostrado tanto *in vitro* como *in vivo* (Alonso et al., 2017; Carnicero et al., 2014; Madrigal et al., 2023). A pesar de ser un efecto estudiado, aún no se conocen con exactitud los factores presentes en el LCR_e que serían clave en estos procesos.

Los morfógenos son moléculas de señalización secretadas que actúan a largas distancias y controlan el crecimiento y formación de patrones en las distintas regiones de un tejido (Briscoe & Small, 2015; Rogers & Schier, 2011). Estas moléculas se encuentran presentes en todos los fluidos biológicos, en donde regulan la morfogénesis, es decir, la formación de estructuras celulares durante el desarrollo embrionario (Á. Gato et al., 2005; A. Gato & Desmond, 2009; Lehtinen & Walsh, 2011). La interpretación que genera el morfógeno sobre el tejido depende de varios factores, como son la concentración, duración de la señalización generada sobre la receptora y la velocidad de difusión, entre otras (Alexandre et al., 2014; Dessaud et al., 2007; van Boxtel et al., 2018; Wartlick et al., 2009). Hasta la fecha, múltiples morfógenos han sido identificados en el LCR, algunos de los cuales se encuentra resumidos en la tabla 1.

Morfógenos identificados en el LCR			
Lipoproteínas	(Bachy et al., 2008; Parada, Escolà-Gil, et al., 2008)	NGF	(Mashayekhi et al., 2009)
BMPs	(Chau et al., 2015; Dattatreymurty et al., 2001; Segklia et al., 2012)	RBPs y ácido retinóico	(Alonso et al., 2011; Lehtinen et al., 2011; Parada et al., 2005, 2006; Parada, Gato, et al., 2008)
FGFs	(C. Martín et al., 2006)	Wnts	(Johansson et al., 2013; Lehtinen et al., 2011)
GDFs	(Lehtinen & Walsh, 2011)	Shh	(Chau et al., 2015; X. Huang et al., 2010)
HGF	(Farhad Mashayekhi and Zivar Salehi, 2011)	EGF	(Lamus et al., 2020)
IGFs	(Lehtinen et al., 2011; Salehi et al., 2009)	OSCsp	(Hoyo-Becerra et al., 2006; Vera et al., 2013; Vio et al., 2008).

Tabla 1. Morfógenos identificados en el LCR.

La función de muchos de estos morfógenos sobre los progenitores neurales ha sido ampliamente estudiada a través de la electroporación de médula espinal, debido a su estructura anatómica bien definida y a su fácil manejo experimental (Ulloa & Briscoe, 2007). Esto ha permitido investigar los mecanismos específicos por los cuales los morfógenos promueven la proliferación y diferenciación de progenitores neurales, mediante la formación de gradientes en regiones específicas de la médula espinal, como es el caso de los morfógenos FGFs, BMPs, Shh y Wnts (M. G. Andrews et al., 2017; Danesin et al., 2006; Farreny et al., 2018; Yang et al., 2019).

La actividad neurogénica y proliferativa de los morfógenos en el LCR_e se ha estudiado principalmente en modelos *ex vivo* de explantes mesencefálicos embrionarios, mediante la inhibición de factores individuales del LCR_e (Tabla 2). Estos estudios revelan que, a pesar de que el LCR_e contiene múltiples factores, la inhibición de solo uno de ellos puede afectar drásticamente el desarrollo del neuroepitelio. Esto sugiere firmemente que el efecto neurogénico del LCR_e no se debe simplemente a la suma de los efectos individuales de sus factores, sino que tienen que estar actuando de manera coordinada e interrelacionada. Uno de los mecanismos que genera una acción similar en la matriz extracelular (MEC) es la presencia de proteínas matricelulares que facilitan la interacción entre diferentes moléculas y sirven como un reservorio y reguladores del efecto morfogénico sobre la membrana celular de sus células diana.

Componente del LCRé	Estrategia de inhibición	Control versus inhibición	Referencia
Lipoproteínas	Explantos mesencefálicos de pollo en LCRé depletado de lipoproteínas	80% menos neurodiferenciación 90% menos proliferación	(Parada, Escolà-Gil, et al., 2008)
FGF-2	Adición de anti-FGF a explantes mesencefálicos de pollo cultivados en LCRé	40% menos neurodiferenciación 60% menos proliferación	(C. Martín et al., 2006)
OSC-espondina	Adición de anti-OSC espondina a explantes mesencefálicos cultivados en LCRé	75% menos neurodiferenciación 275% más proliferación	(Vera et al., 2013, 2015)
RBP (<i>Retinol-binding protein</i>)	Adición de anti-RBP a explantes mesencefálicos de pollo cultivados en LCRé	40% menos neurodiferenciación	(Alonso et al., 2011)

Tabla 2. Efecto de la inhibición de factores individuales del LCRé en la diferenciación y proliferación del neuroepitelio.

3. Proteínas matricelulares

Las proteínas matricelulares constituyen un grupo de proteínas extracelulares altamente modulares que exhiben la capacidad de interactuar con una variedad de ligandos, que incluyen factores de crecimiento, citoquinas, proteasas, y receptores celulares (Bornstein, 1995). Estas proteínas desempeñan un papel crucial como integradores o moduladores de señales extracelulares, cuya función varía dependiendo de la combinación de receptores celulares disponibles y ligandos extracelulares (Bornstein & Sage, 2002). Entre las proteínas matricelulares más estudiadas se encuentra trombospondina 1-5, las tenascinas, R-espondina, F-espondina y la familia de proteínas CCN, entre otras (Murphy-Ullrich & Sage, 2014).

El tamaño de las proteínas matricelulares varía considerablemente, siendo las tenascinas las más grandes, con monómeros que alcanzan los 250 KDa y oligómeros que superan los 1000 KDa, mientras que otras pueden ser significativamente más pequeñas, como es el caso de la CCN1, con tan solo 35 KDa. Sin embargo, más allá de sus diferencias de tamaño, estas proteínas comparten una característica distintiva: una estructura modular que incluye dominios compartidos entre diferentes miembros de la familia de proteínas matricelulares. Estos dominios actúan como componentes modulares que permiten que las proteínas matricelulares interactúen con proteínas extracelulares y receptores de membrana celular (Murphy-Ullrich & Sage, 2014) (Figura 6). Entre los dominios más frecuentes en las proteínas matricelulares, como es el caso de la familia CCN, se encuentran los dominios del factor de crecimiento epidermal (EGF-like domains), el dominio del factor de von Willebrand tipo C (vWF-C), repeticiones de tromboespondina tipo I (TSR) y el motivo cisteína knot carboxilo-terminal (CTCK). Estos dominios permiten que las proteínas matricelulares interactúen con múltiples receptores celulares, incluidos los receptores de la familia de integrinas y los receptores de lipoproteínas de baja densidad (LDLr), así como con diversos factores solubles como BMPs, VEGF, FGF-2 y TGF β (Figura 6) (Kubota & Takigawa, 2013; Lau, 2016).

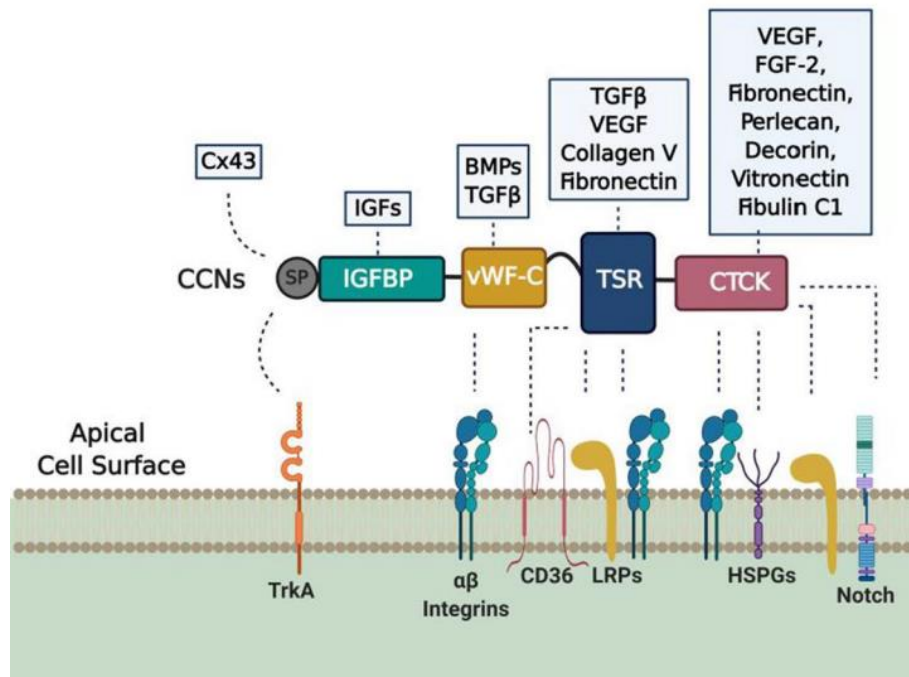


Figura 6. Interacción de los dominios presentes en las proteínas matricelulares CCNs con factores de la matriz extracelular y componentes de la cara apical de la membrana celular. Cada dominio presenta ligandos en la matriz extracelular, impidiendo o promoviendo que estos se unan correctamente a sus receptores de membrana. Extraído de Sepúlveda et al., 2021

A pesar de alta similitud entre los dominios presentes en las proteínas CCNs y OSCsp (Figura 7), hasta la fecha no se ha evaluado la función putativa de OSCsp como proteína matricelular sobre los componentes del LCRE.

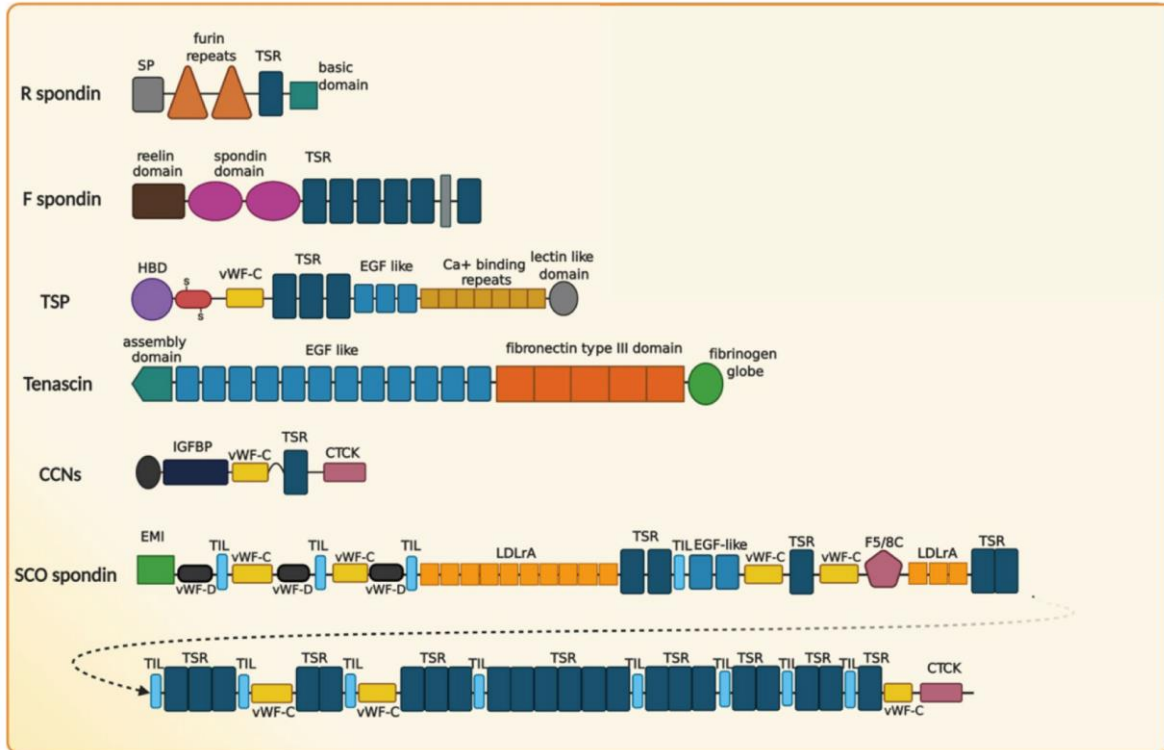


Figura 7. Dominios modulares presentes en proteínas matricelulares. Se observa la presencia de los miembros de distintas proteínas matricelulares, como R-espondina, F-espondina, Tromboespondina (TSP), Tenascinas y miembros de la familia CCN. Además, se observan los dominios de unión a ligando en el receptor de lipoproteínas de baja densidad (*low density lipoprotein receptor*, LDLr) y los dominios polimerizantes en el factor de von Willebrand (von Willebrand factor, vWF). Extraído de Sepúlveda, Maurelia et al., 2021

4. OSC-espondina

La OSCsp es una glicoproteína de 560 KDa, que recibe su nombre debido a su lugar de secreción en el órgano subcomisural (OSC) y a su similitud con otros miembros de la familia de las espondinas, como TSP, F-espondina y R-espondina (Gobron et al., 1996). La OSCsp es secretada hacia el LCR_e, en donde permanece en estado soluble durante las primeras etapas del desarrollo embrionario (Ortega et al., 2016; Vera et al., 2013; Vio et al., 2008). Avanzado el desarrollo (HH 37 en *gallus gallus*), la OSCsp comienza a agruparse para formar una estructura filamentosa conocida como la fibra de Reissner (FR) (Hoyo-Becerra et al., 2006; Reissner E, 1860; Schoebitz et al., 1986). Esta fibra se extiende desde el diencéfalo, atravesando el cuarto ventrículo, y recorre el canal central de toda la médula espinal (Reissner E, 1860; E. M. Rodríguez et al., 1998). Esta estructura se encuentra en constante movimiento, a medida que nuevas moléculas de OSCsp se agregan en su extremo cefálico y se disgregan en el extremo caudal de la médula espinal (E. M. Rodríguez et al., 1998; Troutwine et al., 2020).

Desde la primera descripción de la FR en 1860 (Reissner E, 1860), se ha sugerido su relación con diferentes procesos biológicos, como neurogénesis, balance hidrodinámico, flujo de LCR_e, mecanorecepción, transporte, detoxificación y morfogénesis (Guerra et al., 2015; A. Meiniel, 2001; S. Rodríguez & Caprile, 2001). A pesar de la gran cantidad de funciones sugeridas para la FR, y por tanto para OSCsp, gracias al desarrollo de nuevas tecnologías solo recientemente se ha logrado dilucidar sobre las funciones en las que participa OSCsp, especialmente en etapas tempranas de desarrollo, en estado soluble previo a su agregación (Delétage et al., 2021; Rose et al., 2020; Vera et al., 2013, 2015).

4.1 Expresión de OSCsp en el órgano subcomisural durante el desarrollo embrionario

La expresión de OSCsp se encuentra restringida a una porción específica de la placa del techo diencefálico, la cual se diferencia posteriormente para formar el OSC. Este órgano se localiza en la región más caudal del diencefalo (prosómero 1), justo en el límite con el mesencéfalo y debajo de la comisura posterior, actuando como un órgano circunventricular que secreta componentes al LCRé (Dendy, 1902; Dendy & Nicholls, 1910; Mastick & Easter, 1996; Oksche, 1961; E. M. Rodríguez et al., 1998; Rubenstein et al., 1994). El OSC está altamente conservado entre los vertebrados y mantiene su actividad a lo largo de la vida (Oksche, 1961; E. M. Rodríguez et al., 2001; Vio et al., 2008). En el caso de la especie *gallus gallus*, el desarrollo del OSC comienza desde el estadio HH17, siendo una de las primeras estructuras secretoras del cerebro en diferenciarse y permaneciendo activa en la etapa adulta (Didier-Bazes et al., 1992; Hoyo-Becerra et al., 2010; R. Meiniel et al., 1993; Schoebitz et al., 1986). Desde este órgano, la OSCsp es secretada basalmente hacia la matriz extracelular, donde entra en contacto con los axones de la comisura posterior, y de forma apical hacia el LCRé por las células endodiales de OSC, donde han sido detectadas varias isoformas desde el estadio HH23 en *gallus gallus* (Gobron et al., 1996; Vera et al., 2013).

4.2 Función de OSCsp durante el desarrollo embrionario

Hasta la fecha, se han atribuido múltiples funciones a OSCsp y la fibra de Reissner, destacando entre ellas aquellas asociadas a procesos morfogénicos, al mantenimiento del flujo del LCRé y la prevención de la hidrocefalia (Bueno et al., 2020; Guerra et al., 2015; E. M. Rodríguez et al., 1992; S. Rodríguez & Caprile, 2001). Un estudio reciente reveló que la delección de las células

que componen el OSC mediante un sistema CRE durante etapas tempranas, pero no tardías del desarrollo, genera una drástica disminución en la sobrevivencia de estos animales, acompañada de un alto grado de hidrocefalia en los sobrevivientes. Esto subraya la importancia de los componentes liberados por el OSC durante el desarrollo embrionario temprano, entre los cuales se encuentra OSCsp (T. Zhang et al., 2024).

4.4.4 Función morfogénica de OSCsp

La inhibición de OSCsp, empleando diversos métodos, ha demostrado la importancia de esta proteína en diversas etapas del desarrollo y en múltiples modelos animales. En embriones de pollo, se ha observado que la electroporación de ARN de interferencia para OSCsp conduce a un aumento significativo en la proliferación del neuroepitelio, acompañado de una disminución en su neurodiferenciación. Estos eventos conducen a la formación de malformaciones severas en el cerebro y muerte de los embriones tras algunos días post-electroporación (Vera et al., 2013). Un efecto similar ocurre al tratar cultivos neuronales in vitro con la fibra de Reissner solubilizada o empleando péptidos derivados de OSCsp, observado que estos promueven la proliferación y diferenciación del neuroepitelio (El Bitar et al., 1999; A. Meiniel, 2001; Monnerie et al., 1997, 1998). De la misma forma, explantes mesencefálicos cultivados en LCRE muestran una disminución drástica en su neurodiferenciación tras la adición de anticuerpos contra OSCsp al medio de cultivo (Vera et al., 2013) (Tabla 2). La neurodiferenciación promovida por OSCsp, depende en parte de su capacidad de unir y regular otros factores de LCRE, tales como LDL, entregando evidencias de su posible función matricelular (Vera et al., 2015).

4.4.5 Funciones de OSCsp asociadas al flujo del LCR e hidrocefalia

El flujo del LCR depende de una interacción compleja entre varios factores, que incluyen la producción del propio LCR, el movimiento de los cilios presentes en las células endociliares, el ritmo cardíaco y el intercambio de factores con el líquido intersticial y la sangre (Fame & Lehtinen, 2020; Yamada, 2014). Además de estos factores, se ha observado que el flujo de LCR está asociado al desarrollo del OSC y la formación de la RF. En animales con ciliopatías, donde el flujo del LCR es anómalo, no se produce la formación adecuada de la fibra de Reissner, lo que resulta en severas malformaciones (Cantaut-Belarif et al., 2018) o hidrocefalia (Date et al., 2019). La función de la RF en este proceso se ha confirmado mediante experimentos de bloqueo inmunológico de OSCsp, llevados a cabo a través de la transferencia materna de anticuerpos contra la proteína, lo que ha resultado en la estenosis del acueducto cerebral y aparición de hidrocefalia (Vio et al., 2000). Resultados similares se han observado en cerebro fetal humano con hidrocefalia, en los que han identificado anomalías en la secreción de OSCsp hacia el LCR y la oclusión del acueducto cerebral (Ortega et al., 2016). Una posible explicación del mecanismo que vincula OSCsp con la hidrocefalia es la presencia de una gran cantidad de cargas negativas asociadas a glicosilaciones de OSCsp, las que podrían estar generando una repulsión hidrostática en las paredes endociliares (Ortega et al., 2016; Pérez-Fígares et al., 2001).

4.3 Glicosilaciones en OSCsp

Además de sus múltiples dominios, OSCsp presenta una gran cantidad de N-glicosilaciones en su estructura. Esta característica se evidenció mediante análisis electroforético de la fibra de Reissner en bovino tratada con endoglicosidasa F, donde se observó una reducción de entre

el 10 y el 25% de la masa molecular de sus 4 componentes inmunoreactivos (Nualart & Rodríguez, 1996). A pesar de esto, la localización precisa de las N-glicosilaciones en OSCsp aún no ha sido completamente descritas. De acuerdo con la base de datos UNIPROT, se han identificado cerca de 44 sitios de glicosilación potenciales en OSCsp de pollo.

Análisis recientes empleando electroforesis capilar en gel con detección de fluorescencia inducida por láser han revelado un patrón de glicosilación extremadamente complejo en OSCsp. Este patrón implica la presencia de una gran variedad de N-glicanos, desde bicatenarios neutrales hasta tetracatenarios altamente complejos, que pueden contener modificaciones como N-acetilglucosamina (GlcNAc), sulfataciones y/o múltiples ácidos siálicos del tipo Neu5Gc o Neu5Ac (Muñoz et al., 2019).

La presencia de estas abundantes y variadas glicosilaciones cargadas negativamente podría estar vinculadas a importantes consecuencias funcionales. En primer lugar, estas glicosilaciones podrían permitir que OSCsp actuara como una molécula altamente polar relevante en la mantención de la presión osmótica. La presión osmótica es una propiedad crucial del LCR que permite la expansión de las vesículas cefálicas durante el desarrollo (Alonso et al., 1998) y que mantiene la apertura en los estrechamientos entre cavidades, como es el acueducto cerebral y el canal central (Pérez-Fígares et al., 2001). En segundo lugar, las múltiples glicosilaciones son similares a las presentes en glucosaminoglicanos (GAGs). Estas moléculas contienen disacáridos frecuentemente modificados con sulfataciones que permiten su interacción con múltiples proteínas, incluidas proteínas solubles como factores de crecimiento, morfógenos, quimioquinas y lipoproteínas (Vallet et al., 2020). La función de estas

interacciones es variada, ya que en algunos casos actúan como co-factores, mientras que en otros casos secuestran factores limitando su biodisponibilidad (Hachim et al., 2019). Estos antecedentes sugieren que las glicosilaciones en OSCsp podrían estar funcionando de manera similar a las presentes en los GAGs, contribuyendo a la unión y modulación de componentes del LCR.

4.4 Estructura de la OSCsp

En la especie *gallus gallus*, la OSCsp está codificada por el gen SSPO, localizado en el cromosoma 2. Esta proteína exhibe una estructura multidominio, organizada en 27 dominios tipo repeticiones de tromboespondina (TSR) tipo 1, 13 dominios tipo Receptores de lipoproteínas de baja densidad tipo A (LDLRA), 3 dominios tipo Factor de Von Willebrand tipo D (VWFD), 7 dominios tipo Inhibidores de tripsina (TIL), 2 dominios tipo Factor de crecimiento epidermal (EGF), 1 dominio de Factor de Coagulación 5/8 tipo C (F5/8C), 1 dominio Emilina (EMI) y 1 dominio terminal de Nudo de cisteínas (CTCK) (UniProt Q2PC93) (Didier et al., 2007; Gobron et al., 1996, 2000). La función para cada uno de estos dominios se encuentra ampliamente detallada en Sepúlveda y Maurelia et al., 2021.

4.4.1 Variantes proteicas de OSCsp

Además de sus dominios clásicamente asociados con proteínas matricelulares, OSCsp comparte una característica fundamental con estas proteínas: la presencia de múltiples variantes proteicas, las cuales pueden ser generadas mediante procesos de splicing alternativo o clivaje proteolítico (Anastasi et al., 2020; Guillon-Munos et al., 2011; Vilorio & Hill, 2016). A través de análisis de western blot, se han detectado diversas bandas de diferente tamaño

molecular en el LCR_e, que se han relacionado clásicamente a clivaje proteolítico (Nualart & Hein, 2001; Vera et al., 2013; Vio et al., 2008). Recientemente, nuestro laboratorio identificó una nueva variante transcripcional de OSC_{sp}, que comprende la región C-terminal de la proteína nativa (aminoácidos 4146 – 5270 de OSC_{sp} nativa) (Farkas et al., 2022). La presencia de dominios matricelulares en la variante proteica compuesta por la región C-terminal (dominios TSR 21, TSR 22, TIL 10, TSR 23, TSR 24, TIL 11, TSR 25, TSR 26, TIL 12, TSR 27, vWC 7 y CTCK) sugieren que, al igual que en otras proteínas matricelulares, el OSC podría generar diversas variantes de OSC_{sp} para influir en la biodisponibilidad o actuar como cofactor de morfógenos en el LCR_e. Dentro de estos dominios, los que presentan una acción documentada como dominios presentes en proteínas matricelulares son los dominios TSR, vWC y CTCK.

4.4.2 Dominios TSR

El dominio TSR (IPR000884) está presente en múltiples proteínas matricelulares, incluyendo trombospondina, R y F-espondina, así como en todos los miembros de la familia CCN (FIGURA PAPER). En el caso de la trombospondina, se ha observado que el dominio TSR desempeña funciones relacionadas con la unión celular, interacciones proteína-proteína e interacciones proteína-GAGs (Chen et al., 2000). Entre los interactores asociados al dominio TSR se encuentran proteínas transmembrana, como CD36 e integrinas, así como moléculas extracelulares, como TGF-beta, metaloproteinasas de matriz 2 y 9 (MMP2, 9) y FGF-2 (Dos Santos et al., 2014; K. Zhang et al., 2020).

Se han identificado 27 dominios TSR en la OSCsp de vertebrados, lo que sugiere una alta relevancia de este dominio en la función biológica de la proteína nativa (O. Meiniel & Meiniel, 2007). En este sentido, se ha observado que el uso de un péptido derivado de una parte de uno de los dominios de OSCsp promueve crecimiento de neuritas en células de neuroblastoma a través de un mecanismo dependiente de integrinas-beta1 (Bamdad et al., 2004). Además, esta porción del dominio TSR demuestra presentar un efecto protector contra la neurotoxicidad inducida por glutamato en cultivos primarios de neuronas corticales e hipocampales de ratón, mediada por la modulación de integrina-beta1 y alfa secretasa, lo que afecta a mediadores intracelulares asociados con apoptosis, sobrevivencia y el crecimiento de neuritas (Delétage et al., 2021). En un modelo de regeneración, se ha observado que el péptido derivado de TSR promueve la regeneración axonal, el brote colateral y la subsiguiente recuperación funcional en un modelo de aspiración y contusión en daño de la médula espinal en ratas (Sakka et al., 2014). Sin embargo, es importante destacar que este péptido comprende solo una pequeña porción de uno de los 27 dominios TSR presentes en OSCsp, lo que sugiere que los otros dominios podrían estar ejerciendo funciones importantes que aún no han sido identificadas.

4.4.3 Dominios vWF-C

El dominio vWF-C (IPR001007), también conocido como repetición rica en cisteína tipo-cordina, está presente en múltiples proteínas matricelulares, como la trombospondina y miembros de la familia CCN, así como en otras proteínas extracelulares como el factor de von Willebrand F, miembros de la familia de las cordinas y reguladores endoteliales de unión a BMP. Una de las funciones más reportadas para este dominio es la regulación de TGF-beta y BMPs (Abreu et al., 2002; E.-R. Xu et al., 2017; J.-L. Zhang et al., 2007). El principal efecto de

este dominio en la señalización BMP es la inhibición y regulación de biodisponibilidad de sus ligandos, aunque en algunos casos se ha observado inesperadamente la potenciación (Sallon et al., 2017). Por ejemplo, estudios funcionales de *crossveinless-2*, uno de los miembros de la familia *cordina* con 4 dominios vWF-C, han demostrado que BMP se une a la subunidad 1 del dominio vWF-C1 generando un efecto anti-BMP, mientras que en *cordina*, la unión a BMP ocurre en la subunidad 2 del dominio vWF-C1, desencadenando en un efecto pro-BMP (J.-L. Zhang et al., 2007). Por otro lado, se ha observado que CCN-2 se une directamente a BMP-4 a través de su dominio vWF-C, impidiendo su interacción con su receptor, mientras que este mismo dominio promueve la unión de TGF-beta a su receptor (Abreu et al., 2002). Anteriormente, también se ha observado que ciertas proteínas que se unen a BMP pueden aumentar la difusión y vida medio de los morfógenos, inhibiendo la señalización local de BMP y, al mismo tiempo, aumentando el rango de actividad (Wharton & Serpe, 2013), permitiendo que BMPs viajen a mayores distancias y generen gradientes con una señal mantenida por periodos más largos (Umulis et al., 2009). Dado que BMP-7 y TGF-beta 1 y 2 están presentes en el LCR adulto, y que se ha detectado actividad BMP en estadios embrionarios, la presencia de 7 dominios vWF-C en OSCsp sugiere fuertemente una interacción con estos morfógenos.

4.4.4 Dominio CTCK

El dominio CTCK (IPR006207) se encuentra altamente conservado en diversas proteínas extracelulares, como vWF, múltiples mucinas, morfógenos (NGF, TGF-beta, VEGF y antagonistas BMP), hormonas (hormona luteinizante, gonadotrófica, estimulante tiroidea y foliculoestimulante) y los miembros de las proteínas matricelulares CCNs (McDonald & Hendrickson, 1993; Takigawa, 2017; Vitt et al., 2001). La secuencia consenso del motivo CTCK puede identificarse por un patrón de 6 residuos cisteína separados por un espacio

determinado que facilita la formación de 3 puentes disulfuro. La rigidez proporcionada por estos enlaces conduce a la exposición de residuos hidrofóbicos, lo que favorece la interacción de este dominio con otras proteínas para reducir su hidrofobicidad (Holbourn et al., 2008; McDonald & Hendrickson, 1993; Sun & Davies, 1995).

Se han identificado diversas proteínas interactoras del dominio CTCK en otras proteínas, tales como integrinas ($\alpha 6\beta 3$, $\alpha v\beta 5$, $\alpha v\beta 3$, $\alpha m\beta 2$ y $\alpha 5\beta 1$), perlecan, vitronectina, decorina y proteoglicanos heparán-sulfatos (HSPG) de superficie celular. En todas estas interacciones, CTCK actúa como un dominio crucial que determina como estas proteínas controlan los procesos de adhesión celular (Ball et al., 2003; Gao, 2006; Gao & Brigstock, 2004). De forma similar, se ha demostrado que el dominio CTCK puede modular la señalización Wnt mediante la interacción con LRP6 (LDL receptor related protein 6) (Latinkic, 2003; Mercurio, 2004). Además, el dominio CTCK también se ha asociado a procesos de dimerización y polimerización de homodímeros y heterodímeros con otras proteínas que contienen el mismo dominio (Sun & Davies, 1995), así como a la formación de polímeros largos de vWF y mucina (Javitt et al., 2020). Por tanto, estos antecedentes sugieren una posible interacción entre el dominio CTCK de OSCsp con factores presentes en el LCR que poseen el mismo dominio, como NGF, TGF-betas o HSPGs, así como posiblemente una participación en la polimerización de OSCsp para formar la fibra de Reissner.

Dado que los dominios de la región C-terminal de OSCsp son unidades modulares importantes en la interacción con morfógenos en otras proteínas, el principal objetivo de esta tesis es identificar los componentes con los que interacciona esta región. Dado que, el neuroepitelio que se encuentra en contacto con el LCR presenta un balance en la proliferación y diferenciación de sus progenitores neurales, se buscó analizar la función de la región C-terminal sobre este balance mediante estrategia *in vitro* e *in vivo*.

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

OSCsp es una proteína de gran tamaño secretada desde etapas tempranas hacia el LCR. Esta proteína contiene múltiples dominios previamente descritos en proteínas matricelulares, los cuales se caracterizan por regular la interacción con componentes de la matriz extracelular y receptores de la membrana plasmática. Estudios previos sugieren que OSCsp estaría modulando componentes del LCR, promoviendo la diferenciación, a expensas de una disminución en la proliferación del neuroepitelio, ambos eventos cruciales en la morfogénesis del SNC.

Antecedentes del laboratorio indican que, especialmente en etapas tempranas del desarrollo embrionario, la OSCsp presenta una isoforma de menor tamaño compuesta por la región C-terminal de OSCsp, cuya función no ha sido documentada hasta la fecha. La presencia de dominios matricelulares en la región C-terminal de OSCsp plantea la pregunta si esta nueva isoforma podría estar involucrada en la modulación de componentes del LCR sobre el neuroepitelio.

III. HIPÓTESIS

“OSC-espondina, a través de su región C-terminal (TSR27, vWC7 y CTCK), interacciona con factores neurogénicos presentes en el líquido cefalorraquídeo embrionario, regulando su efecto”

IV. OBJETIVOS

Objetivo general: Evaluar la interacción entre factores presentes en el LCRé con OSCsp nativa y su región C-terminal, así como el efecto de dicha interacción sobre la diferenciación y proliferación del neuroepitelio.

Objetivos específicos:

Objetivo 1: Determinar los factores del LCRé que interaccionan con OSCsp y su región C-terminal.

- 1.1 Identificar las proteínas interactoras de OSCsp en el LCRé mediante co-inmunoprecipitación acoplada a espectrometría de masas.
- 1.2 Identificar las proteínas interactoras de la región C-terminal de OSCsp producida de manera recombinante, mediante la exposición *in vitro* al LCRé y purificación de los complejos formados acoplada a espectrometría de masas.
- 1.3 Analizar los interactores de la región C-terminal de OSCsp mediante estudios bioinformáticos.

Objetivo 2: Estudiar el efecto morfogénico de la interacción entre la región C-terminal de OSCsp con factores presentes en el LCRé en cultivo celular de progenitores neurales.

- 2.1 Analizar el efecto de la región C-terminal de OSCsp y su interacción con componentes del LCRé sobre la proliferación de precursores neurales.
- 2.2 Analizar el efecto de la región C-terminal de OSCsp y su interacción con componentes del LCRé sobre la diferenciación de precursores neurales.

Objetivo 3: Analizar el efecto de la región C-terminal de OSCsp *in vivo* mediante su sobreexpresión en embriones de *gallus gallus*.

- 3.1 Estudiar el efecto de la región C-terminal de OSCsp sobre la proliferación de progenitores neurales de la médula espinal mediante electroporación *in vivo*.
- 3.2 Estudiar el efecto de la región C-terminal de OSCsp sobre la diferenciación de progenitores neurales de la médula espinal mediante electroporación *in vivo*.

V. MATERIALES

1 Animales de experimentación

Como modelo animal, empleamos huevos de la especie *Gallus gallus* adquiridos en instalaciones agrícolas ubicadas en la región de estudio. Los huevos fertilizados fueron incubados a una temperatura constante de 37°C en humedad, hasta alcanzar el estadio de desarrollo requerido, determinado según los criterios establecidos por Hamburger & Hamilton (1951). Todos los experimentos se llevaron a cabo en estricto cumplimiento con las directrices de bioseguridad y bioética definidas por la Comisión Nacional de Investigación en Ciencias y Tecnología (CONICYT) del Gobierno de Chile, y contaron con la aprobación del Comité de Ética de la Universidad de Concepción.

2 Cepas bacterianas

E. coli DH5 α : Cepa empleada para la transformación, amplificación y posterior purificación de plásmidos en gran escala.

Genotipo: F- ϕ 80/*lacZ* Δ M15 Δ (*lacZYA-argF*)U169 *recA1 endA1 hsdR17*(r_K, m_K) *gal-phoA supE44 λ -thi-1 gyrA96 relA1*

E. coli BL21 (DE3): Cepa empleada para la producción de proteína recombinante.

Genotipo: *B dcm ompT hsdS*(r_Bm_B) *gal*

3 Plásmidos

Los constructos utilizados durante el desarrollo de esta tesis fueron purificados utilizando el kit Qiagen® Pasmid Maxi Kit (Qiagen, #12163), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Al respecto, los plásmidos utilizados codifican respectivamente para:

pSecTag2A/Hydro (Cat. #V910-20): Señal de exporte V-J2-C para secreción de proteínas recombinantes en células de mamífero, epítipo polihistidina (6xHis) y c-myc en región C-terminal de sitio de clonamiento múltiple bajo el control del promotor de citomegalovirus (CMV).

pIRES-RFP: Expresión bicistrónica de dos genes bajo el mismo transcrito ARNm. El constructo codifica para la proteína reportera roja (*Red Fluorescent Protein*, RFP) río arriba del elemento IRES bajo el control del promotor de citomegalovirus (CMV).

pD441-CtermSCOsp: Expresión de la región C-terminal de OSCsp bajo el control del promotor T5 para la expresión *E. coli*.

pcDNA3.1-tdTomato: Expresión de la proteína fluorescente roja tomate bajo el control del promotor de citomegalovirus (CMV).

4 Kits comerciales

KAPA HiFi HotStart ReadyMix PCR Kit (Cat. #KK2601, Roche): Kit de PCR con una ADN polimerasa de alta fidelidad, empleada para la amplificación de fragmentos de ADN destinados al subclonamiento de secuencias. Se siguieron las instrucciones de uso sugeridas por el fabricante para 25 µL de reacción, y un ajuste en el tiempo de extensión de la reacción a 15 segundos por el tamaño del fragmento.

Kit Qiagen plasmid miniprep (Cat. #12123, Qiagen) y maxiprep (Cat. #12162, Qiagen): Kit de purificación de ADN plasmidial desde bacterias recombinantes para los constructos previamente nombrados. Se siguieron las instrucciones de uso sugeridas por el fabricante.

Kit QIAquick gel extraction (Cat. #28704, Qiagen): Kit de purificación de fragmentos de ADN generados por digestión enzimática, desde gel de agarosa. Se siguieron las instrucciones de uso sugeridas por el fabricante.

T4 DNA ligasa (Cat. #15224017, Invitrogen™): Kit enzimático para la ligación de fragmentos de ADN empleados en el clonamiento de plásmidos. Se siguieron las instrucciones de uso sugeridas por el fabricante para la ligación de fragmentos de ADN con extremos cohesivos.

Kit de revelado cytiva amersham RPN2209 ECL Western blotting detection reagent: Permite detección de bandas con alta sensibilidad por quimioluminiscencia en membranas de PVDF marcadas con anticuerpos acoplados con HRP.

Pierce Silver Stain (Cat. #24612, Thermo Scientific™): Tinción de plata ultrasensible (límite de detección 0,25 ng) para la detección de proteínas en geles de poliacrilamida. Se siguieron las instrucciones de uso sugeridas por el fabricante.

PNGase F (Cat. #P0705S, New England Biolabs): Tratamiento enzimático basado en amidasa para remover oligosacáridos desde glicoproteínas. El tratamiento fue efectuado en 20 µg de proteína y siguiendo las instrucciones de uso del fabricante para la reacción en condiciones denaturantes.

Filtro de centrifugación Amicon® Ultra - 10K Membrane (Cat. #UFC201024PL, Merck Millipore): Unidades de filtración empleadas para concentración de proteínas con masa mayor a 10 KDa. La concentración por centrifugación fue realizada de acuerdo con las instrucciones de uso del fabricante.

Sistema de purificación ProBond (Cat. #85001, Invitrogen): Basado en una matriz de agarosa entrecruzada con ácido iminodiacético que permite quelar níquel para purificación de proteínas con epítipo de polihistidinas.

5 Líneas celulares y reactivos de cultivo celular.

5.1 Líneas celulares.

HEK293T: Línea celular derivada de cultivo primario de riñón humano embrionario inmortalizada. Empleada por su alta capacidad para la producción de proteínas recombinantes (Tan et al., 2021).

Neuro-2a (N2A): Línea celular de neuroblastoma aislados desde tejido cerebral de ratón. Empleadas para estudios de diferenciación neuronal (D. Martín et al., 2024; Teli et al., 2022).

5.2 Reactivos y medios de cultivo celular.

Medio HyClone DMEM (Cytiva): Contiene 4,5 g/L de D-Glucosa y 3,7 g/L NaHCO₃. Empleado para preparar medios de cultivo, transfecciones y tratamientos.

Penicilina-Estreptomicina (P/S) (CellGro – Mediatech): Contiene 10 I.U. por mL de penicilina y 10 mg/mL de estreptomicina. Antibiótico empleado para la preparación de medios de cultivo y tratamientos.

L-glutamina (CellGro – Mediatech): Contiene 200 mM de L-glutamina, empleado como suplemento en los medios de cultivo y tratamientos.

Medio de crecimiento: DMEM suplementado con suero fetal de bovino al 5% (GE Healthcare); 2 mM de L-Glutamina (CellGro – Mediatech); 1 mL en 100 mL de Penicilina-estreptomicina (CellGro – Mediatech).

Tripsina-EDTA 0,25% (Corning®): empleada para des adherir las células desde las placas de cultivo.

Poli-L-lisina (Sigma-Aldrich): Empleada para aumentar la adherencia de células a cubreobjetos de vidrio.

6 Anticuerpos

ANTICUERPO (Antígeno)	TIPO	DILUCIÓN	PROCEDENCIA
ANTICUERPOS PRIMARIOS			
Afru16 (OSCsp)	Policlonal Conejo	1:500 (IF) 1:2000 (WB)	Donación Dr. Rodríguez
Afru11 (OSCsp)	Policlonal Conejo	1:500 (IF) 1:2000 (WB)	Donación Dr. Rodríguez
RAFRU (OSCsp)	Policlonal Rata	1:500 (IF) 1:2000 (WB)	Donación Dr. Rodríguez
D2C8 (fosfo-Histona H3 Ser10)	Monoclonal Conejo	1:200 (IF)	Cell Signaling Technology, Inc.
6G3 (fosfo-Histona H3 Ser10)	Monoclonal Ratón	1:200 (IF)	Cell Signaling Technology, Inc.
MMS-435P (β III-tubulina)	Monoclonal Ratón	1:200 (IF)	BioLegend, Inc.
anti-DCX (Doublecortina)	Monoclonal Cabra	1:200 (IF)	Abcam
anti-6xhistidine epítpe	Monoclonal Ratón	1:200 (IF) 1:2000 (WB)	BioLegend, Inc.
anti-6xhistidine epítpe	Monoclonal Conejo	1:200 (IF) 1:4000 (WB)	Bethyl Laboratories, Inc.
anti-c-myc epítpe	Monoclonal Ratón	1:200 (IF) 1:2000 (WB)	BioLegend, Inc.
3A10 (Neurofilament-associated)	Monoclonal Ratón	1:2 (IF)	DSHB
anti-BrdU (5-Bromo-2-desoxiuridina)	Policlonal Oveja	1:200 (IF)	Abcam
ANTICUERPO SECUNDARIO			
anti-mouse Alexa 555	Monoclonal Burro	1:300 (IF)	Jachson Immunoresearch, West Grove, PA
anti-rabbit Alexa 488	Monoclonal Burro	1:300 (IF)	Jachson Immunoresearch, West Grove, PA
anti-goat Cy5	Monoclonal Burro	1:300 (IF)	Jachson Immunoresearch, West Grove, PA
Anti-IgG de Ratón acoplado a peroxidasa	Monoclonal Cabra	1:6000 (WB)	Jachson Immunoresearch, West Grove, PA
Anti-IgG de Conejo acoplado a peroxidasa	Monoclonal Cabra	1:6000 (WB)	Jachson Immunoresearch, West Grove, PA
OTROS MARCADORES			
DAPI		1:100 (IF)	ThermoFisher
Faloidina iFluor-488		1:500 (IF)	Abcam

Tabla 3. Anticuerpos y marcadores fluorescentes empleados en este trabajo, diluciones empleadas y procedencia.

7 Reactivos y soluciones generales

Acetona (Merck); etanol (J.T. Baker); HCl (Merck); Isopropanol (Merck); Agua grado biología molecular (Promega); BSA (Rockland); medio de recuperación de bacterias SOC (Invitrogen™); Lipofectamina 2000 (Invitrogen™); medio de montaje acuoso para fluorescencia (Faramount Aqueous, DAKO); IGEPAL (Sigma-Aldrich); PBS (136 mM de NaCl; 2,7 mM de KCl; 8,1 mM de Na_2HPO_4 ; 1,5 mM de KH_2PO_4 ; pH 7,4); Persulfato de amonio (PSA, Amresco) al 10%; DMSO (Sigma-Aldrich); paraformaldehído (PFA, Sigma-Aldrich) al 4%; Gelatina (Sigma-Aldrich), Tween-20 (US Biological); Triton X-100 (US Biological); Cocktail inhibidor de proteasas en tabletas cOmplete™ Ultra (Roche); Inhibidor de proteasas PMSF (Thermo Scientific™); Reactivo Bradford (Protein Assay Dye Reagent Concentrate; Bio-Rad); solución de acrilamida 30% (29% p/v acrilamida, 1% p/v bisacrilamida, Bio-Rad); membrana PDVF (Bio-rad); tampón de carga de proteínas (50 mM Tris-Hcl pH 6,8; 5% p/v β -mercaptoetanol; 2% p/v SDS; 10% v/v Glicerol; 0,1% azul de bromofenol); tampón de migración de proteínas (25 mM Tris; 250 mM Glicina; 0,1% p/v SDS); tampón de transferencia de proteínas (25 mM Tris; 250 mM Glicina; 0,037% p/v SDS; 20% v/v Metanol); TBS (72 mM NaCl; 20,7 mM Tris); TEMED (Sigma-Aldrich); TBS-T (72 mM NaCl; 20,7 mM Tris; 0,1% v/v Tween-20); tampón de acoplamiento a proteína A (50 mM Tris-HCl pH 8,0; 75 mM NaCl; 5 mM EDTA; 0,1% NP40); tampón borato (200 mM H_3BO_3 ; 50 mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ pH 9.0); metanol absoluto (JK Baker); tampón fosfato (137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10mM Na_2HPO_4 ; 1.8mM KH_2PO_4); Dako (Agilent); Fast Green FCF (Sigma-Aldrich); HistoClear (National Diagnostics); Caldo LB (Apex BioResearch Products); Agar LB (Apex BioResearch Products);

8 Materiales en general y equipos disponibles

Sistema de imagen iBright CL750 (Invitrogen) para la visualización de bandas de ADN en geles de agarosa para el subclonamiento por PCR de la región C-terminal de OSCsp y para la visualización de bandas de proteínas en gel de poliacrilamida teñidas con tinción de plata o reveladas para identificar proteínas mediante western blot.

Electroporador Ovodyne TSS20 (Intracel, Royston Herts, UK) para la electroporación de médula espinal de embriones de pollo.

Estereomicroscopio AxioZoom V16 (Carl Zeiss) equipado con un sistema Apotome para la visualización de muestras electroporadas y luego de realizar la inmunofluorescencia al presentar filtros en el rango de DAPI, GFP, RFP y BFP.

Microscopio confocal LSM 780 (Carl Zeiss) para obtener las imágenes de la médula electroporada sometidas a inmunofluorescencia para la visualización de diferentes componentes en distintos canales de fluorescencia.

VI. MÉTODO

1 Western Blot

20 µg de proteínas fueron mezcladas con tampón de carga con 200 mM de DTT y se calentaron a 95°C durante 15 minutos. Las muestras se cargaron y separaron mediante SDS-PAGE en un gel de poliacrilamida al 12%. Las proteínas separadas en el gel se transfirieron a membranas de PVDF utilizando corriente eléctrica con un amperaje constante de 28 mA durante 18 horas. Posteriormente, los sitios de unión inespecíficos para anticuerpos se bloquearon en la membrana utilizando una solución de leche al 5% p/v en tampón TBS con Tween-20 al 0,1% v/v durante 1 hora a temperatura ambiente. Las membranas bloqueadas se incubaron con anticuerpos primarios (Tabla 3) diluidos en TBS-Tween al 0,1% v/v durante toda la noche a 4°C con agitación. Después de tres lavados de 15 minutos cada uno con TBS-Tween al 0,1% v/v, las membranas se incubaron con los anticuerpos secundarios correspondientes (Tabla 3) durante 2,5 horas a temperatura ambiente con agitación. Tras otros tres lavados, las membranas se revelaron utilizando el kit de revelado Cytiva Amersham RPN2209 ECL, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las bandas respectivas se detectaron con el equipo de revelado iBright 750 (Invitrogen).

2 Co-inmunoprecipación de OSCsp y sus componentes asociados desde el LCRé.

Para identificar las proteínas que interactúan con OSCsp nativa (OSCsp), se utilizaron 4 mg de proteínas totales de LCRé. Las proteínas fueron sometidas a co-inmunoprecipitación utilizando columnas del kit de co-inmunoprecipitación Pierce (Thermo Scientific), cargadas con proteína

A/G unida covalentemente a 0,1 µg de AFRU16 (dirigida contra OSCsp) o suero policlonal de conejo (como control).

La unión de los anticuerpos a la proteína A/G se llevó a cabo incubando la resina con tampón de acoplamiento a proteína A y los anticuerpos mencionados durante toda la noche a 4°C con agitación orbital. Al día siguiente, la resina se lavó con tampón borato y se trató con DMP durante 1 hora con agitación orbital. Posteriormente, la resina acoplada a los anticuerpos se lavó con etanolamina 100 mM durante 1 hora, seguida de tres lavados con PBS, y se bloqueó con BSA al 1% (p/v) en PBS durante 30 minutos.

Para eliminar uniones no específicas con la resina, las muestras de LCRé se preaclaron incubándolas con proteína A/G durante 1 hora. Las muestras preaclaras se cargaron en la resina unida a AFRU16 bloqueada y se incubaron con agitación orbital durante toda la noche a 4°C. Posteriormente, se colectó la fracción no unida, se realizaron tres lavados adicionales con PBS, y se eluyeron las proteínas co-inmunoprecipitadas utilizando glicina 100 mM, pH 2,7. Las fracciones obtenidas se almacenaron para su análisis posterior mediante western blot y espectrometría de masas.

3 Espectrometría de masa para la identificación de las proteínas que interaccionan con OSCsp nativa en el LCRé.

Para identificar las proteínas obtenidas tras la co-inmunoprecipitación de OSCsp nativa desde el LCRé, las muestras fueron enviadas al instituto Melisa (Concepción) para su análisis. Las muestras fueron en primer lugar precipitadas con acetona fría e incubadas toda la noche a -80°C y centrifugadas a 16.000g por 15 minutos. El precipitado de proteínas fue resuspendido

en una solución caotrópica 8M Urea y 25 mM bicarbonato de amonio, para luego ser reducidas con 20mM DTT por 1 hora a temperatura ambiente. Las muestras reducidas fueron alquiladas con 20mM iodoacetamida por 1 hora en oscuridad a temperatura ambiente.

Las muestras se digirieron con tripsina grado secuenciación (Promega) en una proporción de 1:50 e incubadas por 16 horas a 37°C, y finalizada con ácido fórmico al 10%. Posteriormente, las muestras fueron limpiadas empleando una extracción en fase solida con una columna Sep-Pak Vac C-18, siguiendo las indicaciones del fabricante. Los péptidos obtenidos fueron secados en un concentrador rotatorio a 1.000 rpm toda la noche a 10°C y resuspendidos en agua ultrapura con 0,1% de ácido fórmico y cuantificados por medio del sistema DirectDetect (Merck Millipore).

Para el análisis de espectrometría se inyectaron 200 ng de péptidos a un sistema de cromatografía líquida nanoUHPLC nanoElute (Bruker Daltonics) acoplado a un espectrómetro de masas timsTOF Pro (“Trapped Ion Mobility Spectrometry – Quadrupole Time Of Flight Mass Spectrometer”, Bruker Daltonics) utilizando una columna BrukerTEN (75 μ m x 100 mm, C18). La cromatografía líquida se realizó utilizando un gradiente de 40,8 minutos del 2% al 35% de tampon B (0,1% Ac. Fórmico – Acetonitrilo). La colección de resultados fue realizada utilizando el software timsControl 2.0 (Bruker Daltonics) bajo 10 ciclos de PASEF, con un rango de masas de 100 – 1700 m/z, ionización del capilar 1.500 V y una temperatura de 180°C, frecuencia del TOF 10 KHz a una resolución de 50.000 FWHM.

Los archivos obtenidos del instituto Melisa (Concepción) fueron analizados con el software Maxquant (CITA) en un servidor de análisis de datos compuesto por 8 núcleos y 512 GB de memoria RAM. Se utilizaron parámetros de tolerancia de masas de 20 ppm y fragmentos iónicos de 0,05 Da. Dentro de las opciones de digestión se utilizó tripsina como enzima, modo

de digestión específico y un máximo de 2 escisiones de pérdidas por péptido (“missed cleavages per peptides”). Se utilizaron como modificaciones la oxidación de metioninas, acetilación del N-terminal de la proteína y carbamidometilación de cisteínas.

Para la identificación de proteínas, se utilizó la base de datos de Gallus gallus de UNIPROT, que contiene 27,535 entradas. A partir de esta base de datos, se generaron espectrogramas teóricos de los péptidos que se obtendrían al digerir las proteínas con tripsina. Utilizando el motor de búsqueda Andromeda de MaxQuant, se compararon los espectrogramas experimentales con los teóricos para determinar a qué péptidos correspondían. A cada coincidencia se le asignó una puntuación que reflejaba la similitud entre el espectrograma experimental y el teórico (f correcto). Además, se realizó una comparación similar utilizando péptidos teóricos señuelos generados al invertir las secuencias de proteínas de la base de datos (f incorrecto). La proporción de espectrogramas correctamente asignados tanto a la base de datos real como a la secuencia señuelo se utilizó para calcular las probabilidades a priori de identificaciones correctas e incorrectas (P correcto y P incorrecto). Se empleó una estimación de la tasa de falsos descubrimientos (FDR) inferior al 0,5% para ajustar estas probabilidades. Con estos valores, se calculó la probabilidad de error posterior (Posterior Error Probability, PEP) para cada identificación de péptido, proporcionando una medida robusta de la confiabilidad de cada identificación.

$$PEP = \frac{P \text{ incorrecto} \times f \text{ incorrecto}}{P \text{ correcto} \times F \text{ correcto} + P \text{ incorrecto} \times f \text{ incorrecto}}$$

Para comparar la abundancia de proteínas en la muestra, se incluyó la opción de iBAQ (“intensity Based Absolute Quantification”) en el análisis. Este valor se obtiene sumando la intensidad de todos los péptidos identificados correctamente y normalizando por el número de péptidos teóricos de la proteína.

$$iBAQ = \frac{\sum_{i=1}^{Pep. \text{ correcto}} PEP}{Nj(\text{Peptidos teóricos})}$$

Para la cuantificación se requirió un mínimo de al menos un péptido único para la identificación de cada proteína, y se calculó un score basado en la sumatoria de los logaritmos negativos de PEP.

$$Score = \sum_i -\log (PEP)$$

Empleando el Software de análisis Perseus, se eliminaron las posibles proteínas contaminantes que presentan un bajo score y las que solo fueron identificadas un sitio con modificaciones.

4 Transformación de bacterias *E. coli* DH5 α

La amplificación de vectores plasmídicos se llevó a cabo mediante la transformación de bacterias competentes de *E. coli* DH5 α para la incorporación de vectores mediante el método químico basado en calcio, según el protocolo descrito por Green y Sambrook (Green & Sambrook, 2018). Para la transformación de las bacterias competentes se emplearon entre 20 y 100 ng de ADN de concentración conocida en 50 μ L de bacterias. La mezcla se incubó en hielo durante al menos 30 minutos, seguida de una incubación por 60 segundos a 42°C y posteriormente incubadas nuevamente en hielo por 2 minutos para inducir estrés térmico.

Para la recuperación de las bacterias transformadas, se añadieron 250 μ L de medio de recuperación SOC y se incubaron a 37°C con agitación a 200 rpm durante 1 hora. Transcurrido este tiempo, se sembraron las bacterias en placas con agar y el antibiótico correspondiente para la selección y se incubaron a 37°C por toda la noche, permitiendo la formación de colonias transformadas.

Para la purificación de los vectores plasmídicos, una colonia aislada se cultivó en caldo LB con el antibiótico de selección durante 16 horas a 37°C con agitación a 200 rpm. Transcurrido este tiempo, el caldo con las bacterias cultivadas se centrifugó a 12.000 rpm por 30 minutos para obtener un precipitado con las bacterias recombinantes. El precipitado se lisó y el ADN plasmídico se purificó utilizando el kit QIAGEN Maxi kit, siguiendo las instrucciones del fabricante.

5 Subclonamiento de la secuencia codificante para la región C-terminal de OSCsp en los vectores pSecTag2A y pIRES-RFP.

Para el subclonamiento de la región C-terminal de OSCsp en un vector de expresión en células de mamífero, se diseñaron oligonucleótidos partidores sentido y antisentido que flaquean la secuencia codificante de esta región en vector donante pD441 C-term (Tabla 4). En el extremo 3' de cada partidor se añadió una secuencia de reconocimiento para las enzimas de restricción HindIII y XhoI, seguida de una cola de timinas para facilitar el posicionamiento de la enzima de restricción. Los sitios de corte para estas enzimas están presentes en el sitio de clonamiento múltiple del vector receptor pSecTag2A/Hydro.

Con los oligonucleótidos diseñados se realizó un PCR del vector pD441 C-term con la polimerasa de alta fidelidad KAPA HiFi HotStart ReadyMix y luego se purificó la secuencia

amplificada desde el gel de agarosa empleando el kit QIAquick gel extraction (Qiagen). Tanto la secuencia amplificada como el vector receptor se digirieron con las enzimas de restricción y posteriormente se ligaron con el kit enzimático T4 ligasa (Invitrogen™). Estos fragmentos ligados se emplearon en una nueva transformación de bacterias competentes (de acuerdo con método 6.1), seleccionadas con el antibiótico de selección del vector receptor. De forma aleatoria se seleccionaron 10 colonias aisladas, las cuales se cultivaron para purificar su ADN plasmídico. Este ADN fue sometido a una PCR utilizando partidores diseñados para reconocer una secuencia del fragmento amplificado y una secuencia río abajo del sitio de clonamiento múltiplo en el vector receptor. De esta forma, se logró obtener un vector con la secuencia codificante para la región C-terminal de OSCsp fusionada con la señal de exporte V-J2-C de la cadena kappa de la Ig de ratón, el epítoto de polihistidina y el epítoto c-myc, generando un constructo final denominado pSecTag2A C-term OSCsp (Figura 13).

Aunque el vector pSecTag2A C-term permite la expresión de la región C-terminal de OSCsp en, carece de un gen reporte nativo, dificultando su seguimiento *in vivo*. Para solucionar esto, se diseñaron partidores para el vector donante pSecTag2A-Cterm (Tabla 4) con sitios de corte para las enzimas EcoRI y BamHI, presentes en el vector donante pIRES-RFP, con el fin de generar un nuevo vector que presente un gen reportero.

Esta estrategia permitió extraer la región C-terminal de OSCsp fusionada a su señal de exporte y a los epítotos polihistidina y c-myc, posicionándola para que queden río arriba del elemento bistrónico y RFP, generando un constructo denominado como pIRES C-term OSCsp (Figura 15). Los oligonucleótidos diseñados se utilizaron para realizar una PCR en el vector donante, obteniendo un amplicón flanqueado por los sitios de digestión. Tanto el amplicón como el

vector receptor se digirieron con las enzimas de restricción correspondientes, se sometieron a electroforesis en gel de agarosa y se extrajo la banda del fragmento digerido.

Los fragmentos purificados se mezclaron y ligaron, y se utilizaron para transformar bacterias *E. coli* siguiendo el método 6.1. Los clones recombinantes obtenidos se seleccionaron mediante PCR de colonias (Bergkessel & Guthrie, 2013) para identificar aquellos con el vector subclonado correctamente. Las colonias positivas se amplificaron en caldo LB con el antibiótico de selección correspondiente y se sometieron a extracción de ADN utilizando el kit Qiagen Plasmid Miniprep. La orientación del inserto en los vectores purificados se evaluó mediante digestión enzimática y su identidad se confirmó por secuenciación automática de Sanger (servicio de la PUC).

Constructo final	Partidores
pSecTag2A-Cterm	F: 5'- AAATAAAAGCTTAATGGACTGCCTGTGGAG -3'
	R: 5'- AAAAAACTCGAGTTCCACGTTTAGAGAAGTC -3'
pIRES-Cterm	F: 5'- AAAAGAATTCGCTAGCCACCATGGA -3'
	R: 5'- TTTTGGATCCGGGTTTAAACTCAATGA -3'

Tabla 4. Parejas de partidores empleados para el subclonamiento de fragmentos de ADN codificantes para la región C-terminal de OSCsp.

6 Cultivo celular

Las células se cultivaron en medio de crecimiento en placas de cultivo de 100 mm de diámetro. Las condiciones de cultivo fueron en una incubadora a 37°C, con 5% de CO₂ y 95% de humedad, y la manipulación se realizó en un gabinete de seguridad biológica de nivel II. Se

cambió el medio cada 2 días, procurando mantener una confluencia menor al 70%. Al alcanzar confluencias mayores, las placas se trataron con tripsina/EDTA al 0,025% durante 4 minutos a 37°C para desadherir las células y transferirlas a nuevas placas. Para el almacenamiento, las células desadheridas se resuspendieron en una solución de 10% DMSO v/v en suero bovino fetal y se guardaron a -80°C.

7 Transfección de células HEK-293T para obtención de proteína recombinante desde sobrenadante de cultivo.

Para producir la región C-terminal de OSCsp desde el sobrenadante de cultivo post-transfección, el vector pSecTag2A-Cterm se introdujo en células HEK293T mediante transfección con el reactivo Lipofectamina 2000 (Invitrogen). Para esto, el día anterior a la transfección se sembraron 2.000.000 de células en placas de 100 mm de diámetro y se cultivaron a 37°C hasta el día siguiente. Antes del tratamiento, las células se lavaron tres veces con PBS 1X estéril y se dejaron en 6 mL de medio de crecimiento sin SBF. Por separado, se preparó un tubo con 3 mL de medio de crecimiento sin SBF y 72 µL de Lipofectamina, el cual se mezcló con otro tubo que contenía 3 mL de medio de crecimiento sin SBF y 30 µg de vector pSecTag2A-Cterm. Tras 20 minutos de incubación, la mezcla se agregó a las placas con células e incubó por 4 horas a 37°C. Luego, se añadieron 1,2 mL de SBF y se incubó nuevamente por 3 horas. Después de este proceso, las placas se lavaron dos veces con PBS 1X y se dejaron con 5 mL de medio de cultivo sin SBF, permitiendo la liberación de la proteína heteróloga durante 24 horas de cultivo. El sobrenadante de cultivo se colectó, se centrifugó a 4000g durante 10 minutos y se filtró usando una unidad de filtración con poro de 0,45 µm para su posterior análisis por western blot.

8 Inmunofluorescencia de células HEK 293T transfectadas con pIRES-Cterm

Previo al inmunomarcaje, los cubreobjetos de 100 mm de diámetro fueron sometidos a radiación UV durante 20 minutos por cada lado para su esterilización. Posteriormente, se colocaron en pocillos de placas de 24 pocillos. Cada cubreobjeto se trató con poli-L-lisina durante 10 minutos para mejorar la adherencia celular y luego se secó durante un mínimo de 4 horas en condiciones estériles. Al día siguiente, se añadieron 40,000 células a cada pocillo para permitir su adherencia al vidrio. Para verificar la expresión de los elementos codificados en el vector pIRES C-term, se transfectaron células HEK 293T utilizando el método 6.5. Posteriormente, las células se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 20 minutos a 4°C. Tras dos lavados con PBS 1X, se realizó una post-fijación con metanol absoluto a -20°C, seguida de un lavado con PBS y dos lavados adicionales con tampón fosfato.

La permeabilización de las células fijadas se efectuó con tampón fosfato/Tritón X-100 al 0,1% (v/v) durante 10 minutos. Las células se incubaron toda la noche a temperatura ambiente con los anticuerpos primarios, AFRU16 y anticuerpo contra el epítipo de polihistidinas, diluidos en tampón fosfato/BSA al 1% (p/v). Al día siguiente, después de tres lavados, los cubreobjetos se incubaron con anticuerpos secundarios fluorescentes (anticuerpo contra ratón Alexa 488 y anticuerpo contra conejo Alexa 647, ambos a una dilución de 1:300) y 300 nM de DAPI, disueltos en tampón fosfato/BSA al 1% (p/v), durante 2 horas a temperatura ambiente en oscuridad. Después de tres lavados, los cubreobjetos se montaron utilizando medio de montaje para fluorescencia DAKO para su posterior visualización. Este método permite la detección de la señal RFP endógena del constructo pIRES-Cterm, así como el marcateo contra la proteína OSCsp nativa (señal de AFRU16) y la proteína recombinante compuesta por la región C-terminal de OSCsp (señal del epítipo de polihistidina).

9 “Pull-down” de las proteínas que interactúan con la región C-terminal de OSCsp en el LCRé.

Se empleó un protocolo adaptado de ensayo pull-down (Louche et al., 2017), para el cual se emplearon 360 μ L de una resina quelante de níquel ProBond (ThermoFisher Scientific) sobre un soporte de columna. La resina fue lavada con agua ultrapura y equilibrada con tampón de equilibrio por 10 minutos dos veces. A la resina equilibrada se le agregó una mezcla con 360 μ g de sobrenadante concentrado con la región C-terminal de OSCsp, 200 μ L de LCRé de gallus gallus HH30 y 200 μ L de tampón de equilibrio, la cual fue incubada por 3 horas a 4°C en agitación y una hora a 4°C sin agitación. Los complejos no unidos a la resina fueron lavados 3 veces con tampón de equilibrio y 3 veces con tampón de lavado con 50 mM de Imidazol. Para eluir los complejos unidos a la resina cargada con níquel, se empleó un tampón de elución con 300 mM de Imidazol incubado por 10 minutos a 4°C.

10 Espectrometría de masa para la identificación de las proteínas que interactúan con la región C-terminal de OSCsp nativa en el LCRé.

Al igual que para el análisis de proteínas que interactúan con OSCsp nativa en el LCRé las muestras fueron enviadas al instituto Melisa (Concepción) para su análisis bajo el mismo protocolo empleado para las muestras obtenidas de la co-inmunoprecipitación de OSCsp nativa (ver método 6.3), salvo por el tiempo del gradiente de HPLC, el cual se aumentó a 60 minutos. Para la abundancia de proteínas en la muestra, se empleó el método de cuantificación relativa LFQ (*Label-Free Quantification*) en el análisis. Este análisis busca generar un valor de normalización para cada corrida, empleado para multiplicar el valor de la intensidad de un

péptido en la corrida A a un valor similar en la corrida B que sea válido para la mayor población de intensidades de péptido. Empleando el Software Perseus, se eliminaron las posibles proteínas contaminantes que presentan un bajo score y las que solo fueron identificadas un sitio con modificaciones, para luego inputar valores de LFQ si se contaba con más de 3 valores validos en las distintas condiciones. Los datos obtenidos de LFQ convertidos a escala logarítmica fueron analizados en R-studio empleando el paquete DEQSeq2 para realizar un análisis de validación de las réplicas RLE y PCA, junto con un volcano-plot para observar la variación individual de intensidades por péptido

11 Inmunofluorescencia de células N2A con marcadores de diferenciación y proliferación.

Previo al inmunomarcaje, los cubreobjetos de 12 mm de diámetro fueron sometidos a radiación UV durante 20 minutos por cada lado para su esterilización. Posteriormente, se colocaron en placas de 24 pocillos. Cada cubreobjeto se trató con poli-L-lisina durante 10 minutos para mejorar la adherencia celular y luego se secó durante un mínimo de 4 horas en condiciones estériles. Al día siguiente, se añadieron 17.000 células a cada pocillo para permitir su adherencia al vidrio.

Para analizar las variaciones en el efecto morfogénico del LCRE en presencia y ausencia de la región C-terminal de OSCsp, las células fueron tratadas durante 24 horas con los sobrenadantes obtenidos utilizando el método 6.5 con el vector pIRES vacío o pIRES C-term, en ausencia y presencia de LCRE. Como control negativo se utilizó DMEM sin SBF y como control positivo, 10% de LCRE.

Posteriormente, las células se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 20 minutos a 4°C. Tras dos lavados con PBS 1X, se realizó una post-fijación con metanol absoluto a -20°C, seguida de un lavado con PBS y dos lavados adicionales con tampón fosfato. Luego, las células se permeabilizaron con tampón fosfato/Tritón X-100 al 0,1% (v/v) durante 10 minutos, seguido de dos lavados con tampón fosfato.

Las células se incubaron durante toda la noche a temperatura ambiente en una cámara húmeda con anticuerpos contra β III-tubulina y fosfo-histona III, diluidos en BSA al 1% (p/v) en tampón fosfato. Al día siguiente, se realizaron tres lavados con tampón fosfato y se incubaron con DAPI (1:100) y anticuerpos secundarios correspondientes, diluidos en tampón fosfato/BSA al 1% (p/v), durante 2 horas a temperatura ambiente. Las células fueron lavadas nuevamente con tampón fosfato y montadas con medio de montaje fluorescente Dako para su posterior visualización.

12 Electroporación de médula espinal de embriones *gallus gallus*

Empleando embriones de *gallus gallus* en el estadio HH 12, se llevó a cabo una inyección en el canal central de la médula espinal con los plásmidos td-Tomato y pIRES-Cterm. Ambos vectores contienen el promotor de citomegalovirus para la expresión de una proteína roja fluorescente. Sin embargo, el vector pIRES-Cterm, además, codifica en forma bicistrónica la región C-terminal de OSCsp. La electroporación se realizó mediante el electroporador Ovodyne TSS20 (Intracel, Royston Herts, UK), con los electrodos posicionado a ambos lados de la médula, aplicando 5 pulsos de 50 ms a 25 mV con descansos de 50 ms entre cada pulso. Permitiendo así la entrada del vector en un solo lado de la médula. Tras 2 días, los embriones fueron visualizados, y en caso de detectarse la señal fluorescente en la región electroporada,

esta fue microdisecionada en PBS 1X y posteriormente fijada durante 6 horas en paraformaldehído 4% p/v a 4°C en oscuridad. Este proceso permite preparar las muestras para su posterior uso en vibrátomo o criostato.

13 Inmunofluorescencia en tejido

13.1 En crióstato

Para el procesamiento de muestras para criostato, las muestras fijadas fueron lavadas con PBS 1X y luego mantenidas en sacarosa 20% en PBS por 5 días. Las muestras deshidratadas fueron incluidas en medio OCT (tissue-TEK) orientadas con el fin de obtener secciones transversales de la médula. Se obtuvieron secciones de 24 µm empleando criostato, las cuales fueron montados en portaobjetos recubiertos con gelatina 0,5% p/v y 0,05% p/v $KCr(SO_4)_2$, y almacenados a -80°C hasta su uso.

Los portaobjetos con las muestras fueron secados a temperatura ambiente por 30 minutos y equilibrados con tampón fosfato por 1 hora. Las secciones fueron incubadas con los anticuerpos primarios correspondientes, diluidos en tampón de bloqueo (1% BSA, 1% suero de oveja, 0,1% triton X-100) toda la noche en cámara húmeda.

Al día siguiente, se realizaron 3 lavados con tampón fosfato y se llevó a cabo la incubación con el anticuerpo secundario específico para la especie del anticuerpo primario, junto con la tinción nuclear DAPI por 2 horas. Después de tres lavados con tampón fosfato, los cortes fueron montados en un medio de montaje fluorescente Dako.

13.2 En vibrátomo

Las muestras fijadas fueron lavadas con PBS e incubadas en solución de bloqueo (5% BSA, 5% suero de oveja y 0,4% triton X-100 en PBS) por 1 noche. Al día siguiente, los cortes se incubaron en el anticuerpo primario correspondiente diluido en solución de bloqueo por 3 días a 4°C. Tras 6 lavados con PBS por 30 minutos, las muestras fueron incubadas con anticuerpo secundario y DAPI en solución de incubación (5% BSA, 5% suero de oveja en PBS) por una noche. Después de realizar 6 lavados con PBS por 30 minutos, las muestras fueron montadas en medio de montaje fluorescente Dako. Las secciones fueron analizadas con un microscopio láser confocal LSM780 NLO Zeiss.

14 Adquisición de imágenes

Para las células N2A tratadas, las imágenes fueron obtenidas utilizando el estereomicroscopio AxioZoom.V16. Se tomaron al menos 8 imágenes por condición y la selección de campos se realizó de manera randomizada. Para las muestras de inmunofluorescencia se utilizó un microscopio multifotón LSM780 (Zeiss), el que permite realizar un análisis confocal espectral, disponiendo de las líneas de láser de 405, 488, 555 y 633 nm, provisto por el centro de microscopia avanzada (CMA Bío-Bío) de la Universidad de Concepción.

15 Análisis de imágenes

15.1 Análisis de inmunofluorescencia asociada a proliferación y diferenciación de células N2A.

La cuantificación semi-automatizada de núcleos pH3 positivos se diseñó utilizando un código programado en lenguaje Macro de ImageJ (Schindelin et al., 2012), el cual permite cuantificar automáticamente los núcleos presentes en una imagen, aunque requiere del conteo manual de los núcleos pH3 positivos. Este código se ejecutó en cada imagen obtenida de distintos campos de células tratadas con LCR_e proveniente de embriones de *gallus gallus* en estadio HH30 por triplicado. El diseño del código transforma las imágenes derivadas de la señal de DAPI a formato 8-bits, aplica un umbral tipo Huang (L.-K. Huang & Wang, 1995), y genera una máscara binaria. Posteriormente, se analizan las partículas en la imagen con un tamaño entre 250 y 9000 píxeles, excluyendo aquellas que tocan los bordes de la imagen. Las mediciones fueron extraídas manualmente de las tablas generadas, agrupadas en un archivo EXCEL y analizadas estadísticamente por One-way ANOVA en GraphPad.

Para la cuantificación automatizada de núcleos pH3 positivos respecto al total en la imagen, se diseñó una línea de trabajo en el programa CellProfiler (Stirling, Swain-Bowden, et al., 2021). Esta línea automatizada permite identificar los objetos dentro de las imágenes en los canales pH3 y DAPI, utilizando un umbral tipo Otsu (Otsu, 1979) e identificando objetos con un diámetro mínimo de 50 píxeles y máximo de 200 píxeles. Para eliminar partículas que forman parte del fondo la imagen, se filtraron los objetos del canal pH3 que no colocalizan con objetos en el canal de DAPI. Debido a que parte de estas partículas colocalizan aleatoriamente con alguno de los núcleos en la imagen de DAPI, se dividió el área del objeto en el canal pH3 con el área del núcleo y se filtraron los objetos que ocuparon menos del 80% del área nuclear.

La cantidad de núcleos totales por campo y pH3 positivos fueron exportados a un archivo EXCEL, para luego generar gráficos y aplicar un test estadístico de One-way ANOVA en GraphPad.

Para el análisis de diferenciación, se utilizaron las imágenes de inmunofluorescencia contra el marcador β III-tubulina para marcar la morfología celular. Las imágenes fueron procesadas con el módulo EnhanceOrSuppressFeatures para resaltar los bordes celulares. A partir de estas imágenes, se detectaron los núcleos a través del canal DAPI y el citoplasma desde la imagen resaltada. La información extraída de los módulos MorphologicalSkeleton y MeasureObjectNeighbors se exportó a un archivo EXCEL, en donde se eliminaron las células que presentaban contacto con otras. Los datos de área, perímetro, descriptores morfológicos (Hull Convex y descriptores de Ferret) y de ramificaciones fueron analizados mediante Prism GraphPad.

Debido al gran número de células agrupadas en algunas condiciones, se utilizó la metadata obtenida en el análisis de morfología celular para ser analizada mediante el software de análisis de datos CellAnalyst (Stirling, Carpenter, et al., 2021). Para ello, se seleccionaron células claramente agrupadas por 10 rondas, lo que permitió crear un archivo clasificador que fue aplicado al total de células. Las mediciones de células positivas para el agrupamiento se exportaron a un EXCEL para su análisis en Prism Graphpad.

15.2 Análisis de proliferación y diferenciación por inmunofluorescencia de cortes de médula electroporada.

Para cuantificar los cambios en la proliferación y diferenciación, las imágenes obtenidas de la inmunofluorescencia con pH3 y 3A10 fueron analizadas con el programa ImageJ (Schindelin et al., 2012). En el análisis, se realizó una división en sextiles de la médula espinal en sentido dorsoventral, desde los cuales se realizó la medición de la intensidad de señal pH3 o 3A10 en la región interna y externa de la médula, respectivamente. La relación total de señal entre el lado electroporado y el control se obtuvo al comparar la sumatoria de señal en ambos lados.

$$R_{EC} = \frac{\sum I_{LE}}{\sum I_{LC}}$$

R_{EC} = Relación entre la intensidad total del lado electroporado, en comparación con el lado control.

$\sum I_{LE}$ = Sumatoria de intensidad en cada segmento del lado electroporado.

$\sum I_{LC}$ = Sumatoria de intensidad en cada segmento del lado control.

Para comparar los dos segmentos con una mayor área de electroporación (segmentos de electroporación masiva) con los otros cuatro segmentos menos electroporados (segmentos de electroporación discreta), la relación de los segmentos de electroporación masiva en comparación con los de electroporación discreta para el lado electroporado se normalizó con la relación entre ambos tipos de segmentos para el lado control.

$$R_{EM} = \frac{\sum I_{SME}}{\sum I_{SDE}} \times \frac{\sum I_{SDC}}{\sum I_{SMC}}$$

R_{EM} = Relación entre los segmentos de electroporación masiva en comparación con los de electroporación discreta, normalizados por ambos tipos de segmentos en el lado control.

$\sum I_{SME}$ = Sumatoria de intensidad en segmentos de electroporación masiva del lado electroporado.

ΣI_{SDE} = Sumatoria de intensidad en segmentos de electroporación discreta del lado electroporado.

ΣI_{SMC} = Sumatoria de intensidad en segmentos de electroporación masiva del lado control.

ΣI_{SDC} = Sumatoria de intensidad en segmentos de electroporación discreta del lado control.

16 Análisis estadísticos

En los datos que involucran microscopía confocal, el análisis estadístico fue realizado usando los programas GraphPad Prism 6.0 y Microsoft Excel 365. Todos los datos son presentados como valor de la media o mediana \pm SEM, según se indique en la figura. Las comparaciones estadísticas que consideran una variable fueron realizadas usando el test-t de Student de datos no pareados, test de Mann-Whitney o ANOVA de una vía, según se indique en la figura. Fueron considerados estadísticamente significativos para un intervalo de confianza del 95%, diferencias con un valor p bajo 0,05. A los valores $p < 0,05$; $p < 0,01$; $p < 0,001$ y $p < 0,0001$ se les asignó significancias estadísticas crecientes (*; **, *** y **** respectivamente). En el caso de los análisis de imágenes de tratamientos de células N2A, se analizaron un mínimo de 8 campos por triplicado (156 imágenes totales). Para el caso de los embriones electroporados se analizaron un mínimo de 3 animales.

VII. RESULTADOS

1 Objetivo I: Determinar los factores del LCR_e que interactúan con OSC_{sp} nativa y su región C-terminal.

- 1.1. Identificar las proteínas interactoras de OSC_{sp} nativa en el LCR_e mediante co-inmunoprecipitación acoplada a espectrometría de masas.

Para identificar las proteínas que interactúan con OSC_{sp} nativa en el LCR_e, se co-inmunoprecipitó OSC_{sp} con el anticuerpo AFRU16 desde el LCR_e, junto con los componentes con los que interactúa. La fracción co-inmunoprecipitada se analizó por espectrometría de masa para la identificación de las proteínas interactoras (Figura 8). Para esto, se utilizó una resina acoplada a proteína A, la cual permite la unión por la porción conservada Fc de los anticuerpos. Esta resina fue incubada y entrecruzada (“Crosslinking”) con el anticuerpo policlonal AFRU16, capaz de reconocer a la OSC_{sp} nativa. Para confirmar que el anticuerpo AFRU16 se entrecruzó adecuadamente con la proteína A, se tomaron alícuotas antes y después del proceso de entrecruzamiento. Estas muestras se cargaron en un gel de poliacrilamida al 12%, el cual fue sometido a electroforesis y transferencia hacia una membrana de PDVF, en la que se determinó la presencia del anticuerpo AFRU16 en los distintos carriles empleando un anticuerpo contra la subunidad Fc de conejo, especie hospedera en la que se produjo AFRU16 (Figura 9A). En el carril correspondiente a AFRU16, se observan las bandas esperadas de 50 y 20 KDa, correspondientes a las cadenas ligeras y pesadas del anticuerpo. Ambas bandas mostraron una disminución significativa tras la incubación con la resina, encontrándose completamente ausentes tras el entrecruzamiento. Esto se ve corroborado al cargar la proteína A acoplada a AFRU16, observando principalmente la cadena pesada del anticuerpo.

Una vez confirmado un correcto entrecruzamiento entre la resina y AFRU16, esta fue utilizada para construir una columna, la cual se incubó con LCRé extraído de embriones *gallus gallus* en estadio HH30 (7 días), previamente filtrado por resina con proteína A para eliminar las proteínas que interaccionan inespecíficamente con la resina. Tras la incubación, se realizaron tres lavados con un tampón alto en sales para eliminar las interacciones no específicas con la resina, seguidos de la elución de OSCsp nativa junto con las proteínas con las que se encuentra formando complejos en el LCRé. La presencia de OSCsp en la fracción eluida fue confirmada mediante western blot, empleando el anticuerpo RAFRU (anticuerpo policlonal de ratón contra OSCsp). Se observaron 2 bandas de <25 KDa y 250 KDa en el LCRé y al menos 3 bandas de 50, 125 y 250 KDa en la fracción eluida que son reactivas para RAFRU (Figura 9B). Estas bandas se encuentran ausentes en el control, en el que se empleó una resina entrecruzada con suero normal de conejo para la co-inmunoprecipitación del LCRé, validando la especificidad del anticuerpo por OSCsp nativa.

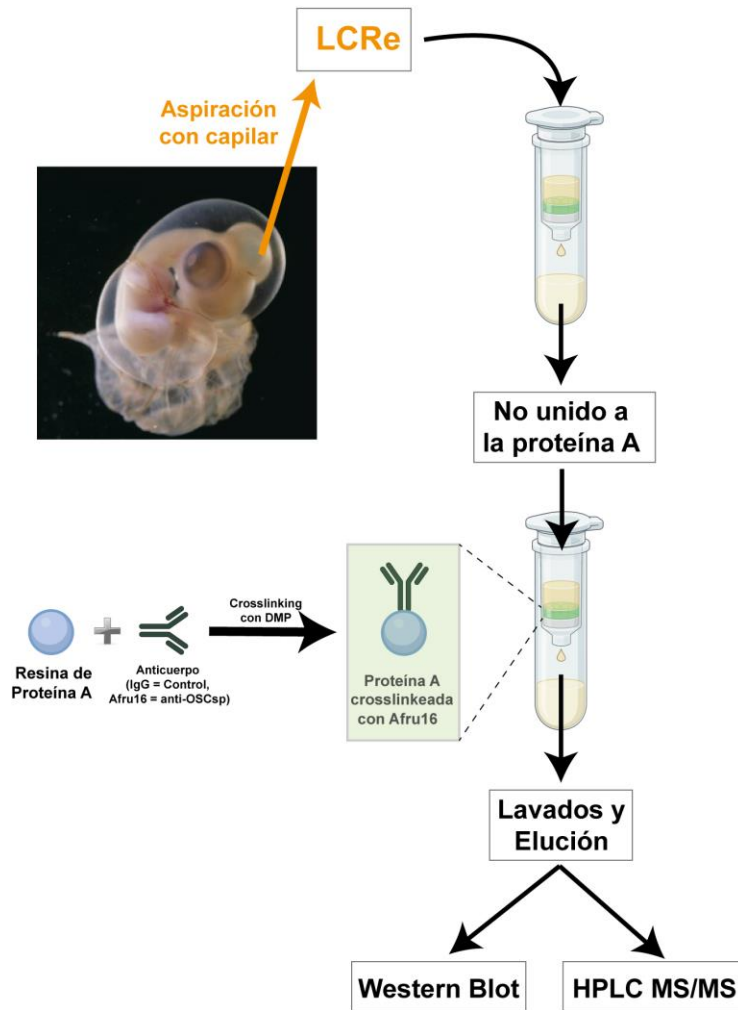


Figura 8. Esquema representativo del método empleado para la co-inmunoprecipitación de OSCsp nativa y las proteínas con las que interacciona en el líquido cefalorraquídeo embrionario.

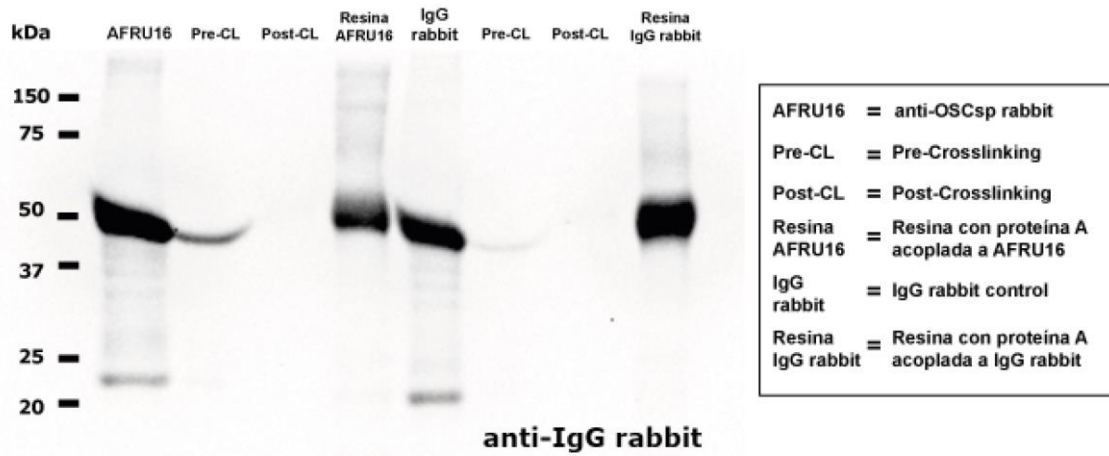
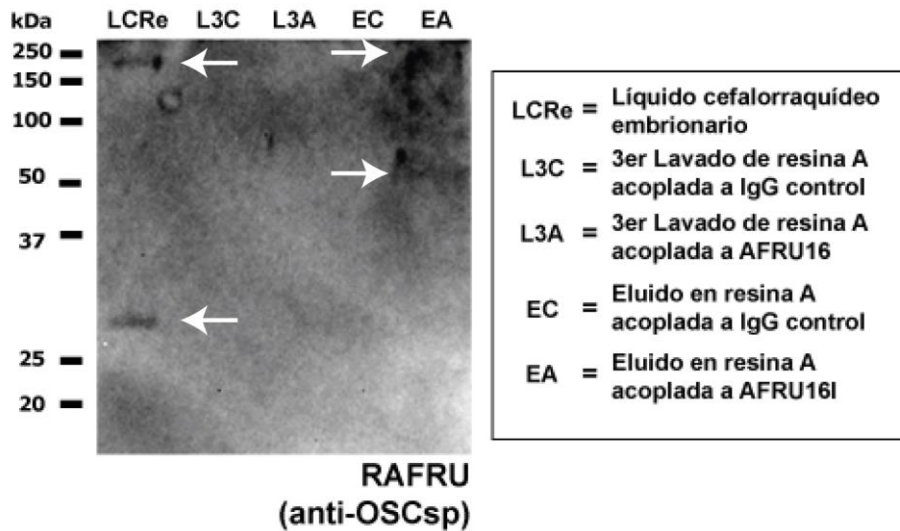
A**B**

Figura 9. Estandarización de la co-inmunoprecipitación de OSCsp nativa y sus complejos desde el líquido cefalorraquídeo embrionario. (A) Western Blot contra IgG de conejo para corroborar la eficiencia de entrecruzamiento entre la proteína A y AFRU16. **(B)** Western Blot contra OSCsp (RAFRU) para corroborar la presencia de la proteína nativa en la fracción eluida tras la co-inmunoprecipitación.

Confirmada la presencia de OSCsp nativa en la fracción eluida, se buscó identificar el resto de las proteínas interactoras co-inmunoprecipitadas desde el LCRé mediante espectrometría de masa. Después de filtrar los péptidos por un FDR (*False Discovery Rate*) mayor a 0,5% y asignar dichos péptidos a grupos de proteínas, se identificaron 60 proteínas en la fracción co-inmunoprecipitada con OSCsp nativa (Tabla 5). Las proteínas fueron ordenadas de acuerdo con un valor de cuantificación absoluta basada en intensidad (*intensity Based Absolute Quantification*, iBAQ) en la que la suma de intensidades de péptidos asignados a una proteína se normaliza por el número de péptidos teóricos de la proteína, permitiendo comparar la abundancia de proteínas en una muestra.

	Ensembl Gene ID	Gene name	Peptides	Sequence coverage [%]	Log(iBAQ)	Score
1	ENSGALG00010024773	APOA1	18	61.4	6.54	278.62
2	ENSGALG00010027528.1	APOA2	4	40.4	6.04	113.09
3	ENSGALG00010024759.1	APOC3	5	27.6	6.04	323.31
4	ENSGALG00010029722.1	SPECC1	1	0.7	5.97	13667
5	ENSGALG00010004116.1	SPRY1	1	3.1	5.80	61635
6	ENSGALG00010011679	SERPINB14	14	59.6	5.79	323.31
7	ENSGALG00010001381.1	MDFIC	1	5.7	5.78	11931
8	ENSGALG00010005094.1	AFP	34	54.2	5.76	323.31
9	ENSGALG00010020357	RBP4	8	61.2	5.75	267.81
10	ENSGALG00000015143	TTR	4	54.7	5.62	110.4
11	ENSGALG00010018973.1	NEFM	1	3.3	5.31	60879
12	ENSGALG00010003806.1	EGF	1	1.8	5.31	66655
13	ENSGALG00010019042.1	PEX6	1	2.9	5.23	59616
14	ENSGALG00010024750.1	APOA4	17	61.1	5.15	148.68
15	ENSGALG00010007977.1	APOB	138	38.7	5.13	323.31
16	ENSGALG00010011983	LYZ	5	49	5.12	46745
17	ENSGALG00010012179.1	H4-I	3	29.1	5.02	19124
18	ENSGALG00010011984	FN1	46	28	4.96	323.31
19	ENSGALG00015003366	HBE	5	47.6	4.81	52.87
20	ENSGALG00010017852.1	LETM2	2	4.5	4.76	12.02
21	ENSGALG00010004358.1	GC	12	44.4	4.72	192.91
22	ENSGALG00010013332	LUM	2	12.2	4.55	12064
23	ENSGALG00010014944.1	FGB	6	16.4	4.49	36737
24	ENSGALG00010024717.1	TF	17	35	4.48	15448
25	ENSGALG00010005070.1	ALB	13	28.5	4.47	101.58
26	ENSGALG00010028450.1	PTGDS	1	6.1	4.47	61763
27	ENSGALG00000061357	ACTB	8	29.9	4.43	50441
28	ENSGALG00010029410.1	VTN	4	13.5	4.42	30074
29	ENSGALG00010001287.1	PLPP4	1	2.9	4.38	60097
30	ENSGALG00010026367.1	RBP	2	10.1	4.33	26354
31	ENSGALG00010028024.1	RBM3	1	11	4.31	60421
32	ENSGALG00000055909	H2B-I	1	11.9	4.27	12107
33	ENSGALG00010012285.1	FBLN1	6	10.4	4.22	43.27
34	ENSGALG00010014972.1	FGA	9	22.1	4.15	82.77
35	ENSGALG00010005444.1	ACTA1	6	17.8	4.11	59605

36	ENSGALG00010021746.1	MTOR	1	0.6	4.11	62097
37	ENSGALG00010014956.1	FGG	2	11.6	4.03	32423
38	ENSGALG00010004307.1	NPC2	1	14.2	4.02	75492
39	ENSGALG00010022512.1	PRAP1	1	23	3.96	67339
40	ENSGALG00010008107.1	TUBB2A	2	6.4	3.93	14007
41	ENSGALG00010022401.1	LCAT	1	3.4	3.91	89417
42	ENSGALG00010001134.1	TUBA1A	2	10.9	3.85	13085
43	ENSGALG00010007226.1	PLG	8	13.2	3.84	48621
44	ENSGALG00010007759.1	AGT	1	3.5	3.81	77003
45	ENSGALG00010009833.1	SOD3	1	4.9	3.79	10287
46	ENSGALG00010014724.1	SPINK7	3	28.6	3.71	44018
47	ENSGALG00010005621	CDH2	1	1.8	3.66	63151
48	ENSGALG00010001525	EEF1A	2	5	3.59	14158
49	ENSGALG00010024208.1	SERPIND1	1	1.8	3.55	63204
50	ENSGALG00010010366.1	CLU	1	3.6	3.50	60459
51	ENSGALG00010024749.1	APOA5	2	10.8	3.49	16.91
52	ENSGALG00010022972.1	A2M	8	11.1	3.46	61.45
53	ENSGALG00010025032.1	FSTL1	2	6.7	3.32	12067
54	ENSGALG00010022038	GAPDH	1	7.2	3.26	65241
55	ENSGALG00010022644.1	ARMC8	1	4.2	3.20	61565
56	ENSGALG00010005264.1	ITIH2	1	2.8	3.20	20636
57	ENSGALG00010004760.1	THBS1	2	2.2	3.20	15702
58	ENSGALG00010026516.1	LOC420419	1	1.1	3.13	75872
59	ENSGALG00010021261.1	JUP	1	2.2	3.08	70238
60	ENSGALG00010015029.1	TFRC	1	1.7	2.70	63001
61	ENSGALG00010021914.1	LOC112533198	1	0.5	2.66	6015

Tabla 5. Proteínas del LCR que interactúan con OSCsp nativa identificadas mediante espectrometría de masa. Las proteínas son individualizadas por su identificación en la base de datos ENSEMBL y su símbolo, acompañados de la cantidad de péptidos identificados, el porcentaje de cobertura de la secuencia de la proteína, el valor del logaritmo de iBAQ y un score determinado desde la probabilidad de error posterior (PEP, *posterior error probability*).

Dentro de las proteínas que interaccionan con OSCsp nativa, se detectaron las apolipoproteínas A1, A2 y C3 como las tres primeras más abundantes, las cuales forman parte de lipoproteínas, en especial de alta densidad (*High density lipoproteins*, HDL). Otras proteínas identificadas con una función morfogénica relevante en el LCRé son RBP-4 y EGF, además de otras que regulan morfógenos, como THBS1 (que interacciona con FGF-2), SPRY1 (que interacciona con BDNF y FGF-2), VTN (que interacciona con IGF-2) y FSTL1 (que interacciona con IGFs).

Empleando la herramienta ShinyGO (Ge et al., 2020), las 60 proteínas identificadas como interactores de OSCsp nativa fueron agrupadas en base a su ontología génica (*Gene Ontology*, GO) asociados a términos de proceso biológico (Figura 10), componente celular (Figura 11) y función molecular (Figura 12). Dentro de los términos asociados a proceso biológico enriquecidos observamos en primer lugar unos relacionados con la presencia de lipoproteínas entre los interactores de OSCsp nativa, como son los términos de regulación de la actividad CoA-transferasa (*reg. of CoA-transferase activity*, GO:1905918), remodelamiento de partícula de lipoproteína de muy baja densidad (*very-low-density lipoprotein particle remodeling*, GO:0034372), remodelamiento de complejos proteína-lípido (*protein-lipid complex remodeling*, GO:0034368) y transporte de lípidos (*lipid transport*, GO:0006869). En segundo lugar, varios términos relacionados con la regulación de la actividad catalítica en otras proteínas, como son la regulación negativa de la actividad endopeptidasa (*negative reg. of endopeptidase activity*, GO:0010951) y de la actividad hidrolasa (*negative reg. of hydrolase activity*, GO:0051346). En tercer lugar, la presencia de términos enriquecidos asociados a procesos de adhesión a la matriz extracelular y migración celular, como son los términos de adhesión célula-matriz (*cell-matrix adhesion*, GO:0007160), migración de célula epitelial (*epithelial cell migration*, GO:0010631) y migración celular tipo ameboideal (*ameboidal-type cell migration*, GO:0001667).

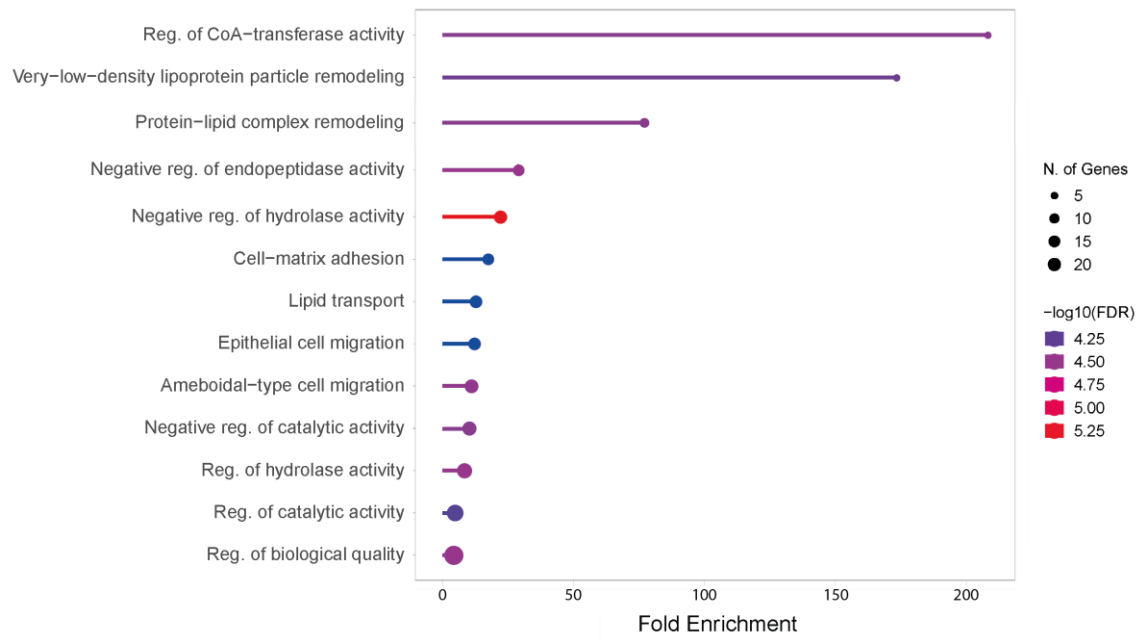


Figura 10. Enriquecimiento de términos de ontología génica asociados a procesos biológicos de las proteínas que interactúan con OSCsp nativa en el LCR. Los términos fueron seleccionados en base a su tasa de falso descubrimiento (*False Discovery Rate*, FDR) y clasificados en base a su tasa de enriquecimiento (*Fold Enrichment*).

Enrichment FDR	Genes	Pathway Genes	Fold Enrichment	Pathway	Genes
3.65E-05	3	5	208.249	GO:1905918 reg. of CoA-transferase activity	AGT; APOA4; APOA1
4.76E-05	3	6	173.5408	GO:0034372 very-low-density lipoprotein particle remodeling	APOA5; APOA4; APOA1
3.65E-05	4	18	77.12925	GO:0034368 protein-lipid complex remodeling	APOB; APOA5; APOA4; APOA1
3.19E-05	6	72	28.92347	GO:0010951 negative reg. of endopeptidase activity	ITIH2; OVAL; THBS1; GAPDH; SERPIND1; VTN
4.86E-06	8	126	22.03693	GO:0051346 negative reg. of hydrolase activity	SPRY1; ITIH2; OVAL; THBS1; GAPDH; SERPIND1; APOA1; VTN
8.94E-05	6	119	17.49991	GO:0007160 cell-matrix adhesion	FN1; FGG; THBS1; JUP; VTN; ACTG1
8.94E-05	7	191	12.72027	GO:0006869 lipid transport	NPC2; APOB; RBP4A; THBS1; APOA5; APOA4; APOA1
8.94E-05	7	198	12.27056	GO:0010631 epithelial cell migration	EGF; AGT; THBS1; JUP; MTOR; APOA1; FSTL1
3.35E-05	9	279	11.19618	GO:0001667 amoeboid-type cell migration	EGF; CDH2; AGT; FN1; THBS1; JUP; MTOR; APOA1; FSTL1
3.65E-05	9	301	10.37786	GO:0043086 negative reg. of catalytic activity	SPRY1; ITIH2; AGT; OVAL; THBS1; GAPDH; SERPIND1; APOA1; VTN
3.19E-05	11	448	8.522094	GO:0051336 reg. of hydrolase activity	SPRY1; ITIH2; OVAL; THBS1; MTOR; GAPDH; SERPIND1; APOA5; APOA4; APOA1; VTN
6.16E-05	14	1017	4.777918	GO:0050790 reg. of catalytic activity	EGF; SPRY1; ITIH2; AGT; CLU; OVAL; THBS1; MTOR; GAPDH; SERPIND1; APOA5; APOA4; APOA1; VTN
3.80E-05	20	2036	3.409446	GO:0065008 reg. of biological quality	CDH2; TTR; PLG; AGT; APOB; CLU; OVAL; FN1; FGG; PEX6; RBP4A; THBS1; JUP; MTOR; GAPDH; SERPIND1; APOA5; APOA4; APOA1; FSTL1

Tabla 6. Proteínas interactoras de OSCsp nativa clasificadas según términos de ontología génica asociados a procesos biológicos. Los términos fueron seleccionados en base a su tasa de falso descubrimiento (*False Discovery Rate*, FDR) y clasificados en base a su tasa de enriquecimiento (*Fold Enrichment*).

Al igual que los GO enriquecidos para proceso biológico, entre los términos enriquecidos asociados a componente celular (Figura 11) se observó la presencia de termino relacionados con la presencia de lipoproteínas, como son el termino quilomicrón (*chylomicron*, GO:0042627), partícula de lipoproteína de alta densidad (*high-density lipoprotein particle*, GO:0034364), partícula de lipoproteína plasmática (*plasma lipoprotein particle*, GO:0034358). Otros términos similares a los observados en el enriquecimiento de términos asociados a componente celular son los relacionados con la matriz extracelular e interacción con componentes de la membrana celular, como son los términos de espacio extracelular (*extracellular space*, GO:0005615), matriz extracelular que contiene colágeno (*collagen-containing extracellular matrix*, GO:0062023), región extracelular (*extracellular region*, GO:0005576), matriz extracelular (*extracellular matrix*, GO:0031012), complejos de catenina (*catenin complex*, GO:0016342) y superficie celular (*cell surface*, GO:0009986). La presencia de múltiples términos sugiere, además, la presencia de proteínas asociadas a vesículas dentro de las proteínas que interaccionan con OSCsp nativa, como son los términos de vesícula extracelular (*extracellular vesicle*, GO:1903561), vesículas fagocíticas (*phagocytic vesicle*, GO:0045335), vesículas endocíticas (*endocytic vesicle*, GO:0030139) y vesículas en general (*vesicle*, GO:0031982). Además, se observó la presencia de términos asociados a proteínas que participación en la formación de complejos macromoleculares, como son los términos de complejos de fibrina (*fibrinogen complex*, GO:0005577), gránulo de plaqueta alfa (*platelet alpha granule*, GO:0031091) y complejos proteicos (*protein-containing complex*, GO:0032991).

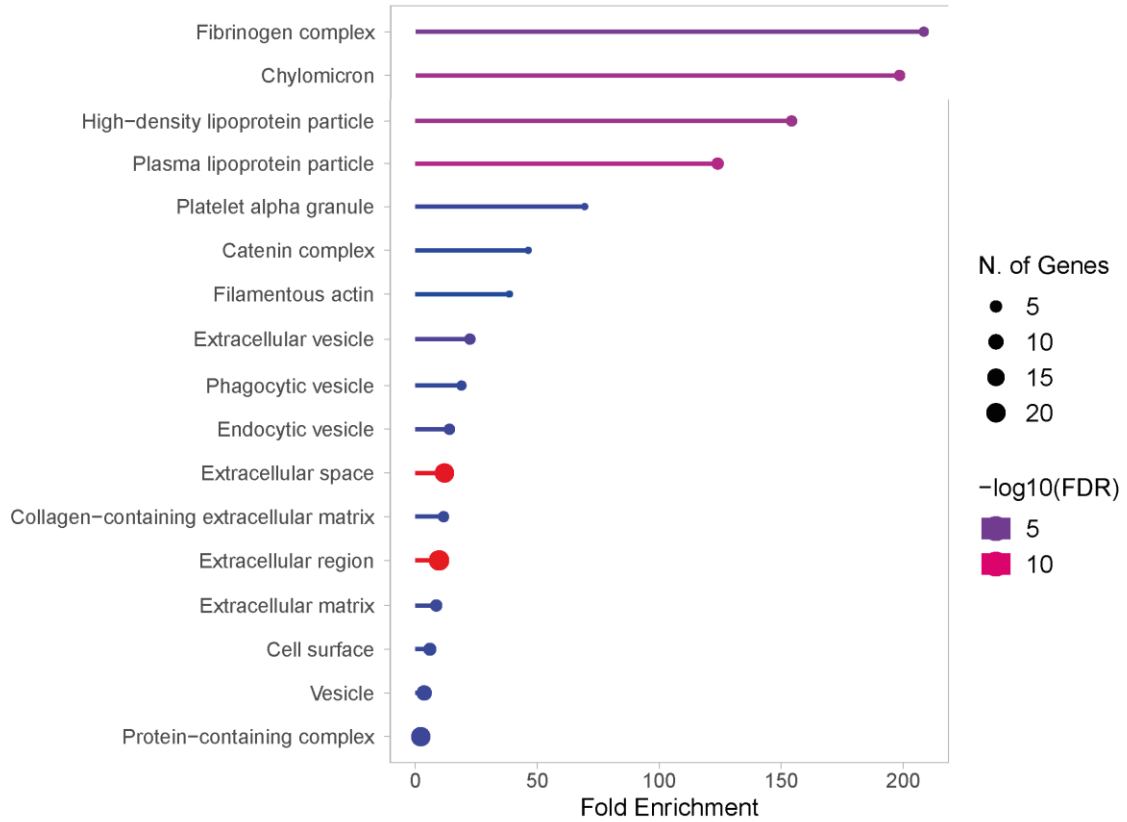


Figura 11. Enriquecimiento de términos de ontología génica asociados a componente celular de las proteínas que interaccionan con OSCsp nativa en el LCR. Los términos fueron seleccionados en base a su tasa de falso descubrimiento (*False Discovery Rate*, FDR) y clasificados en base a su tasa de enriquecimiento (*Fold Enrichment*).

Enrichment FDR	Genes	Pathway Genes	Fold Enrichment	Pathway	Genes
4.50E-06	3	5	208.249	GO:0005577 fibrinogen complex	FN1; FGG; THBS1
7.08E-08	4	7	198.3324	GO:0042627 chylomicron	APOB; APOA5; APOA4; APOA1
1.69E-07	4	9	154.2585	GO:0034364 high-density lipoprotein particle	CLU; APOA5; APOA4; APOA1
1.59E-08	5	14	123.9577	GO:0034358 plasma lipoprotein particle	APOB; CLU; APOA5; APOA4; APOA1
0.003624	2	10	69.41633	GO:0031091 platelet alpha granule	FGG; THBS1
0.006982	2	15	46.27755	GO:0016342 catenin complex	CDH2; JUP
0.009713	2	18	38.56463	GO:0031941 filamentous actin	ACTG1; SPECC1
0.000489	4	62	22.39236	GO:1903561 extracellular vesicle	EGF; FN1; RBP4A; ACTG1
0.004638	3	55	18.93173	GO:0045335 phagocytic vesicle	OVAL; MTOR; ACTG1
0.002379	4	99	14.0235	GO:0030139 endocytic vesicle	OVAL; MTOR; APOA1; ACTG1
3.83E-15	20	581	11.94773	GO:0005615 extracellular space	EGF; TTR; PLG; AGT; APOB; SOD3; CLU; OVAL; LYZ; FN1; LUM; FGG; RBP4A; THBS1; SERPIND1; APOA5; APOA4; APOA1; VTN; ACTG1
0.003741	4	120	11.56939	GO:0062023 collagen-containing extracellular matrix	SOD3; FN1; LUM; VTN
1.33E-15	23	819	9.747103	GO:0005576 extracellular region	EGF; NPC2; ITIH2; TTR; PLG; AGT; APOB; SOD3; CLU; OVAL; LYZ; FN1; LUM; FGG; RBP4A; THBS1; SERPIND1; APOA5; APOA4; APOA1; PTGDS; VTN; ACTG1
0.003133	5	202	8.59113	GO:0031012 extracellular matrix	SOD3; FN1; LUM; THBS1; VTN
0.004277	6	348	5.984166	GO:0009986 cell surface	CDH2; CLU; FN1; FGG; THBS1; APOA4
0.003459	10	954	3.638172	GO:0031982 vesicle	EGF; TTR; OVAL; FN1; FGG; RBP4A; THBS1; MTOR; APOA1; ACTG1
0.002379	20	3101	2.238514	GO:0032991 protein-containing complex	CDH2; TTR; APOB; CLU; FN1; LUM; FGG; HBZ; THBS1; JUP; MTOR; GAPDH; ARMC8; APOA5; APOA4; APOA1; RBM3; VTN; ACTG1; SPECC1

Tabla 7. Proteínas interactoras de OSCsp nativa clasificadas según términos de ontología génica asociados a componente celular. Los términos fueron seleccionados en base a su tasa de falso descubrimiento (*False Discovery Rate*, FDR) y clasificados en base a su tasa de enriquecimiento (*Fold Enrichment*).

De forma similar al enriquecimiento observado en términos asociados a procesos biológicos y componente celular, los términos asociados a función molecular (Figura 12) indican la presencia de proteínas asociadas a la presencia de lipoproteínas, de proteínas con función reguladora de la actividad catalítica de otras, de proteínas asociadas a la matriz extracelular y la membrana celular. Además, se observan otros términos que sugieren la presencia de interacciones con OSCsp nativa a través de glicosilaciones, como son los términos de unión a heparina (*heparin binding*, GO:0008201), unión a glucosaminoglicanos (*glycosaminoglycan binding*, GO:0005539) y unión a derivados de carbohidratos (*carbohydrate derivative binding*, GO:0097367).

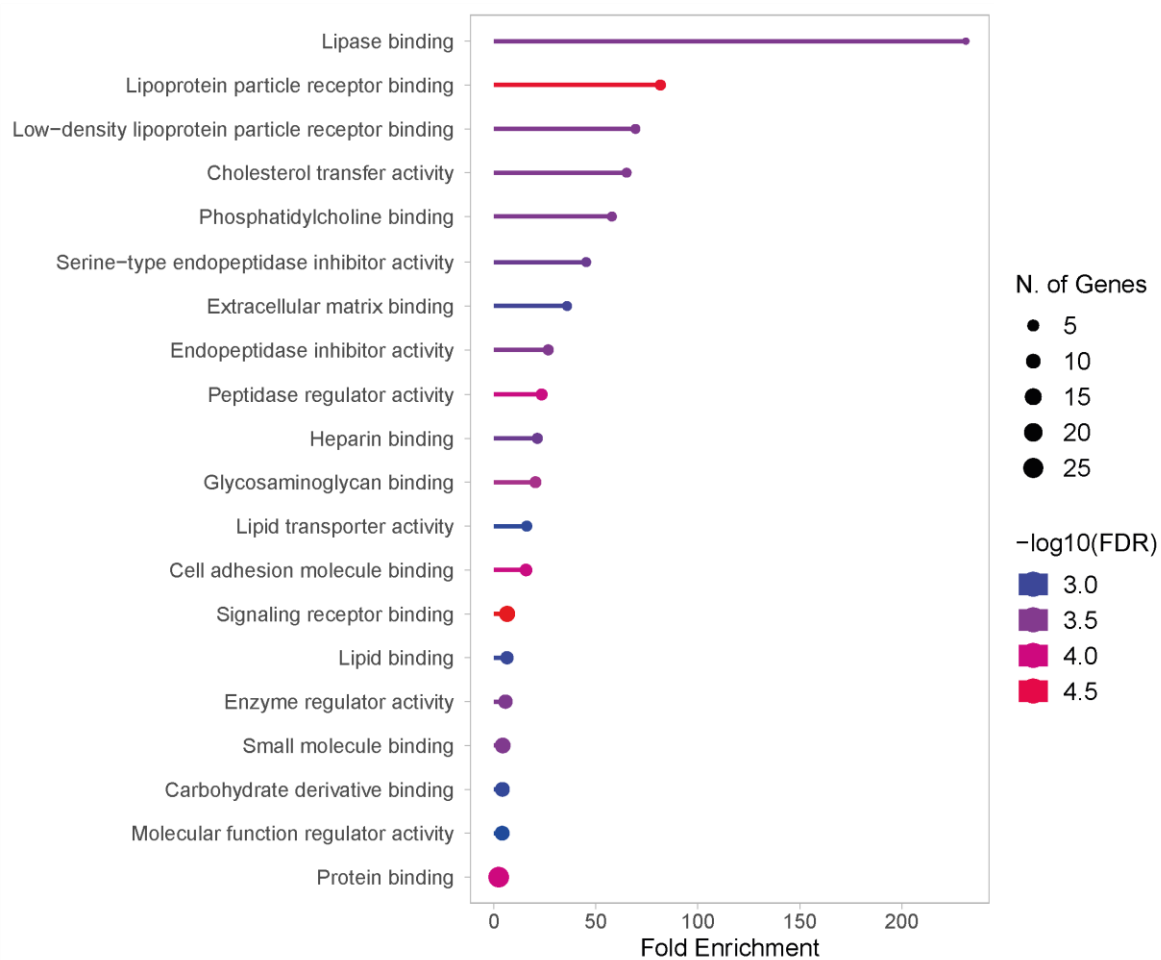


Figura 12. Enriquecimiento de términos de ontología génica asociados a función molecular de las proteínas que interactúan con OSCsp nativa en el LCR. Los términos fueron seleccionados en base a su tasa de falso descubrimiento (*False Discovery Rate*, FDR) y clasificados en base a su tasa de enriquecimiento (*Fold Enrichment*).

Enrichment FDR	Genes	Pathway Genes	Fold Enrichment	Pathway	Genes
0.00035	2	3	231.3878	GO:0035473 lipase binding	APOB; APOA5
1.72E-05	4	17	81.66627	GO:0070325 lipoprotein particle receptor binding	APOB; CLU; APOA5; APOA1
0.00033	3	15	69.41633	GO:0050750 low-density lipoprotein particle receptor binding	APOB; CLU; APOA5
0.00033	3	16	65.07781	GO:0120020 cholesterol transfer activity	APOB; APOA4; APOA1
0.000343	3	18	57.84694	GO:0031210 phosphatidylcholine binding	APOA5; APOA4; APOA1
0.000466	3	23	45.27152	GO:0004867 serine-type endopeptidase inhibitor activity	ITIH2; OVAL; SERPIND1
0.000905	3	29	35.905	GO:0050840 extracellular matrix binding	CDH2; THBS1; VTN
0.00033	4	52	26.69859	GO:0004866 endopeptidase inhibitor activity	ITIH2; OVAL; GAPDH; SERPIND1
0.000109	5	74	23.45146	GO:0061134 peptidase regulator activity	ITIH2; OVAL; FN1; GAPDH; SERPIND1
0.000465	4	65	21.35887	GO:0008201 heparin binding	APOB; FN1; THBS1; APOA5
0.000181	5	85	20.41657	GO:0005539 glycosaminoglycan binding	ITIH2; APOB; FN1; THBS1; APOA5
0.001104	4	86	16.14333	GO:0005319 lipid transporter activity	APOB; RBP4A; APOA4; APOA1
0.000109	6	132	15.77644	GO:0050839 cell adhesion molecule binding	CDH2; FN1; FGG; THBS1; JUP; VTN
1.20E-05	13	690	6.539219	GO:0005102 signaling receptor binding	EGF; TTR; PLG; AGT; APOB; CLU; FN1; FGG; RBP4A; THBS1; APOA5; APOA1; VTN
0.001045	7	376	6.461626	GO:0008289 lipid binding	GC; APOB; RBP4A; THBS1; APOA5; APOA4; APOA1
0.000348	9	548	5.700246	GO:0030234 enzyme regulator activity	EGF; ITIH2; OVAL; FN1; GAPDH; SERPIND1; APOA5; APOA4; APOA1
0.00033	12	951	4.379579	GO:0036094 small molecule binding	EEF1A1; GC; TTR; PEX6; HBZ; RBP4A; MTOR; GAPDH; APOA1; PTGDS; ACTG1
0.001084	10	827	4.196876	GO:0097367 carbohydrate derivative binding	EEF1A1; ITIH2; APOB; FN1; PEX6; THBS1; MTOR; APOA5; ACTG1
0.001215	10	847	4.097776	GO:0098772 molecular function regulator activity	EGF; ITIH2; TTR; OVAL; FN1; GAPDH; SERPIND1; APOA5; APOA4; APOA1
0.0001	27	3924	2.388176	GO:0005515 protein binding	PLPP4; MDFIC; EEF1A1; EGF; GC; CDH2; TTR; PLG; AGT; APOB; CLU; OVAL; LYZ; FN1; FGG; PEX6; HBZ; RBP4A; THBS1; JUP; MTOR; GAPDH; APOA5; APOA4; APOA1; VTN; ACTG1

Tabla 8. Proteínas interactoras de OSCsp nativa en el LCR clasificados según términos de ontología génica asociados a función molecular. Los términos fueron seleccionados en base a su tasa de falso descubrimiento (*False Discovery Rate*, FDR) y clasificados en base a su tasa de enriquecimiento (*Fold Enrichment*).

Tomando los términos enriquecidos asociados a las tres categorías revisadas, se sugiere por tanto que OSCsp estaría uniendo diversos tipos de partículas extracelulares y morfógenos presentes en el LCR_e, junto a componentes estructurales de la matriz extracelular y a la membrana plasmática de las células neuroepiteliales en contacto con el LCR_e, formando complejos con proteínas de LCR_e y regulando la actividad de enzimas catalíticas. Además, la presencia de glicoproteínas y proteínas de unión a GAGs como FSTL1, FN1, VTN, ITIH2 y SERPIND1 sugiere algún tipo de mecanismo de unión a estructuras glicosiladas por parte de OSCsp nativa.

- 1.2. Identificar las proteínas interactoras de la región C-terminal de OSCsp producida de manera recombinante, mediante la exposición *in vitro* al LCRE y purificación de los complejos formados seguido de análisis por espectrometría de masas.

Confirmada la capacidad de OSCsp nativa para interactuar con componentes del LCRE, se planteó la pregunta sobre que función cumple su región C-terminal en este proceso. Para caracterizar dicha función, se generó un vector diseñado para secretar la región C-terminal de OSCsp hacia el medio extracelular tras su transfección en células (Figura 13). La construcción del vector implicó la amplificación de la secuencia codificante de la región C-terminal de OSCsp (TSR27, vWC7 y CTCK) desde el vector donante pD441 C-term OSCsp (ATUM, EE. UU.) mediante PCR, utilizando partidores con sitios de corte para las enzimas HindIII y XhoI. Tanto la secuencia amplificada como el vector receptor pSecTag2A fueron digeridos con estas enzimas y posteriormente ligados para obtener el vector pSecTag2A C-term OSCsp.

El vector pSecTag2A C-term OSCsp permite la expresión de la región C-terminal de OSCsp fusionada a los epítopes c-myc y cola de histidinas (6xHis), bajo el control del promotor de CMV). Estos epítopes permiten facilitar la posterior identificación y purificación de la proteína recombinante. Por tanto, la proteína recombinante se encuentra compuesta de una secuencia de exporte extracelular, los últimos 281 aminoácidos del extremo C-terminal de OSCsp y los epítopes cmyc y cola de histidinas (6xHis). Esto resulta en una proteína de 338 aminoácidos (masa molecular de 37.067 Dalton), con un punto isoeléctrico de 5.83 y un índice de inestabilidad de 77,4% analizado por ProtParam (Expasy) (Gasteiger et al., 2005) por la presencia de un 10,4% de cisteínas y 10,7% de prolinas en su secuencia.

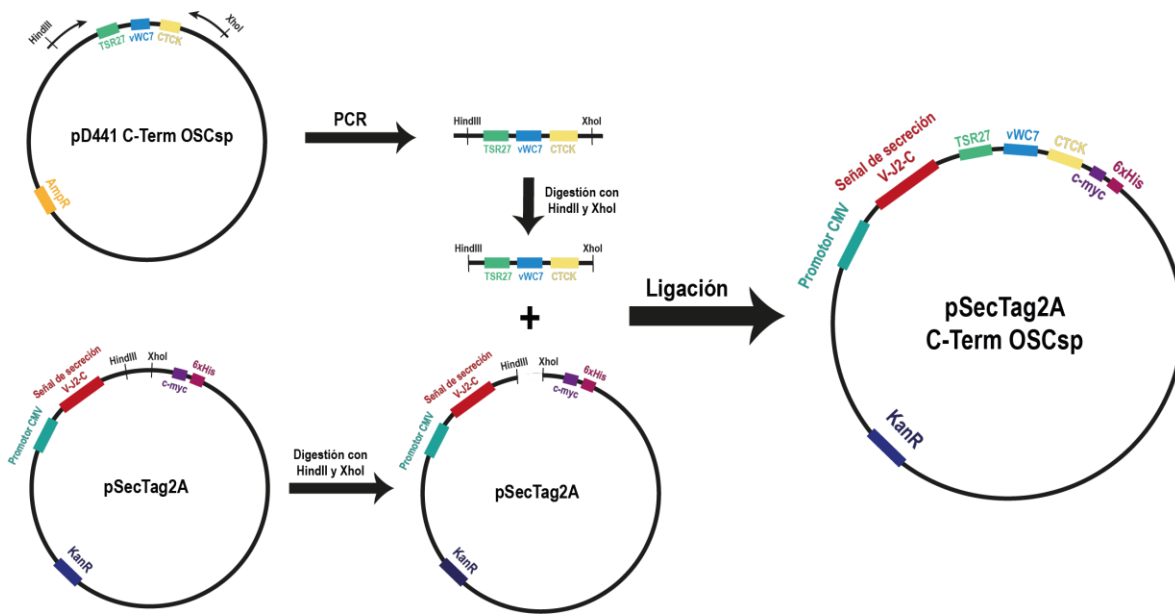


Figura 13. Construcción del vector de expresión en células de mamífero pSecTag2A C-term OSCsp, para liberación de la región C-terminal de OSCsp hacia el medio extracelular. La secuencia codificante de los dominios TSR27, vWC7 y CTCK de la región C-terminal de OSCsp fueron amplificadas por PCR desde el plásmido pD441 C-term OSCsp, digeridos e insertados en el vector pSecTag2A.

Para evaluar la expresión y liberación de la región C-terminal de OSCsp hacia el medio extracelular, el vector diseñado fue utilizado para transfectar células HEK 293T y evaluar la cinética de producción de esta proteína hacia el sobrenadante de cultivo a lo largo del tiempo. Se analizó la presencia de la proteína recombinante en los sobrenadantes mediante western blot empleando un anticuerpo contra el epítipo 6xHis (Figura 14). Se observó la presencia de una única banda de masa molecular cercana a 50 KDa, que comienza a ser liberada hacia el sobrenadante de cultivo 24 horas tras la transfección y mantuvo niveles aparentemente constantes en el tiempo. Debido a que la proteína recombinante presentó una masa mayor a la esperada, esto se atribuyó a modificaciones post-traduccionales, ya que los anticuerpos monoclonales contra epítopes presentan una alta especificidad.

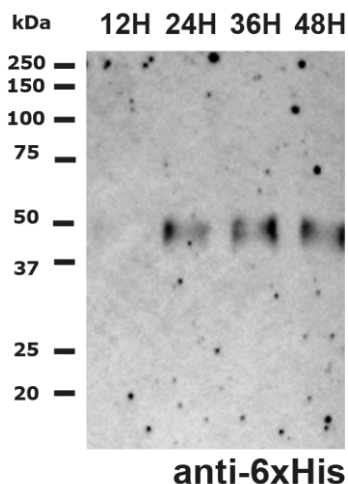


Figura 14. Cinética de liberación de la región C-terminal de OSCsp recombinante hacia el medio extracelular de células HEK293T transfectadas con el vector pSecTag2A C-term OSCsp. Los sobrenadantes post transfección a las 12, 24, 36 y 48 horas fueron analizados mediante western blot empleando un anticuerpo contra el epítipo de histidinas (6xHis) presente en la región C-terminal de OSCsp recombinante diseñada.

Con el fin de evaluar la eficiencia de la transfección en los ensayos *in vitro*, y de la electroporación en los ensayos *in vivo*, se buscó diseñar un nuevo vector que además de la proteína de interés, generara un reporte fluorescente. Para ello se diseñó una estrategia de subclonamiento en el vector bistrónico pIRES DsRed2, la cual permite la expresión de la región C-terminal de OSCsp con la señal de exporte y los epítopos 6xHis y cmc, y la expresión de la proteína fluorescente roja (*Red Fluorescent Protein*, RFP) en un marco de lectura separado (ambos dependientes de un único promotor de CMV) (Figura 15). Para esto, se diseñaron partidores para la secuencia ubicada río arriba del codón de inicio y río abajo del epítipo 6xHis del vector pSecTag2A C-term OSCsp, con sitios de corte para EcoRI y BamHI. Después de realizar la PCR, se digirieron tanto el amplicón generado como el vector pIRES DsRed2 con estas enzimas y luego se ligaron. De esta forma, se creó el vector pIRES C-term OSCsp, que permite la expresión bistrónica de la región C-terminal de OSCsp recombinante junto con la proteína RFP.

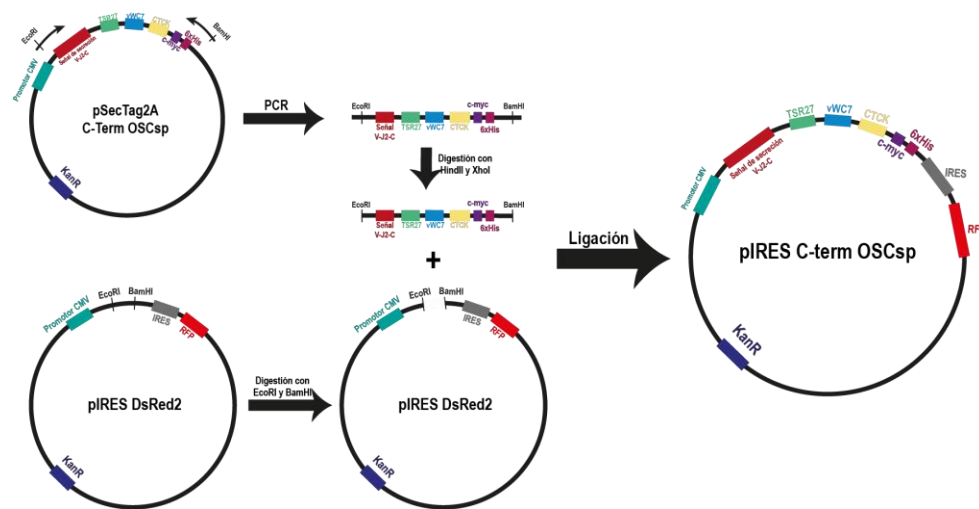


Figura 15. Construcción de un vector de expresión en células de mamífero biscistrónico para la liberación de la región C-terminal de OSCsp y la proteína fluorescente roja (RFP). La secuencia codificante de la región C-terminal de OSCsp y sus epítopes fue amplificada por PCR desde el vector pSecTag2A C-term OSCsp, digeridos e insertados en el vector pIRES DsRed2.

Para corroborar el correcto ensamblaje del vector y asegurar que los elementos codificados se traduzcan adecuadamente, se realizó una transfección de células HEK 293T seguida de una inmunofluorescencia utilizando anticuerpos contra OSCsp nativa y el epítipo 6xHis (Figura 16A). Como se observa en la figura, las células transfectadas pueden ser identificadas por la presencia de RFP. Para determinar si la región C-terminal de OSCsp se está produciendo en un marco de lectura correcto, se empleó un anticuerpo policlonal contra OSCsp nativa (AFRU16), el cual reconoce una gran población de células transfectadas. De igual manera, se utilizó un anticuerpo monoclonal contra el epítipo de 6xHis, permitiendo corroborar el ensamblaje correcto de la proteína recombinante y proporcionando una mayor sensibilidad en la detección de la proteína recombinante, incluso en células levemente transfectadas. La capacidad de producir y liberar la región C-terminal de OSCsp hacia la sobrenadante post-transfección fue corroborada mediante western blot contra el epítipo de 6xHis (Figura 16B).

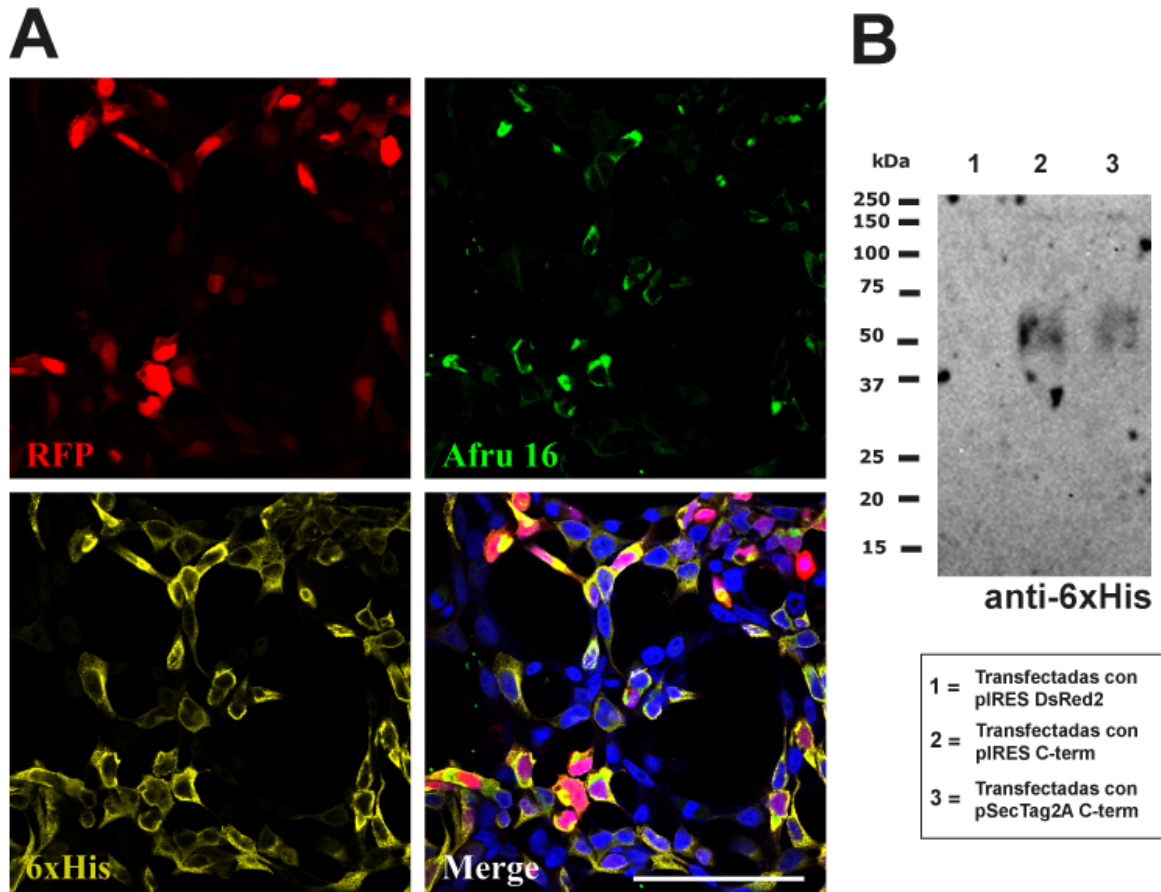


Figura 16. Expresión de la región C-terminal de OSCsp en células HEK293T transfectadas con el vector pIRES C-term OSCsp. (A) La expresión de los elementos diseñados en fue corroborada mediante inmunofluorescencia de las células HEK293T transfectadas con el vector pIRES C-term OSCsp, detectando el RFP biscistronico, inmunoreactividad contra OSCsp nativa (Afru 16) y contra el epítotope de histidinas (6xhistidine), así como el expote de la región C-terminal de OSCsp hacia el medio de cultivo post-transfección (B). Barra de tamaño: 100 μ m.

Dado que la región C-terminal de OSCsp recombinante presenta un tamaño mayor al esperado, se planteó la posibilidad de que existan modificaciones post-traduccionales que aumenten su tamaño, especialmente glicosilaciones, ya que estas han sido descritas en OSCsp nativa (Didier et al., 2000; Vio et al., 2008). Para corroborar esto, se realizó un tratamiento con N-Glicosilasa F (*Peptide N-glycosilase F*, PNGase F), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Tras la deglicosilación, se observó una banda con el tamaño teórico esperado para la proteína recombinante de ≈ 37 KDa y una segunda banda de menor intensidad de ≈ 20 KDa mediante western blot contra el epítipo 6xHis (Figura 17A). La estructura terciaria de la región C-terminal de OSCsp recombinante se predijo empleando la herramienta bioinformática AlphaFold2 (Jumper et al., 2021), y los posibles sitios de N-glicosilación fueron predichos mediante N-GlycoSite (M. Zhang, 2004) y visualizados en Pymol (Figura 17B). La estructura predicha presenta los dominios modulares TSR27, vWC7 y CTCK, con alta similitud con dominios similares presentes en otras proteínas matricelulares (Sepúlveda et al., 2021). Además, se identificaron cuatro sitios putativos N-glicosilables dentro de la estructura de la proteína recombinante. Ya que, los sitios putativos de N-glicosilación N86 y N104 se encuentran en loops abiertos entre los dominios TSR27 y vWC7, su deglicosilación podría exponer residuos dentro del loop a proteasas presentes en el sobrenadante post-transfección. Además de presentar N-glicosilaciones, la región C-terminal de OSCsp puede encontrarse de forma monomérica o dimérica, como se observó al realizar una electroforesis con un tampón de carga denaturante con 200 mM DTT y uno no denaturante sin DTT (Figura 17C). La estructura predicha mediante AlphaFold2 para un posible homodímero, sugiere que los dominios CTCK son los que responsables de la dimerización de la estructura (Figura 17D), en concordancia con la función de este dominio en otras proteínas como las mucinas y factor de von Willebrand (*von Willebrand factor*, vWF) (Javitt et al., 2020; Zhou et al., 2012).

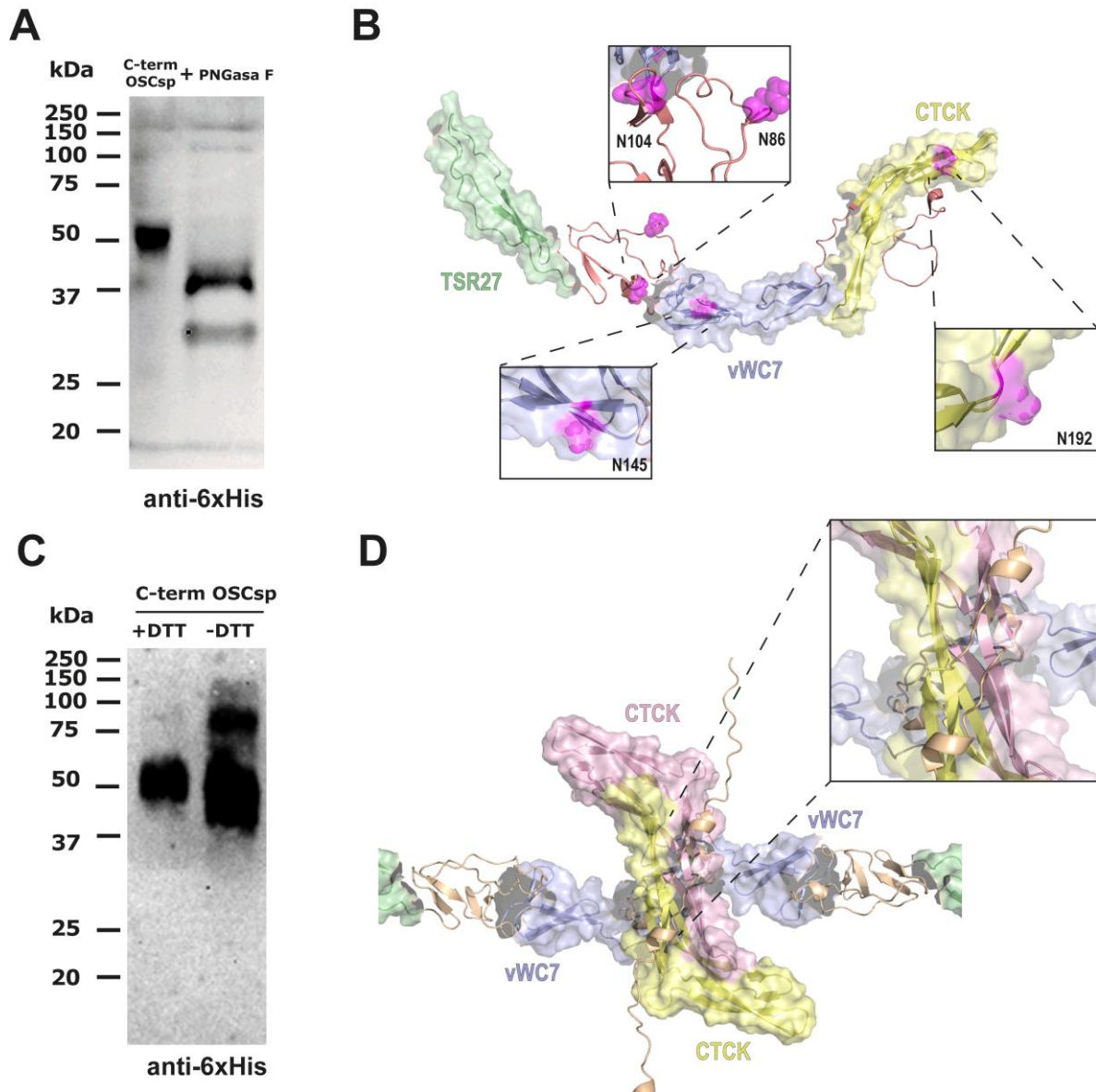


Figura 17. Modificaciones post-traduccionales de la región C-terminal de OSCsp. (A) Western blot de la región C-terminal de OSCsp tratada con PNGasa F. (B) Modelamiento molecular de la región C-terminal de OSCsp con los sitios glicosilables predichos por la herramienta bioinformática N-GlycoSite (M. Zhang, 2004) (C) Western blot de la región C-terminal de OSCsp bajo condición nativa y denaturante. (D) Modelamiento molecular del dimero putativo de la región C-terminal de OSCsp.

Una vez confirmada la identidad de la proteína recombinante, el sobrenadante de cultivo post-transfección con el vector pIRES C-term OSCsp fue concentrado empleando filtros de centrifugación Amicon (Millipore), de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. El sobrenadante concentrado se utilizó en un ensayo de pulldown, con el fin de identificar las proteínas que interactúan con la región C-terminal de OSCsp en el LCR de *gallus gallus* HH30. Para ello, se incubó el sobrenadante concentrado con el LCR extraído y la resina ProBond (ThermoFisher Scientific) en tampón de equilibrio por duplicado. La resina quelada con níquel permitió la interacción con el epítipo 6xHis de la proteína recombinante, junto con cualquier complejo del que sea parte. Tras realizar tres lavados con tampón de equilibrio, seguidos de tres lavados con tampón de lavado que contenía 50 mM de Imidazol, las proteínas interactoras fueron eluidas utilizando un tampón con 200 mM de Imidazol. Dado que se espera que OSCsp interactúe con diferentes proteínas formando grandes complejos, estas interacciones podrían ser mayormente débiles y por tanto sensibles a altas concentraciones de Imidazol. Por este motivo, se realizaron numerosos lavados con el fin de eluir todo aquello que no esté unido a OSCsp pero con una concentración baja de imidazol, que permite mantener las interacciones relativamente débiles. Para determinar la abundancia de proteínas en diferentes fracciones del experimento, se realizó una electroforesis y tinción de plata (Pierce Silver Stain kit, Thermo Scientific) (Figura 18A). Al comparar las bandas presentes en sobrenadante concentrado y en el LCR, con las del sexto lavado (tercero con tampón de lavado con 50 mM de imidazol), se observó una clara disminución en la cantidad de proteínas tras los distintos lavados. Además, en ambas eluciones se observó una gran cantidad de bandas, algunas de las cuales no están presentes en las fracciones de lavado. La presencia de la proteína recombinante en las fracciones del sobrenadante concentrado y en las eluciones se confirmó mediante western blot, utilizando un anticuerpo contra el epítipo 6xHis (Figura 18B).

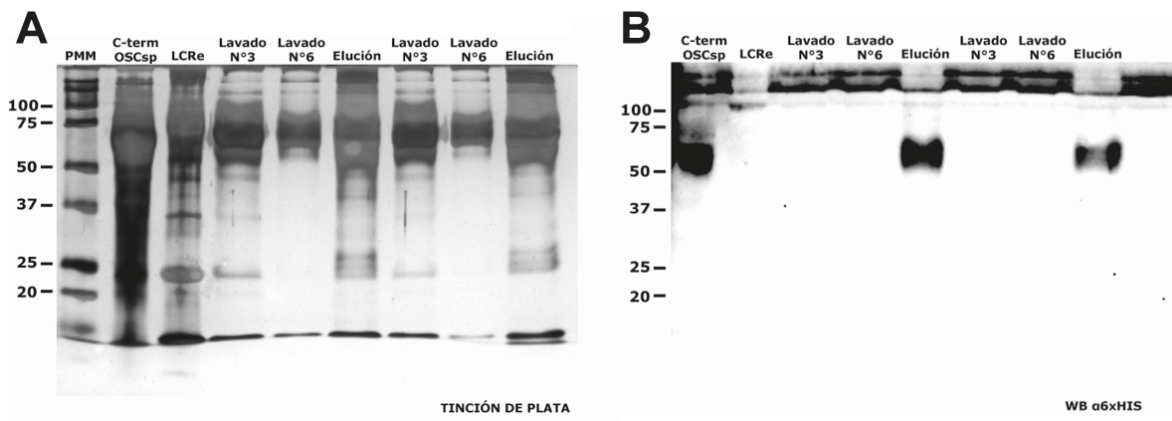


Figura 18. Pull-down de las proteínas interactoras de la región C-terminal de OSCsp. (A) Tinción de plata en gel de poliacrilamida para las fracciones obtenidas durante el proceso de purificación. (B) Western blot contra el epítipo de cola de histidina (6xHis) para las fracciones obtenidas durante el proceso de purificación.

Para identificar y comparar las distintas proteínas presentes en las fracciones eluidas, las muestras de las eluciones, lavados y LCRc de *gallus gallus* HH30 fueron analizadas mediante el sistema nanoUHPLC nanoElute acoplado a un espectrómetro de masas timsTOF Pro (Bruker Daltonics), empleando una metodología similar a la utilizada para el análisis la muestra derivada de la co-inmunoprecipitación, pero aumentando el tiempo de corrida para una mayor resolución de los peaks en el sistema HPLC. Utilizando el software Maxquants (Cox & Mann, 2008), en combinación con el programa de análisis de datos derivados de espectrometría de masa Perseus para eliminar posibles proteínas contaminantes, fue posible identificar 776 proteínas en LCRc y para cada replica 434 y 369 en el último lavado, y 596 y 623 en el eluido respectivamente.

Para comparar la abundancia de las proteínas en cada muestra, se empleó un método de cuantificación libre de marcaje (*Label-free quantification*, LFQ), que es un método de cuantificación relativa que calcula un valor entre las intensidades de todos los péptidos identificados para una proteína y los normalizados con respecto a la intensidad del ruido

presente en cada muestra (ver Método V.3). Un valor de LFQ válido para cada proteína fue solo considerado para aquellas con una intensidad mayor a la del ruido presente en la muestra. Empleando el software Perseus (Tyanova et al., 2016) para el análisis de datos derivados de espectrometría de masa, cada proteína en las cinco muestras fue filtrada en base a la cantidad de valores de LFQ válidos, debiendo presentar al menos 3 valores de LFQ válidos para ser considerada cuantificable. Para asignar un valor a las proteínas en muestras con niveles de LFQ no detectables se empleó un método de imputación, en el cual se asignan valores bajos de LFQ cuando este valor no se puede determinar, de manera que no se afecte la normalidad de los datos, obteniendo 290 proteínas cuantificables y comparables entre muestras (Figura 19).

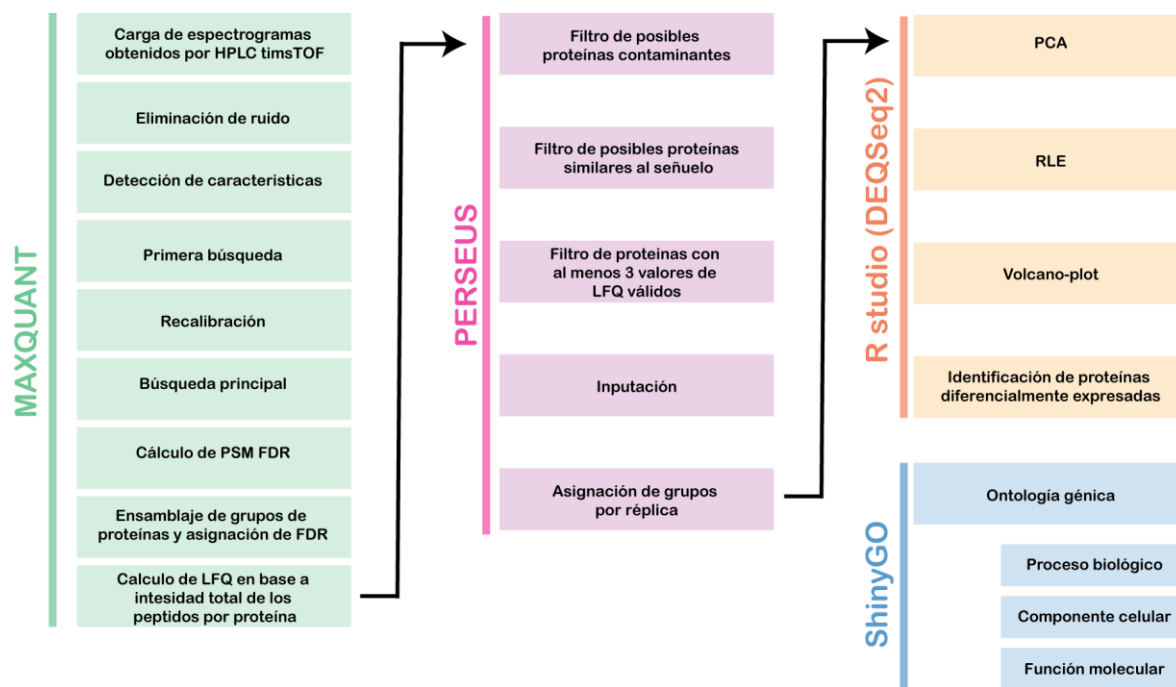


Figura 19. Análisis de los espectrogramas de masa para la identificación de proteínas que interaccionan con la región C-terminal de OSCsp recombinante.

Con el fin de evaluar la calidad de las muestras, se analizó la dispersión y homogeneidad de estas mediante la reducción de la dimensionalidad de los datos a través del análisis de expresión logarítmica relativa (*Relative log expression*, RLE) y análisis de componente principal (*Principal component analysis*, PCA). El análisis de RLE calcula la mediana de las diferencias logarítmicas entre los valores de LFQ entre las muestras y las compara con una línea de referencia fijada en 0, que representa una abundancia constante en la proteína entre las muestras. Este valor RLE se calcula para cada una de las proteínas y agrupados en una única casilla por muestra en el eje x, pudiendo observarse la desviación estándar de los datos en el eje y. En este análisis, se observa que las cinco muestras presentan una media similar debido a que los valores se encuentran normalizados al provenir de LFQ (Figura 20A), por lo que no es necesario realizar una nueva normalización. Al realizar el análisis de PCA, se observó que las muestras son heterogéneas entre ellas, y que los duplicados se agrupan en cercanía (Figura 20B), lo que demuestra reproducibilidad en la muestra, y cambios significativos en los componentes identificados. Por último, se asignaron valores de LFQ normalizados por proteína para establecer variaciones positivas o negativas en la abundancia de proteínas entre las muestras y realizar así un mapa de calor (heatmap) que muestra estos cambios de cada proteína entre las distintas muestras (Figura 20C).

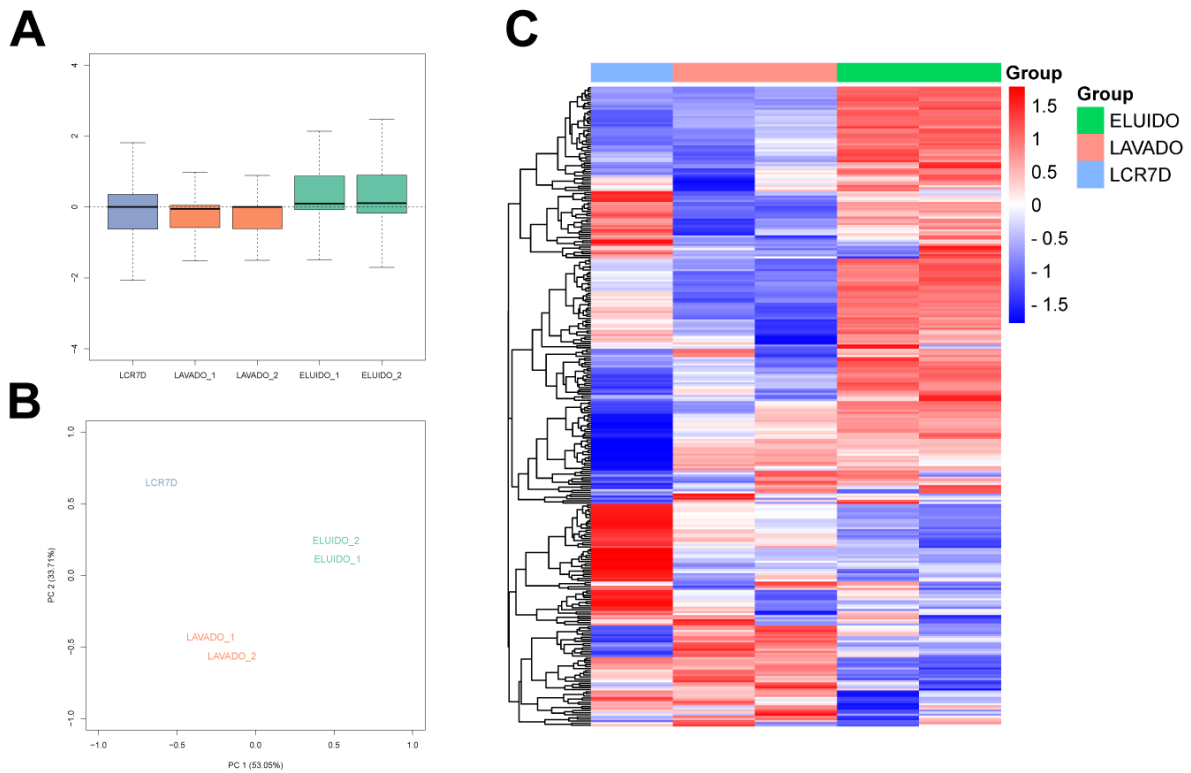


Figura 20. Análisis de los valores cuantificación LFQ para las proteínas del LCRe que interaccionan con la región C-terminal de OSCsp recombinante. Análisis bioinformático empleando el paquete DEQSeq2 en R-studio de RLE (**A**), PCA (**B**) y Heat-map (**C**) para las proteínas identificadas por espectrometría de masa de las distintas muestras.

1.3. Analizar los interactores de la región C-terminal de OSCsp mediante estudios bioinformáticos.

Producto de la gran cantidad de proteínas identificada en la muestra por el aumento de profundidad en el análisis, se identificó una población de proteínas contaminantes que no fueron eliminadas en el proceso de lavado. Para diferenciar las proteínas contaminantes de las interactores con la región C-terminal de OSCsp, se realizó un análisis de expresión diferencial empleando el paquete de DESeq de R comparando la abundancia de proteínas en el último lavado y en la elución. La expresión diferencial entre las muestras fue graficada en un volcano plot en función de su tasa de cambio y probabilidad de error (Figura 21). Las proteínas interactoras en las fracciones eluidas fueron definidas por presentar una abundancia 8 veces mayor que en las presentes en las fracciones de lavado ($\text{Log}_2(\text{FC}) > 3$, p-value 0,1). Al filtrar las proteínas en función de estos valores, se obtuvo una población de 58 proteínas identificadas como interactoras de la región C-terminal de OSCsp (tabla 9).

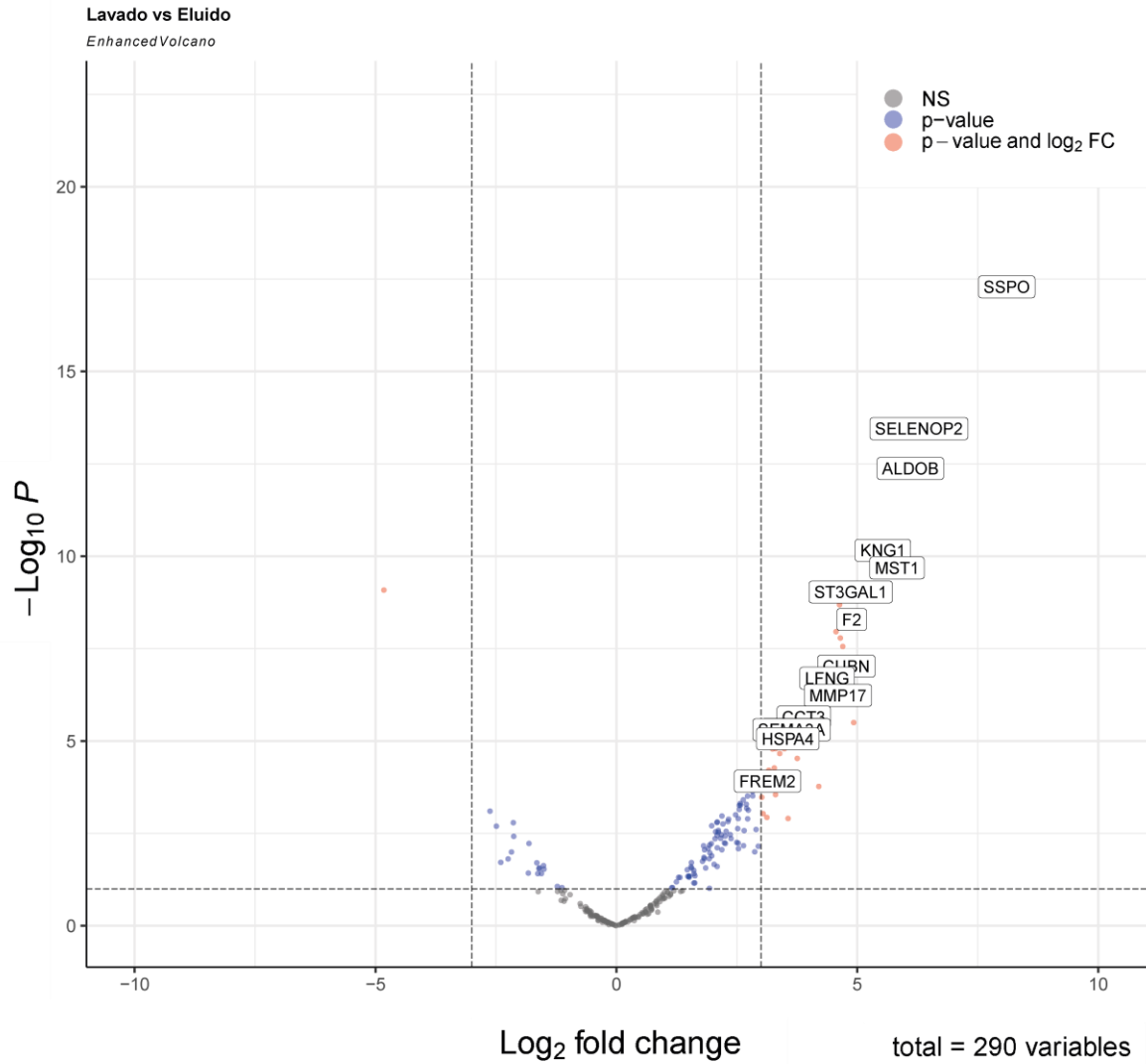


Figura 21. Análisis de volcano plot de abundancia relativa de las proteínas identificadas como interactores de la región C-terminal de OSCsp. Para el análisis de expresión diferencial se empleó el paquete DESeq2 de R- estudio de la abundancia relativa entre las fracciones del último lavado y de la elución ($\log_2(\text{FC}) > 3$, $-\log_{10}(\text{p-value}) > 1$).

	Gene name	Log (FC)	Log (CPM)	p-Value	FDR
1	SSPO	8.102	11.635	5.15E-18	1.49E-15
2	SELENOP2	6.279	12.493	3.53E-14	5.12E-12
3	ALDOB	6.102	8.906	4.22E-13	4.08E-11
4	MST1	5.823	10.353	2.07E-10	1.00E-08
5	LOC429249	5.796	9.865	6.38E-13	4.62E-11
6	KNG1	5.53	10.244	6.92E-11	4.01E-09
7	RPSA	4.958	8.456	1.50E-09	4.85E-08
8	HBA1;HBAA	4.925	8.458	3.17E-06	3.68E-05
9	F2	4.885	8.003	5.17E-09	1.36E-07
10	ST3GAL1	4.863	8.686	9.30E-10	3.37E-08
11	CUBN	4.773	8.309	9.46E-08	1.83E-06
12	EEF1A	4.698	8.099	2.76E-08	5.71E-07
13	CAT	4.648	8.77	1.63E-08	3.64E-07
14	A2ML3	4.631	8.876	2.05E-09	5.95E-08
15	MMP17	4.598	7.82	5.82E-07	8.44E-06
16	DPYS	4.558	8.782	1.10E-08	2.65E-07
17	C1QTNF3	4.461	8.532	2.19E-07	3.52E-06
18	LFNG	4.372	8.303	1.99E-07	3.52E-06
19	PPIA	4.362	8.322	1.14E-06	1.58E-05
20	CFL2	4.304	7.685	2.14E-07	3.52E-06
21	CLSTN1	4.205	6.875	4.03E-07	6.15E-06
22	HBB	4.201	7.088	0.000169	0.000892
23	MGAT2	4.049	8.273	1.68E-06	2.21E-05
24	CCT3	3.89	7.813	2.24E-06	2.82E-05
25	MAN1B1	3.869	7.995	2.33E-06	2.82E-05
26	PRPF19	3.764	7.649	5.13E-06	5.13E-05
27	IL1RL1	3.753	7.305	2.96E-05	0.000215
28	EIF4A2	3.725	7.696	5.77E-06	5.58E-05
29	ITGBL1	3.724	8.174	4.85E-06	5.13E-05
30	LOXL1	3.722	7.083	7.42E-06	6.81E-05
31	WDR1	3.709	8.031	4.83E-06	5.13E-05
32	SEMA3A	3.636	7.875	4.96E-06	5.13E-05
33	NCAN	3.571	7.912	7.52E-06	6.81E-05
34	PLTP	3.568	7.285	1.41E-05	0.000117
35	OLFM1	3.563	10.585	0.001247	0.004717

36	HSPA4	3.557	7.539	8.70E-06	7.64E-05
37	MXRA8	3.485	7.591	1.62E-05	0.000125
38	TCP1	3.443	7.926	7.27E-05	0.00049
39	PRDX4	3.424	6.842	1.21E-05	0.000103
40	TRIL	3.39	8.338	2.18E-05	0.000162
41	LOXL3	3.346	7.705	9.61E-05	0.000608
42	FASN	3.305	6.749	1.61E-05	0.000125
43	SORCS1	3.303	8.129	0.000282	0.001385
44	XXYLT1	3.277	7.515	0.000123	0.000716
45	CCT2	3.276	7.668	5.36E-05	0.000379
46	A2M	3.239	13.335	1.64E-05	0.000125
47	VWCE	3.163	7.442	6.16E-05	0.000425
48	ACLY	3.142	7.159	0.00016	0.000876
49	FREM2	3.135	6.602	0.000122	0.000716
50	NPNT	3.123	8.679	0.001166	0.004508
51	ADK	3.106	8.08	0.000185	0.000943
52	PGD	3.09	7.259	0.000172	0.000892
53	HEPH	3.073	6.761	7.86E-05	0.000518
54	CFD	3.068	7.845	0.000137	0.000779
55	IDH1	3.049	7.346	9.65E-05	0.000608
56	HMCN1	3.044	7.162	0.000921	0.003711
57	DDX39B	3.025	6.707	0.000103	0.000634
58	LAMB1	3.017	8.172	0.000332	0.001555

Tabla 9. Proteínas del LCR_e identificadas como interactoras de la región C-termina de OSC_{sp} recombinante mediante análisis de expresión diferencial entre la última fracción de lavada y fracción eluida a través de pull down. Para el análisis de expresión diferencial se empleó el paquete DEQSeq2 de R-studio de la abundancia relativa entre las fracciones del último lavado y de la elución ($\text{Log}_2(\text{FC}) > 3$, $-\text{Log}_{10}(\text{p-value}) > 1$).

Para las proteínas identificadas como interactoras de la región C-terminal de OSCsp en el LCR_e, se realizó un análisis de enriquecimiento de ontología génica, utilizando una tasa de probabilidad de falso positivo (*False Discovery Rate*, FDR) menor a 0,05. Entre los términos de ontología génica asociados a componente celular (*Cellular component*, CC) (Figura 22), se observó un enriquecimiento en el término de chaperona que contienen el complejo T (*Chaperonin-containing T-complex*, GO: 0005832), debido a la presencia de las proteínas TCP1, CCT2 y CCT3. Estas proteínas, junto con otras 4 proteínas, forman una chaperona en forma de anillo que, en conjunto con HSP70 (*Heat Shock Protein 70*), ha sido asociada a la prevención en la formación de agregados proteicos (Behrends et al., 2006; Grantham, 2020; Sot et al., 2017).

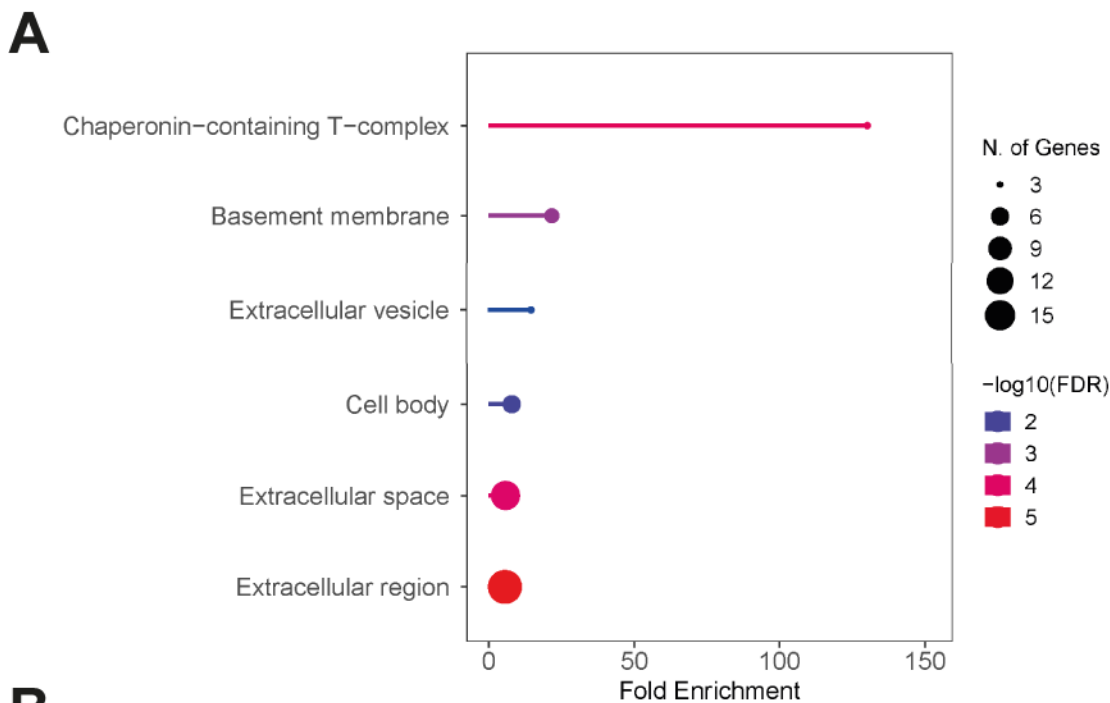
A pesar de no cumplir con los requisitos de tasa de cambio, también se observó la sobrerrepresentación de las proteínas CCT7 (Log (FC) = 2,09) y CCT8 (Log (FC) = 2,49) en la fracción de proteínas eluidas con la región C-terminal de OSCsp. La capacidad de esta región de OSCsp de formar homodímeros (Figura 17C), junto con la presencia de 5 de 7 proteínas que conforman la chaperona que contiene el complejo T y HSP4 (*Heat Shock Protein 70 member 4*), sugieren que estas proteínas se estarían uniendo a la región C-terminal de OSCsp para impedir la formación de agregados proteicos.

Como segundo término de ontología génica enriquecido, se identificó el asociado a membrana basal (*Basal membrane*, GO: 0005604), debido a la presencia de las proteínas FREM2, NPNT, LAMB1 y HMCN1 entre las proteínas que interaccionan con la región C-terminal de OSCsp. Estas proteínas comparten la característica de ser componentes estructurales de la MEC, actuando como puntos de anclaje para distintas células (Cui et al., 2024; Garis et al., 2024; Kramer et al., 1990; Pavlakis et al., 2011). Dado que estas proteínas se asocian con otros componentes estructurales, como el colágeno, es plausible que formen parte del entramado

proteico observado en la cavidad que contiene el LCR_e (A. Gato et al., 1993), permitiendo así que la región C-terminal de OSCsp se integre en esta red filamentosa.

Al igual que en el caso de proteínas que interaccionan con OSCsp nativa, se observó un enriquecimiento en el término de ontología génica asociado a vesícula extracelular (*extracellular vesicle*, GO: 1903561), atribuido a la presencia de las proteínas CUBN, ALDOB y HSPA4. Esto sugiere que la región C-terminal de OSCsp también participa en la unión a vesículas extracelulares.

Otro de los términos enriquecidos es el asociado a cuerpos celulares (*cell body*, GO: 0044297), que incluye proteínas involucradas en la formación de proyecciones de la membrana celular. Este enriquecimiento se debe a la presencia de las proteínas TCP1, CCN2 y CCN, asociadas a la presencia de chaperona que contienen el complejo T, junto con las proteínas OLFM1 y SEMA3A. La proteína OLFM1 es una glicoproteína secretada, con funciones asociadas a guía axonal (Nakaya et al., 2012), mientras que SEMA3A se ha descrito como un morfógeno presente en el LCR_e que, al interaccionar con neuropilinas, promueve la proliferación de progenitores neurales del neuroepitelio (Gerstmann et al., 2022). La interacción de la región C-terminal de OSCsp con SEMA3A podría generar consecuencias funcionales en su función morfogénica sobre el neuroepitelio.



B

Enrichment FDR	Genes	Pathway Genes	Fold Enrichment	Pathway	Genes
6.84E-05	3	7	130.16	GO:0005832 chaperonin-containing T-complex	TCP1; CCT2; CCT3
0.001193	4	56	21.69	GO:0005604 basement membrane	FREM2; NPNT; LAMB1; HMCN1
0.017822	3	62	14.69	GO:1903561 extracellular vesicle	CUBN; ALDOB; HSPA4
0.010423	5	192	7.91	GO:0044297 cell body	TCP1; SEMA3A; CCT2; CCT3; OLFM1
0.000108	11	581	5.75	GO:0005615 extracellular space	HBBA; CUBN; SEMA3A; ALDOB; LAMB1; C1QTNF3; HSPA4; PLTP; KNG1; PPIA; OLFM1
6.84E-06	15	819	5.56	GO:0005576 extracellular region	HBBA; CUBN; SEMA3A; ALDOB; NPNT; LAMB1; ST3GAL1; C1QTNF3; HSPA4; PLTP; KNG1; CLSTN1; PPIA; HMCN1; OLFM1

Figura 22. Enriquecimiento de términos de ontología génica asociados a componente celular de las proteínas que interactúan con la región C-terminal de OSCsp en el LCR. Los términos fueron seleccionados en base a su tasa de falso descubrimiento (*False Discovery Rate*, FDR) y clasificados en base a su tasa de enriquecimiento (*Fold Enrichment*).

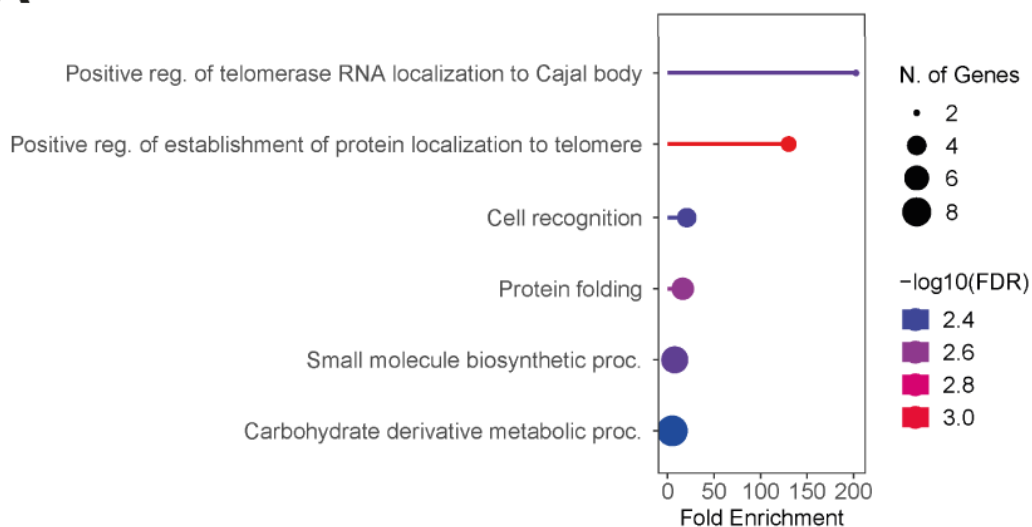
En los términos enriquecidos de ontología génica asociados a procesos biológicos (Figura 23), en primer lugar, se observó el término de la regulación positiva de la localización de la ARN telomerasa al cuerpo Cajal (*positive reg. of telomerase RNA localization to Cajal body*, GO: 1904874) y regulación positiva del establecimiento de localización de proteínas al telómero (*positive reg. of establishment of protein localization to telomere*, GO: 1904851). Estos términos están asociados a la presencia de las proteínas que componen la chaperona que contienen el complejo T, correspondiente a TCP1, CCT2 y CCT3. Estas proteínas, junto con SEMA3A, generan también un enriquecimiento en genes asociados al término de reconocimiento celular (*cell recognition*, GO: 0008037), el cual involucra proteínas que participan en los procesos mediante los que la célula interpreta su entorno.

Como se mencionó previamente, las proteínas TCP1, CCT2, CCT3 y HSPA4 actúan como chaperonas involucradas en el plegamiento de otras proteínas. Esto se refleja en el enriquecimiento del término asociado a plegamiento de proteínas (*protein folding*, GO: 0006457), en el cual también se observó la presencia de la proteína PRDX4 dentro de los interactores de la región C-terminal de OSCsp. PRDX4 es el único miembro de la familia de peroxidoxinas localizada en el retículo endoplásmico rugoso y secretado hacia el espacio extracelular (Dai et al., 2022). Esta proteína se encuentra involucrada en el plegamiento de proteínas mediante la oxidación de residuos de cisteína (Zhu et al., 2014), los cuales son abundantes en la región C-terminal de OSCsp. Dado que las proteínas con un gran porcentaje de cisteínas pueden agregarse, generando un estrés en el retículo endoplásmico, y que este estrés ha sido vinculado a la formación de agregados de PRDX4 (Elko et al., 2021), es posible que PRDX4 esté siendo liberada en forma de complejo con la región C-terminal de OSCsp.

Otro de los términos enriquecidos fue el asociado al procesamiento de moléculas pequeñas biosintéticas (*small molecule biosynthetic proc.*, GO: 0044283), el cual se atribuye a la presencia de las proteínas ALDOB, C1QTNF3, PLTP, PGD, ADK, ACLY y FASN. Todas estas proteínas participan en rutas metabólicas, ya sea como enzimas catabólicas (ALDOB, PGD, ADK, ACLY y FASN) o como regulares del metabolismo (C1QTNF3 y PLTP). La presencia de estas proteínas sugiere que la región C-terminal de OSCsp facilita la interacción de enzimas metabólicas con el entramado filamentoso identificado en la cavidad que contiene el LCRE. A pesar de ser proteínas intracelulares, se ha reportado previamente la presencia de proteínas asociadas con metabolismo y transporte intracelular en el LCRE, formando parte de aproximadamente un 15% del proteoma total del LCRE en humano, rata y ratón (Zappaterra et al., 2007).

Entre las proteínas metabólicas previamente mencionadas, ALDOB, PGD, ADK y ACLY también están asociadas con vías de procesamiento de carbohidratos. Estas proteínas, junto con XXYLT1, MGAT2, MAN1B1, ST3GAL1 y DPYS, contribuyen al enriquecimiento en el término carbohidrato derivado de proceso metabólico (*carbohydrate derivative metabolic proc.*, GO: 1901135). Estas proteínas están involucradas en procesos de glicosilación de proteínas, ya sea en su formación (MGAT2), elongación (XXYLT1), modificación (ST3GAL1) o degradación (MAN1B1). Dado que la región C-terminal de OSCsp está glicosilada (Figura 17A), una posible explicación para la presencia de estas proteínas es su asociación en el LCRE para modificar sus estructuras glicosiladas, alterando así su capacidad para interactuar con otras proteínas.

A



B

Enrichment FDR	Genes	Pathway Genes	Fold Enrichment	Pathway	Genes
0.003284	2	3	202.46	GO:1904874 positive reg. of telomerase RNA localization to Cajal body	TCP1; CCT2
0.000825	3	7	130.16	GO:1904851 positive reg. of establishment of protein localization to telomere	TCP1; CCT2; CCT3
0.003801	4	59	20.59	GO:0008037 cell recognition	TCP1; SEMA3A; CCT2; CCT3
0.002472	5	93	16.33	GO:0006457 protein folding	PRDX4; TCP1; CCT2; HSPA4; CCT3
0.003284	7	276	7.70	GO:0044283 small molecule biosynthetic proc.	ALDOB; C1QTNF3; PLTP; PGD; ADK; ACLY; FASN
0.004308	9	543	5.03	GO:1901135 carbohydrate derivative metabolic proc.	ALDOB; ST3GAL1; DPYS; PGD; XXYL1; MGAT2; ADK; ACLY; MAN1B1

Figura 23. Enriquecimiento de términos de ontología génica asociados a proceso biológico de las proteínas que interaccionan con la región C-terminal de OSCsp en el LCR. Los términos fueron seleccionados en base a su tasa de falso descubrimiento (*False Discovery Rate*, FDR) y clasificados en base a su tasa de enriquecimiento (*Fold Enrichment*).

Como era de esperarse, en el enriquecimiento de términos de ontología génica asociados con función molecular (Figura 24) se observó la presencia de los términos chaperona de plegamiento de proteínas ATP-dependiente (*ATP-dependent protein folding chaperone*, GO: 0140662) y chaperona de plegamiento de proteínas (*protein folding chaperone*, GO: 0044183), debido a la presencia de las proteínas TCP1, CCT2, CCT3 y HSPA4 entre los interactores de la región C-terminal de OSCsp.

Como tercer termino asociado a función molecular enriquecido, se identificó el termino de actividad peroxidasa (*peroxidase activity*, GO: 0004601), atribuido a la presencia de las proteínas PRDX4, HBBA y CAT. Como se mencionó anteriormente, PRDX4 oxida residuos de cisteínas para contribuir al plegamiento de proteínas (Elko et al., 2021), mientras que CAT y HBBA inhiben el daño inducido por radicales libres (Melo et al., 2024). Dado que la presencia de radicales libres puede alterar el desarrollo normal del SNC (Chung et al., 2013; Q. Wang et al., 2015), estas proteínas podrían estar formando parte de un mecanismo antioxidante en el LCR.

Como se indicó anteriormente, entre los interactores de la región C-terminal de OSCsp se encuentran proteínas involucradas en procesos de glicosilación, lo cual se evidencia por la presencia de los términos actividad UDP-glicosiltransferasa (*UDP-glycosyltransferase activity*, GO:0008194) y actividad glicosiltransferasa (*glycosyltransferase activity*, GO:0016757). Además de las proteínas mencionadas previamente MGAT, XXYL1 y ST3GAL1, también se encuentra la proteína LFNG. Esta proteína inicia la elongación de O-glicosilaciones de fructosa, un mecanismo mediante el cual se inhibe la función de Notch (Bochter et al., 2022). Dado que Notch actúa como una molécula morfogénica en el neuroepitelio (García-Lecea et al., 2008) y está presente en el epitelio del plexo coroideo que secreta componentes al LCR (Tanaka et

al., 2007), es posible que la región C-terminal de OSCsp esté anclando a LFNG para permitir la glicosilación de Notch, y, por tanto, su inhibición en el LCRE.

De manera interesante, una gran cantidad de proteínas identificadas como interactores de la región C-terminal de OSCsp presentan funciones asociada a unión a partículas pequeñas (*small molecule binding*, GO: 0036094), unión a metales (*ion binding*, GO: 0043167) y actividad catalítica (*catalytic activity*, GO: 0003824). Estas funciones son concordantes con un posible reclutamiento de otras proteínas para formar macrocomplejos en el LCRE por parte de la región C-terminal de OSCsp.

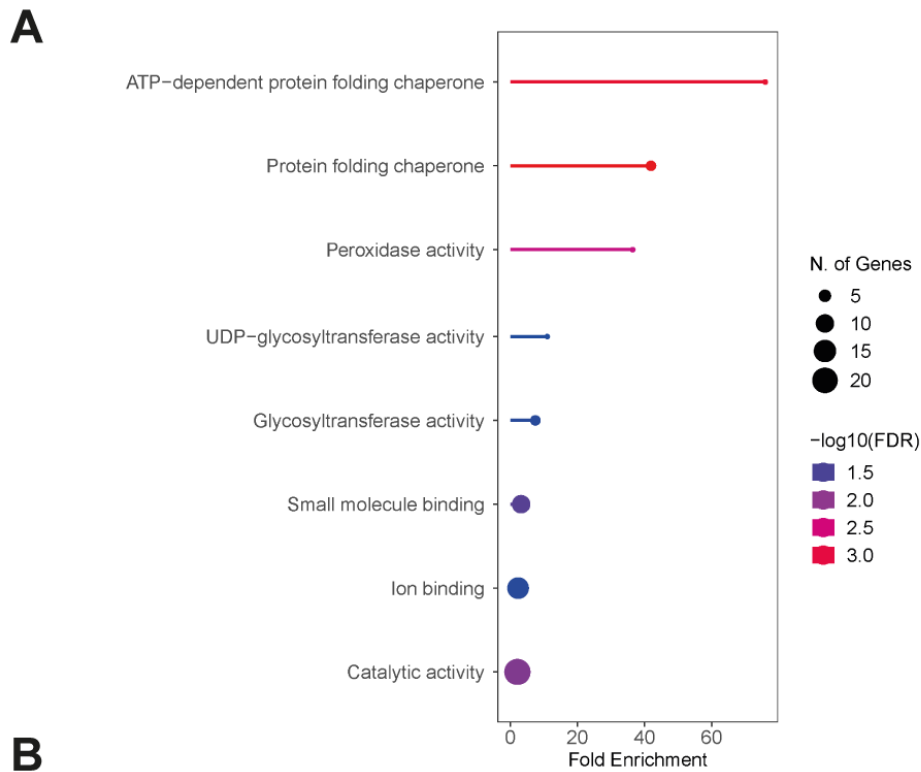


Figura 24. Enriquecimiento de términos de ontología génica asociados a función molecular de las proteínas que interactúan con la región C-terminal de OSCsp en el LCR. Los términos fueron seleccionados en base a su tasa de falso descubrimiento (*False Discovery Rate*, FDR) y clasificados en base a su tasa de enriquecimiento (*Fold Enrichment*).

2 Objetivo 2: Estudiar el efecto morfogénico de la interacción entre la región C-terminal de OSCsp con factores presentes en el LCRE en cultivo celular de línea celular de neuroblastoma (N2A).

- 2.1. Analizar el efecto de la región C-terminal de OSCsp y su interacción con componentes del LCRE sobre la proliferación de células N2A.

Dado que OSCsp nativa presenta un efecto diferenciador y anti-proliferativo sobre el neuroepitelio cuando se encuentra junto al LCRE, se buscó determinar si su región C-terminal participa en este proceso. Para esto, se empleó la línea celular N2A (Neuro-2a), derivada de un tumor de neuroblastoma de ratón. Esta línea celular ha sido ampliamente utilizada en estudios de neurodiferenciación debido a su sensibilidad a estímulos, los que gatillan cambios morfológicos asociados a un fenotipo diferenciado (D. Martín et al., 2024; Tremblay et al., 2010). Producto que existen múltiples reportes sobre el efecto proliferativo del LCRE sobre precursores neurales (A. Gato et al., 2014; Yari et al., 2013), quisimos corroborar dicho efecto sobre las células N2A, las cuales fueron tratadas con porcentajes crecientes de LCRE (Figura 25A). Además, este tratamiento fue usado como control positivo y sirvió para estandarizar y automatizar el análisis de proliferación usando el anticuerpo anti fosfo-histona H3 (pH3), un marcador de células en mitosis. Los análisis iniciales de núcleos pH3 positivos se realizaron mediante un enfoque semi-automatizado, empleando un código en el lenguaje de programación MACRO de ImageJ (Schindelin et al., 2012), que permite el recuento automatizado de núcleos (canal DAPI) en la imagen. En el caso del marcaje con DAPI, al ser una imagen con señal clara, homogénea y con poco fondo, la segmentación permitió un recuento rápido de los núcleos. Sin embargo, este enfoque no pudo ser implementado con la señal pH3 positiva, al ser una señal discreta y con mayor fondo. Por ello, se realizó un recuento manual de esta señal, verificando que correspondiera a una señal nuclear y no señal inespecífica (Figura 25B). Al graficar los efectos de porcentajes crecientes de LCRE sobre la

proliferación de las células N2A, se observó un efecto significativo sobre el porcentaje de núcleos pH3 positivos al 5% de LCRE (p-value = 0,0026). Este efecto aumentó cuando se trataron las células con un 10% de LCRE (p-value < 0,0001), concentración en la que se observa un 10% de núcleos positivos para pH3. Aunque se observó una clara tendencia del efecto proliferativo del LCRE, este enfoque tiene las desventajas de, en primer lugar, estar sesgado a la interpretación del investigador, y por tanto ser poco reproducible; y, en segundo lugar, consumir un tiempo excesivo en el análisis, ya que, para realizar este análisis en un experimento con seis condiciones realizado por triplicado, y tomando un mínimo de 8 campos por muestra, se generan un mínimo de 144 campos por experimento. Debido a estas limitaciones, se decidió realizar un análisis automatizado desarrollando un flujo de trabajo en el software Cellprofiler (Stirling, Swain-Bowden, et al., 2021), ampliamente utilizado en la industria farmacéutica para el testeo automatizado de drogas en cultivo celular (Campana et al., 2022; Sánchez-Jaramillo et al., 2022; Upendar et al., 2023). El flujo de trabajo involucró principalmente la identificación de núcleos mediante el canal DAPI, la identificación de señal pH3 positiva y recuento de la colocalización de ambas señales (Figura 25B). Bajo este enfoque automatizado se verificó el efecto proliferativo de LCRE sobre las células N2A previamente observado en el análisis semi-automatizado, con la única diferencia de que aparentemente el análisis automatizado es más sensible a la señal nuclear que es detectada como señal pH3 positiva, determinando cerca de un 15% de núcleos pH3 positivos cuando se tratan las células con un 10% de LCRE (Figura 25D).

Con el flujo de trabajo ya construido, se buscó determinar la cantidad máxima de proteína que no genera un efecto en el caso del sobrenadante post-transfección derivado del vector control pIRES DsRed2 (denominado sobrenadante control), y que si genera un efecto para el caso del sobrenadante post-transfección con el vector pIRES C-term OSCsp (denominado

sobrenadante C-term OSCsp). Para esto, ambos sobrenadantes fueron concentrados empleando un filtro por centrifugación, y luego empleados en concentraciones crecientes sobre las células N2A por 24 horas. Al comparar la cantidad de proteínas necesarias para generar un efecto sobre el porcentaje de núcleos pH3 positivos, solo el sobrenadante C-term OSCsp mostró un efecto al realizar tratamientos con 24 µg de proteína total. De ambas curvas de tratamiento podemos, por tanto, deducir que la proteína recombinante ejerce un efecto proliferativo sobre las células N2A por si sola.

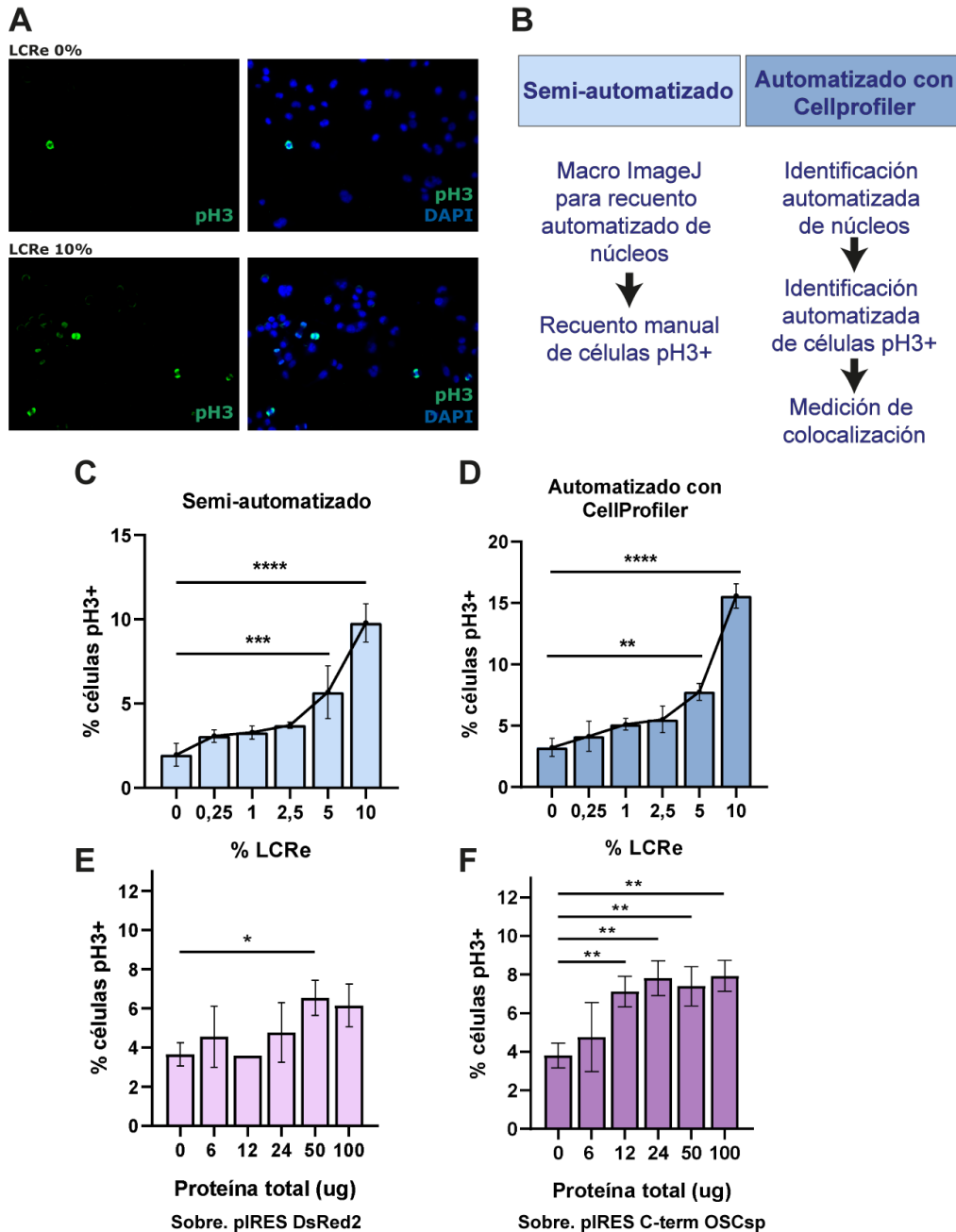


Figura 25. Análisis cuantitativo de los efectos proliferativos del LCR y sobrenadante post-transfección sobre células N2A. (A) Imágenes representativas del efecto proliferativo del LCR sobre las células N2A. **(B)** Métodos de cuantificación empleando para medir la señal pH3+ por total de núcleos por tratamiento. Curva de tratamiento con LCR para comparar los métodos de cuantificación semi-automatizados **(C)** y automatizados en la detección de núcleos pH3+ **(D)**. Efecto sobre la proliferación del sobrenadante post-transfección empleando el vector pIRES DsRed2 **(E)** y pIRES C-term OSCsp **(F)** sobre células N2A. Los datos fueron agrupados desde 10 campos en 3 experimentos independientes, desde los que se obtuvo el promedio \pm SEM. **** $p < 0,0001$; prueba One-way ANOVA.

Una vez determinado el porcentaje de LCR_e y la cantidad de proteína del concentrado obtenido de los sobrenadantes post-transfección, estos fueron empleados en combinación para el tratamiento de células N2A por 24 horas. Las células tratadas fueron fijadas y sometidas a inmunofluorescencia utilizando un anticuerpo contra β III-tubulina para analizar la forma celular y contra p_{H3} para la proliferación ejercida por los tratamientos (Figura 26A). Al graficar el porcentaje de núcleos p_{H3} positivos obtenidos con el flujo de trabajo previamente diseñado para cada tratamiento, observamos consistentemente un efecto proliferativo del LCR_e (p-value < 0,0001) y del sobrenadante C-term OSC_{sp} (p-value = 0,0007) al compararlos con la condición control tratada con medio base DMEM. Este efecto no se observó en el sobrenadante control (Figura 26B). De forma esperada, en la condición tratada con el sobrenadante control y LCR_e se observó un porcentaje de núcleos p_{H3} positivo intermedio entre cada tratamiento por separado. Sin embargo, de manera inesperada, para el tratamiento con el sobrenadante C-term OSC_{sp} en conjunto con LCR_e observamos un porcentaje de núcleos p_{H3} positivos menor que al usar ambos tratamientos por separado. Un efecto similar se ha observado al tratar explantes de mesencéfalo con LDL y OSC_{sp}, en donde observamos que el efecto diferenciador producido por ambas proteínas por separado se ve anulado cuando se trata con ambas moléculas en conjunto (Vera et al., 2015).

Al tomar imágenes después de la inmunofluorescencia, una característica inesperada que presentaban algunos campos fue la presencia de células agrupadas, especialmente en ciertas condiciones. Dado que la agrupación de células impide una segmentación correcta al realizar los análisis de forma celular, se realizó una cuantificación del número de células agrupadas por condición utilizando el software de exploración de data CellProfiler Analyst (Stirling, Carpenter, et al., 2021). Este programa permite realizar cuantificaciones mediante inteligencia artificial de aprendizaje profundo ("Deep learning") utilizando redes neuronales, las cuales

deben ser entrenadas con las imágenes obtenidas. Para el entrenamiento, se cargó la metadata del análisis de las células previamente identificadas por el software CellProfiler en el analizador, el cual va presentando distintas células identificadas en las imágenes. A través de la selección de células agrupadas, el clasificador identifica este fenotipo y genera nuevas rondas de entrenamiento con fenotipos cercanos para que el usuario delimite de mejor manera el fenotipo a analizar. Luego de 10 rondas, se generó una tabla con la cantidad de células por campo que presentan el fenotipo seleccionado, en este caso, un fenotipo agrupado. Sorprendentemente, el LCRé generó un aumento significativo en el número de células agrupadas, tanto en presencia del sobrenadante control como con sobrenadante C-term OSCsp, llegando a producir un agrupamiento del 20% de las células (Figura 26C). Este efecto hizo necesario buscar algún método para reducir o eliminar las células agrupadas y dejar solo las células aisladas para analizar su forma.

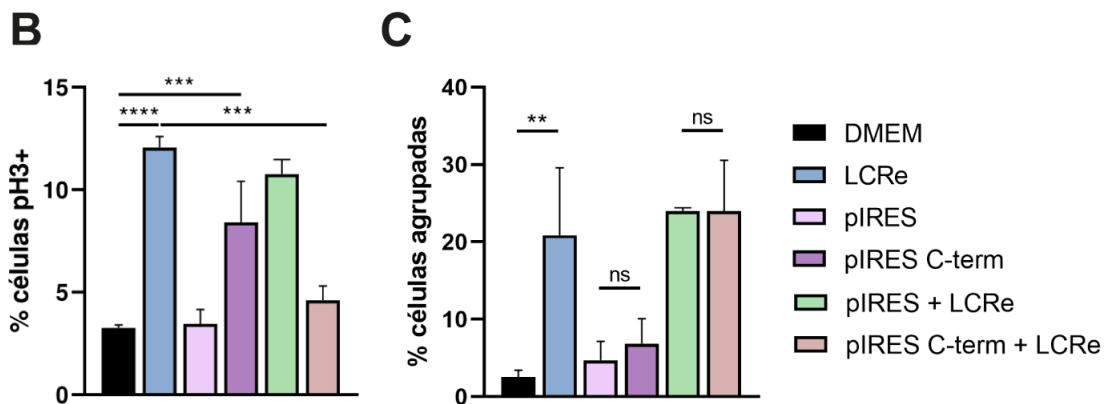
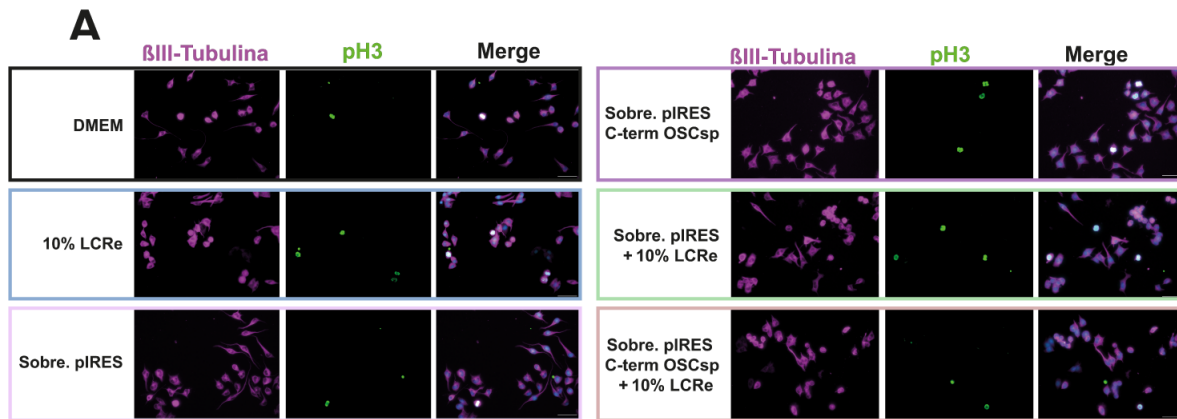


Figura 26. Efecto de la región C-terminal de OSCsp sobre la proliferación de células N2A inducida por el LCRE.

(A) Imágenes representativas de células N2A marcadas con β III-tubulina y pH3 tras los tratamientos con LCRE y sobrenadantes post-transfección concentrados. (B) Análisis automatizado del porcentaje de núcleos pH3 positivos por tratamiento, utilizando Cellprofiler. (C) Análisis mediante aprendizaje automatizado utilizando redes neuronales para determinar el porcentaje de células agrupadas por tratamiento. Los datos fueron agrupados desde 10 campos en 3 experimentos independientes, desde los que se obtuvo el promedio \pm SEM. **** $p < 0,0001$; prueba One-way ANOVA.

2.2. Analizar el efecto de la región C-terminal de OSCsp y su interacción con componentes del LCRE sobre la diferenciación de células N2A.

Una vez que se determinó que la región C-terminal de OSCsp modula la proliferación inducida por el LCRE, se buscó analizar los cambios morfológicos causados por los distintos tratamientos. Dado que la forma es un término que agrupa múltiples variables, se realizó un análisis de parámetros morfométricos que permiten estudiar este término de forma separada. Estos parámetros se dividieron en tres categorías: globales (como son el área y el perímetro), de distribución en el espacio (como el área convexa, la solidez y los indicadores de Ferret) y citoplasmáticos (como el área citoplasmática y los parámetros de esqueletización). Para extraer estos parámetros, se diseñó un flujo de trabajo en el software Cellprofiler (Stirling, Swain-Bowden, et al., 2021) que comprende la identificación de la célula y su núcleo, junto con la medición de los parámetros para cada componente identificado. Para la identificación de núcleos y célula completa, se emplearon las imágenes derivadas de los canales de DAPI y β III-tubulina obtenidas mediante inmunofluorescencia sobre las células tratadas (Figura 27A). Identificados el núcleo y la célula completa en cada imagen, se realizó una sustracción del núcleo sobre la célula completa para obtener el citoplasma. Una vez excluidos los núcleos agrupados para reducir la población de células agrupadas en los análisis, se procedió a realizar las mediciones asociadas a la célula completa y al citoplasma (Figura 27B).

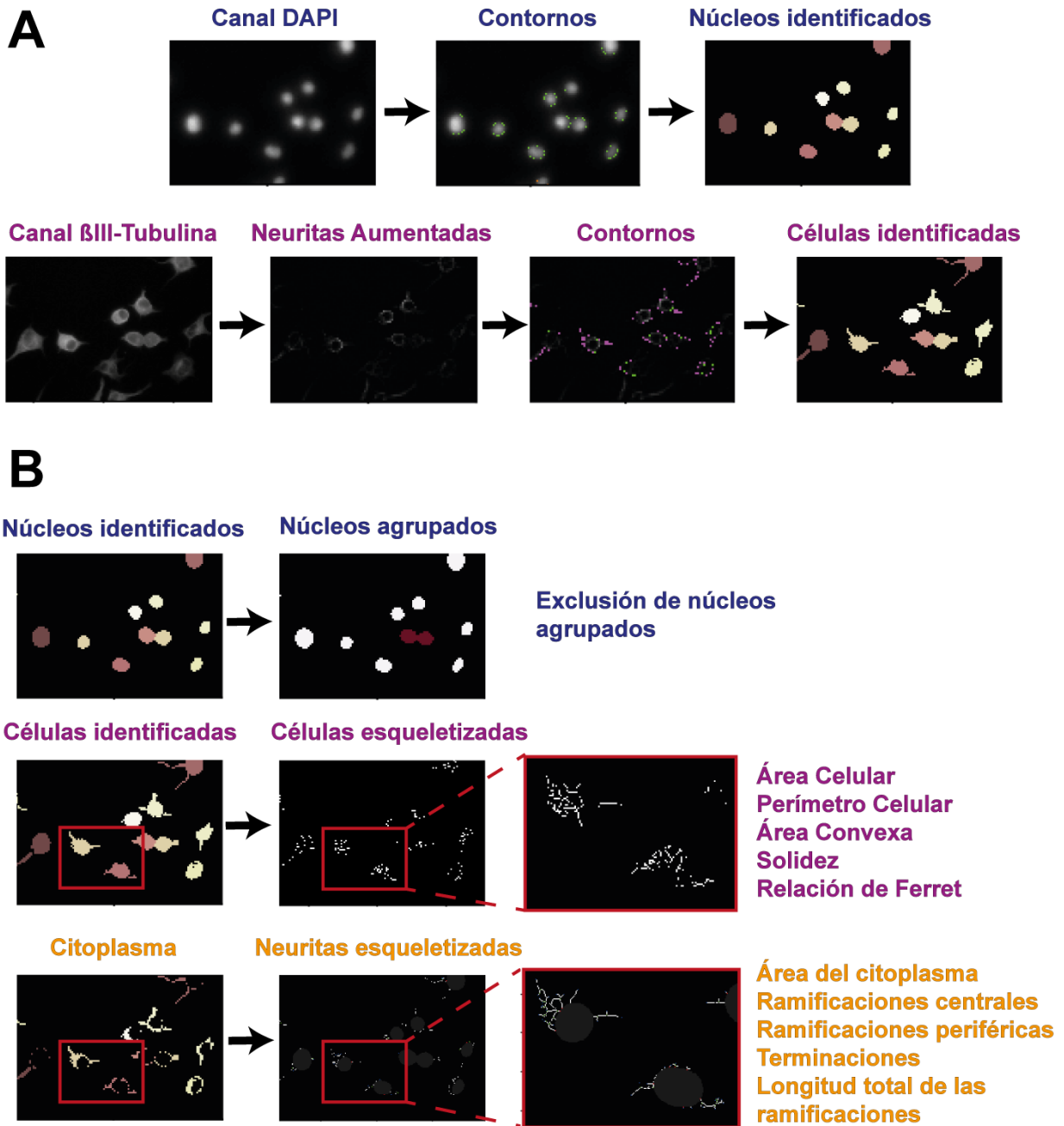


Figura 27. Línea de trabajo de análisis automatizado en Cellprofiler. (A) Identificación de núcleos y células.

(B) Extracción de propiedades asociadas a núcleos, célula completa y citoplasma.

Los datos derivados de los parámetros globales área (Figura 28A) y perímetro celular (Figura 28C) fueron visualizados empleando gráficos de violín por condición para observar su distribución. Al comparar la distribución de datos de área y perímetro celular, se observó que las células en general tienen una menor variabilidad en el área que en el perímetro, debido a que a medida que se diferencian aumentan el número y longitud de sus prolongaciones, lo que hace variar su perímetro sin necesariamente alterar el área. En concordancia con el resultado del efecto agregativo del LCRE sobre las células N2A obtenido mediante entrenamiento de redes neuronales (Figura 26C), podemos observar una menor población de datos en las condiciones que presentan LCRE producto de la exclusión de núcleos agrupados. Dado que el porcentaje de células agrupadas identificado con CellAnalyst (Figura 26C) se obtiene mediante un algoritmo de redes neuronales entrenadas por el usuario que detecta patrones certeros pero que presenta el problema de funcionar como una caja cerrada (Hassija et al., 2024), no es posible determinar cómo se realiza la identificación de estas células, y, por tanto, no es posible determinar la razón de que se identifiquen una mayor cantidad de núcleos agrupados con el procesamiento automatizado.

Para determinar si los tratamientos generaron un aumento en la población de células N2A diferenciadas (caracterizadas por un mayor número y longitud de sus prolongaciones), se graficó la mediana del área (Figura 28B) y el perímetro celular (Figura 28D). A diferencia del promedio, la mediana permite evaluar cómo se comporta una determinada población sin verse afectada por la presencia de valores extremadamente altos o bajos dentro del conjunto de datos. Al comparar la mediana del área y promedio que presentan las células tras el tratamiento con las diferentes condiciones observamos una tendencia en donde, en primer lugar, llama la atención una disminución en el área ($p\text{-value} = 0,3110$) y perímetro celular ($p\text{-value} = 0,1903$) cuando se emplea un tratamiento con LCRE. Por el contrario, se observó un

aumento en ambos parámetros cuando las células N2A son tratadas con el sobrenadante concentrado control. Este efecto sobre el perímetro se ve completamente abolido cuando el sobrenadante es empleado en conjunto con LCR_e (p-value = 0,0008). Por otra parte, el sobrenadante C-term OSC_{sp} también promueve un aumento en el perímetro celular, pero que solo se ve parcialmente disminuido cuando se emplea en conjunto con LCR_e (p-value = 0,0568). Esto puede estar sugiriendo un efecto amortiguador de la región C-terminal sobre las moléculas presentes en el LCR_e, que impiden que estas ejerzan su efecto anti diferenciador.

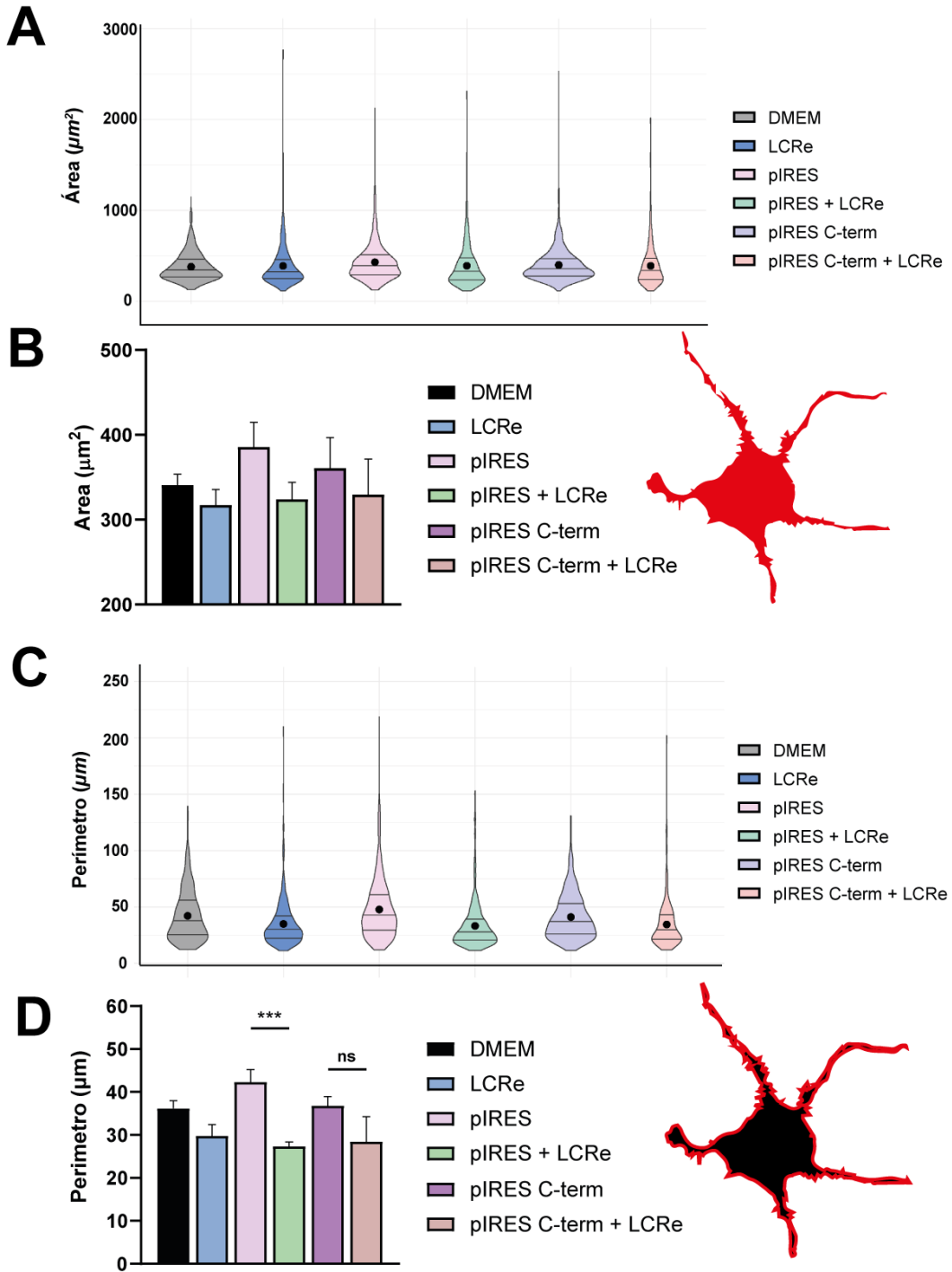


Figura 28. Efecto en el área y perímetro celular de la región C-terminal de OSCsp, en presencia y ausencia de LCRe. Los gráficos de violín indican la distribución de los datos en los distintos tratamientos para el área celular (A) y perímetro celular (C). La mediana del área (B) y perímetro (D) para cada replica fue comparada para buscar diferencias significativas entre tratamientos. Los datos fueron agrupados desde 10 campos en 3 experimentos independientes, desde los que se obtuvo la mediana \pm SEM. **** $p < 0,0001$; prueba One-way ANOVA.

Distintos valores morfométricos de cada célula en condición fueron agrupados por replica y comparados estadísticamente para determinar las variaciones entre las condiciones para documentar de manera precisa que parámetros se ven alterados cuando las células cambian su morfología con el LCRé solo en la condición con sobrenadante concentrado de pIRES, pero no con el que contiene la región C-terminal de OSCsp. El primer parámetro morfométrico evaluado correspondió al área convexa (Figura 29A), la cual se define como el área del polígono más pequeño capaz de contener un objeto. Para el caso de las células N2A, estas presentan un área convexa elevada cuando poseen múltiples neuritas de gran tamaño distribuidas de forma uniforme en el espacio, y, por el contrario, tendrán un área convexa baja cuando se trate de una célula pequeña sin neuritas o con neuritas cortas. En un patrón similar al observado para el perímetro celular, observamos que el sobrenadante control genera un aumento en el área convexa que desaparece al tratar en conjunto con LCRé. Por el contrario, el sobrenadante C-term OSCsp no genera una disminución significativa en el área convexa cuando se emplea en conjunto con LCRé. Esto pareciera deberse a un área convexa menor cuando se emplea el sobrenadante C-term OSCsp compara con el sobrenadante control y a una mayor varianza cuando se emplea en conjunto con el LCRé. Para corroborar que el efecto de los tratamientos sobre el área convexa de las células deriva principalmente de un aumento en el largo y número de las neuritas, que, por un aumento en el tamaño de la célula, se evaluó el parámetro de solidez. Este parámetro emplea el área total de la célula, dividida el área convexa obtenida, de manera de reflejar que tan irregular es un objeto independiente de su tamaño. Desde este parámetro podemos determinar en primer lugar que el LCRé genera una disminución en el número de irregularidades, describiendo el comportamiento de una célula más redonda ($p\text{-value} = 0,0067$). Este efecto es aún más marcado en el caso del tratamiento

con el sobrenadante control, en el que se observa una solidez elevada que se ve radicalmente disminuida por la presencia del LCR_e (p-value = 0,0001). Se observó un efecto similar con el sobrenadante C-term OSC_{sp}, salvo que la presencia de la proteína recombinante pareciera nuevamente promover una mayor dispersión en el comportamiento de las células cuando se emplea en conjunto con el LCR_e, generando una diferencia significativa menor (p-value = 0,0029).

Dado que el área convexa se ve aumentada cuando existen neuritas de gran tamaño distribuidas de forma uniforme en el espacio, se buscó determinar en qué grado los tratamientos cambian esta distribución. Para esto se emplearon los descriptores de Ferret, en donde el mínimo y el máximo de Ferret corresponden a la distancia mínima y máxima entre dos puntos del objeto que permiten generar líneas perpendiculares que no toquen otro punto del objeto. En específico para el análisis de las células N2A, la relación de Ferret, definida por la división del mínimo y el máximo de Ferret, nos permite determinar de forma independiente del tamaño de la célula si sus neuritas se encuentran distribuidas de forma uniforme (como una neurona multipolar) o si se tienen a generar hacia lados opuestos (como una neurona bipolar) (Figura 29B). La relación de Ferret para las células tratadas con el sobrenadante control nos indica la presencia de células N2A con neuritas distribuidas asimétricamente, efecto que se ve completamente abolido cuando se tratan las células con el sobrenadante control en conjunto con LCR_e, en comparación con cuando se trata solo con LCR_e. La reducción en el número de neuritas provocado por el LCR_e se ve acompañado con un aumento en la redondez, como podemos observar mediante el parámetro de solidez (Figura 29A). Para el caso del sobrenadante C-term OSC_{sp}, tenemos una leve tendencia a observar células con neuritas distribuidas de forma más uniforme que con su contraparte sin la proteína recombinante (p-value = 0,6609), lo que contribuye a no observar un cambio significativo

cuando se adiciona LCRé en conjunto. Nuevamente, otra característica de los datos que impide observar un cambio significativo al adicionar LCRé es una alta varianza en la relación de Ferret cuando se emplean ambos tratamientos juntos, indicando que las células no son conducidas a un fenotipo marcado como es el caso del control solo con LCRé. Al analizar por separado el mínimo y máximo de Ferret de las células N2A tratadas con el sobrenadante con la proteína recombinante observamos un valor menor en el máximo de Ferret cuando se encuentra presente proteína recombinante, indicando que posiblemente existe una disminución en la longitud de las neuritas al comparar con su control sin la proteína recombinante.

Los resultados de diferenciación obtenidos concuerdan con los experimentos en los que se analizó la proliferación, dado que es esperable que las células que proliferan, como es el caso cuando se realizan tratamientos con LCRé, mantengan una mayor redondez. El caso contrario es cuando las células adquieren un fenotipo neuronal, como ocurre al tratar con el sobrenadante control, aumentando el número de prolongaciones e irregularidades en su contorno.

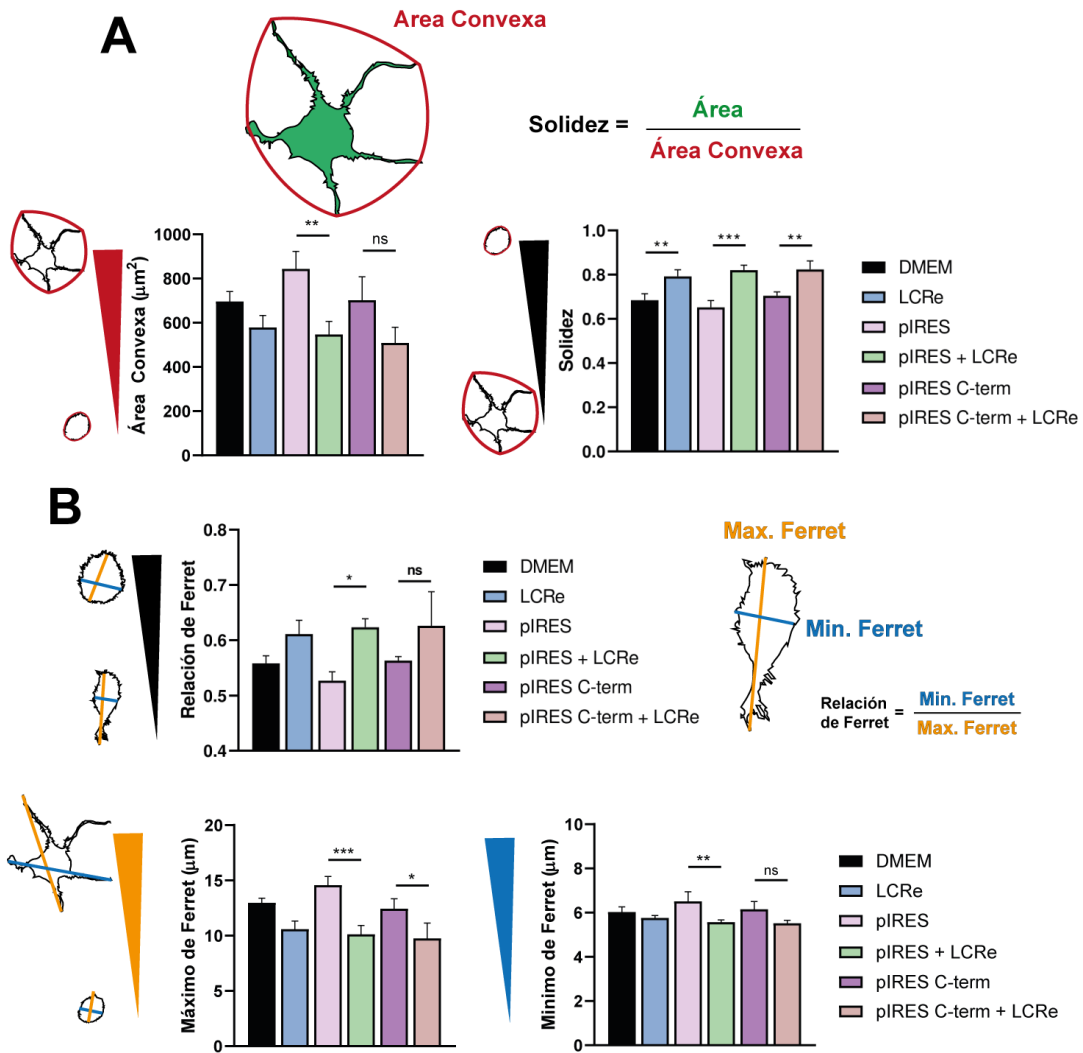


Figura 29. Cambios en parámetros morfométricos de células N2A tratadas con la región C-terminal de OSCsp y LCRe. Desde los parámetros obtenidos por el análisis automatizado en Cellprofiler, se determinó el promedio del área convexa y solidez (**A**); y la relación de Ferret, derivada del parámetro mínimo y máximo de Ferret (**B**). Los datos fueron agrupados desde 10 campos en 3 experimentos independientes, desde los que se obtuvo el promedio \pm SEM. **** $p < 0,0001$; prueba One-way ANOVA.

Para evaluar parámetros morfométricos asociados a cambios en las neuritas, se realizó un estudio de indicadores asociados al citoplasma (Figura 30A). Para esto, en primer lugar, el área del citoplasma, la cual, a diferencia del área total, revela cambios significativos entre las células sometidas al tratamiento con el sobrenadante control y aquellas tratadas con LCRé. De manera similar a los resultados observados para el perímetro celular total, las células tratadas con el sobrenadante C-term OSCsp muestran una leve tendencia a presentar una menor área citoplasmática, aunque esta no disminuye significativamente cuando se trata en conjunto con LCRé. Nuevamente, pareciera que el uso combinado del sobrenadante con la proteína recombinante y LCRé genera células con un área con mayor varianza que cuando se emplean el sobrenadante control con LCRé. Dado que para este parámetro se observaron cambios significativos en comparación con el área total, se realizó un análisis del promedio del área nuclear por condición (Figura 30B). Aunque se observan ligeras variaciones en el área nuclear debido a los tratamientos, estas no son significativas. Sin embargo, ya que un área importante dentro de la célula es ocupada por el núcleo en el caso de las células N2A, las variaciones en su tamaño generan variabilidad en la interpretación del área total, la cual se eliminó al medir exclusivamente el área citoplasmática.

Debido a que los datos indicaron principalmente alteraciones en el citoplasma condicionado por los tratamientos, se realizó una esqueletización de la estructura celular. Esta esqueletización emplea un algoritmo en el que se intenta replicar la forma celular en base a la menor cantidad de líneas rectas que definan su comportamiento desde un punto central. Para esto, el programa identifica las líneas centrales que definen los puntos más alejados del núcleo, y líneas periféricas que se encargan de rellenar el espacio para definir el borde celular, desde las que se calcula la cantidad de terminaciones y longitud total de las líneas empleadas. A través de estos parámetros es posible sugerir que la presencia de la región C-terminal de

OSCsp genera una disminución en el número de neuritas, asociado a un fenotipo celular retraído y redondo. Esto se ve validado por una disminución significativa en la longitud de las ramificaciones al comparar el sobrenadante control con el que se encuentra la proteína recombinante. Además, es interesante observar que de entre todos los parámetros, el comportamiento del LCR_e con mayor varianza se observa cuando se encuentra presente la proteína recombinante.

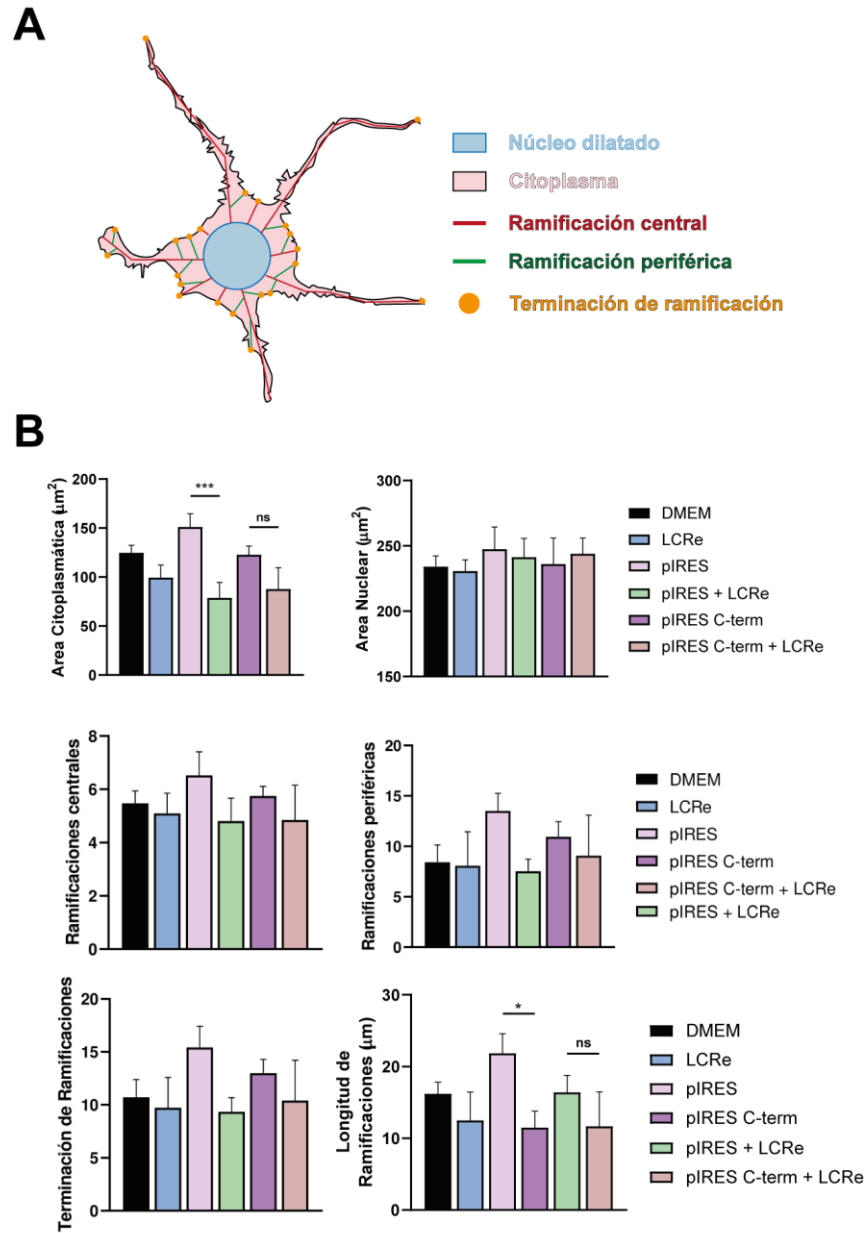


Figura 30. Cambios en parámetros morfométricos asociados al citoplasma y formación de neuritas de las células N2A tratadas con la región C-terminal de OSCsp, en presencia y ausencia de LCRé. (A) Esquema representativo de la procedencia de cada medición en la morfología celular. **(B)** Promedio por tratamiento del área citoplasmática y parámetros provenientes de la esqueletización de la estructura celular. Los datos fueron agrupados desde 10 campos en 3 experimentos independientes, desde los que se obtuvo el promedio \pm SEM. **** $p < 0,0001$; prueba One-way ANOVA.

3 Objetivo 3: Describir la importancia de la región C-terminal en embriones deficientes de OSCsp y transgénicos transitorios para estos dominios.

- 3.1. Estudiar el efecto de la región C-terminal de OSCsp sobre la proliferación de progenitores neurales de la médula espinal mediante electroporación *in-vivo*.

Previamente, se ha observado que la OSCsp ejerce un efecto anti proliferativo, como se demostró en explantes de mesencéfalo cultivados en DMEM, donde la adición de OSCsp provocó una disminución en la proliferación celular. Por el contrario, cuando la OSCsp es neutralizada en el LCR_e, se observa un aumento en la proliferación de progenitores neurales de mesencéfalo *ex-vivo* (Vera et al., 2013). Sin embargo, hasta la fecha, las regiones específicas de la proteína responsables de esta función permanecen sin ser caracterizadas. Dado que la región C-terminal de OSCsp contiene los dominios TSR, vWC7 y CTCK, los cuales son estructuras importantes en proteínas matricelulares que facilitan su interacción con otras proteínas (Kubota & Takigawa, 2013; Lau, 2016), la caracterización de su función en la proliferación de progenitores neurales podría proporcionar una explicación al efecto observado con la proteína nativa.

Para determinar el efecto de la región C-terminal de OSCsp sobre progenitores neurales *in vivo*, se empleó la electroporación de médula espinal de *gallus gallus* como un modelo clásico de estudio de progenitores neurales (M. G. Andrews et al., 2017; Danesin et al., 2006; Kolle et al., 2003). Este modelo presenta la ventaja de que direcciona la entrada del vector a un solo lado de la médula, permitiendo la comparación del efecto de un determinado vector entre el lado electroporado y no electroporado, actuando este último como control dentro de la misma imagen. Para corroborar la eficiencia del método de electroporación, se inyectó el vector pD_{Tomato} en el canal central de embriones en estadio HH12 (Figura 31A). La aplicación de

pulsos de electricidad permitió la electroporación lateral del vector, observándose la señal fluorescente roja derivada del vector dos días después de la electroporación. La región marcada con fluorescencia fue seccionada transversalmente con vibrátomo y sometida a tinción nuclear con DAPI para visualizar la estructura de la médula electroporada, observándose el canal central y el ganglio de la raíz dorsal, que marcan puntos de referencia para localizar la membrana limitante interna y externa respectivamente.

La capacidad de expresar la región C-terminal de OSCsp *in vivo* se evaluó mediante la electroporación del vector pIRES C-term OSCsp en la médula espinal de embriones de *gallus gallus* en HH12. Desde la región fluorescente observada dos días después de la electroporación, se realizaron cortes transversales, sobre los cuales se efectuó una inmunofluorescencia contra el epítipo de histidinas (6xHis) y contra la OSCsp nativa (AFRU16) (Figura 31B). La señal 6xHis se observó únicamente en uno de los lados de la médula, concordante con el lado electroporado, lo que indica que la región C-terminal de OSCsp se está expresando en esta región. Se corroboró una conformación similar a la observada en OSCsp nativa por la colocación parcial de la señal 6xHis con la señal de AFRU16, lo que indica que la región C-terminal de OSCsp comparte epítipes con OSCsp nativa.

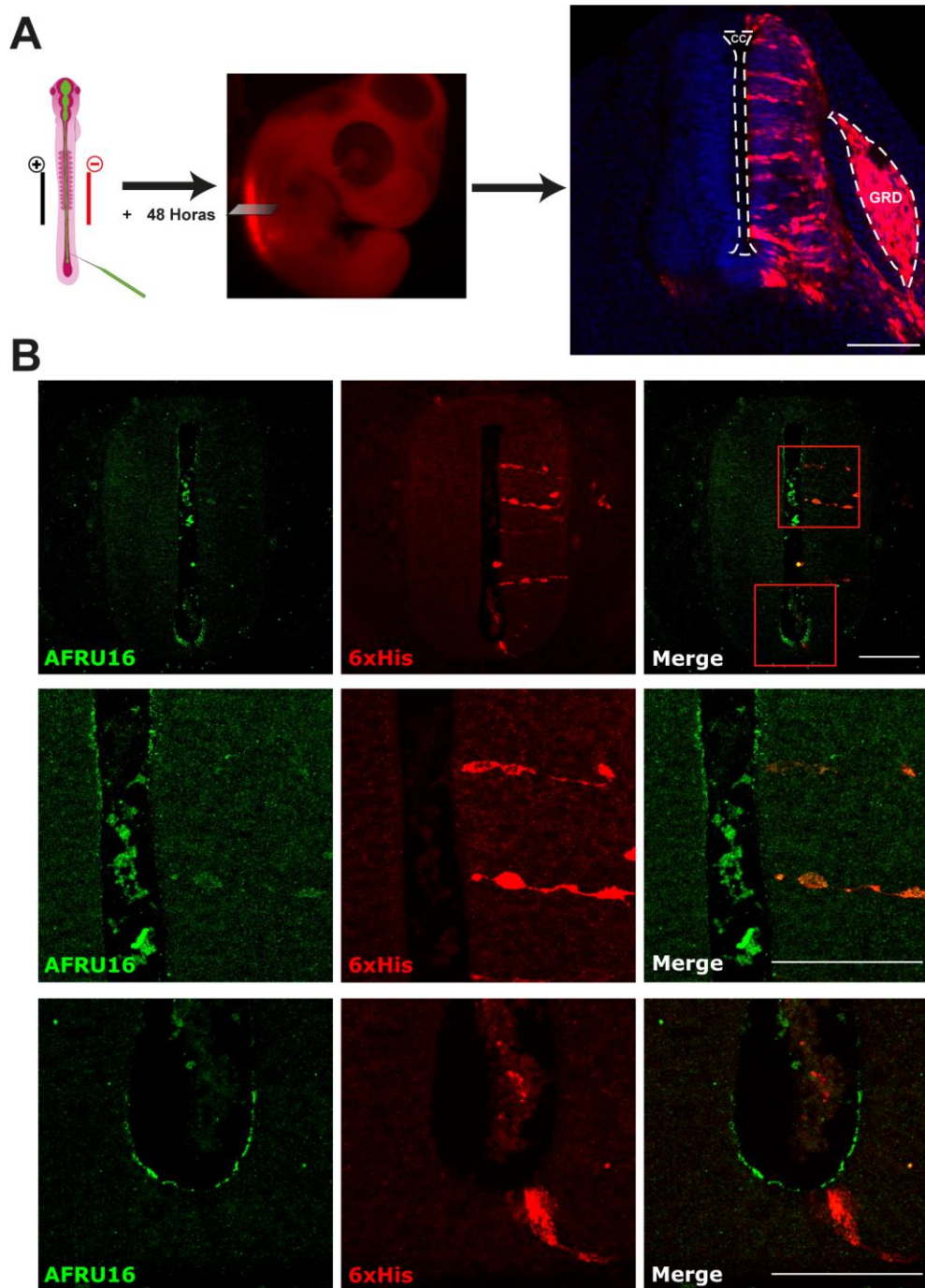


Figura 31. Electroporación de médula espinal de embriones *gallus gallus* estadio HH12. (A) Esquema del método de electroporación en embriones de pollo HH12 con el vector pDTomato y cortes transversales de médula espinal para visualizar señal fluorescente en el lado electroporado en comparación con el lado control **(B)** Inmunofluorescencia de cortes transversales de embriones *gallus gallus* electroporados con el vector pIRES C-term OSCsp contra el epítipo de histidinas (6xHis) y contra OSCsp nativa (AFRU16). CC = Canal Central; GRD = Ganglio de la Raíz Dorsal; Barra = 100 μ m

Para evaluar el efecto de la región C-terminal de OSCsp sobre la proliferación de los progenitores neurales de la médula espinal, se electroporó el vector pIRES C-term OSCsp en embriones de *gallus gallus* en estadio HH12. A partir de la región fluorescente observada dos días después de la electroporación, se realizaron cortes transversales en criostato, sobre los cuales se efectuó una inmunofluorescencia para localizar la señal de fosfo-histona III (pH3) como marcador clásico de núcleo en mitosis (J.-Y. Kim et al., 2017), junto con la señal asociada al epítipo de histidinas (6xHis) y la señal fluorescente roja (RFP) endógena del vector bistrónico (Figura 32). La colocación entre la señal 6xHis y RFP indica que los progenitores neurales de la médula espinal expresan correctamente los elementos diseñados en el vector pIRES C-term OSCsp, mientras que la señal nuclear discreta de pH3 valida la presencia de progenitores neurales en la zona ependimaria de la médula espinal. Aunque el vector bistrónico pIRES C-term OSCsp fue diseñado para expresar la región C-terminal de OSCsp y RFP bajo distintos marcos de lectura, pero bajo un único promotor, llama la atención que la colocación entre la señal 6xHis y RFP sea solo parcial. Para realizar análisis estadísticos de la distribución de la señal pH3 entre el lado electroporado y control, se seleccionaron tres cortes derivados de especímenes distintos (Figura 32 y Anexo 3).

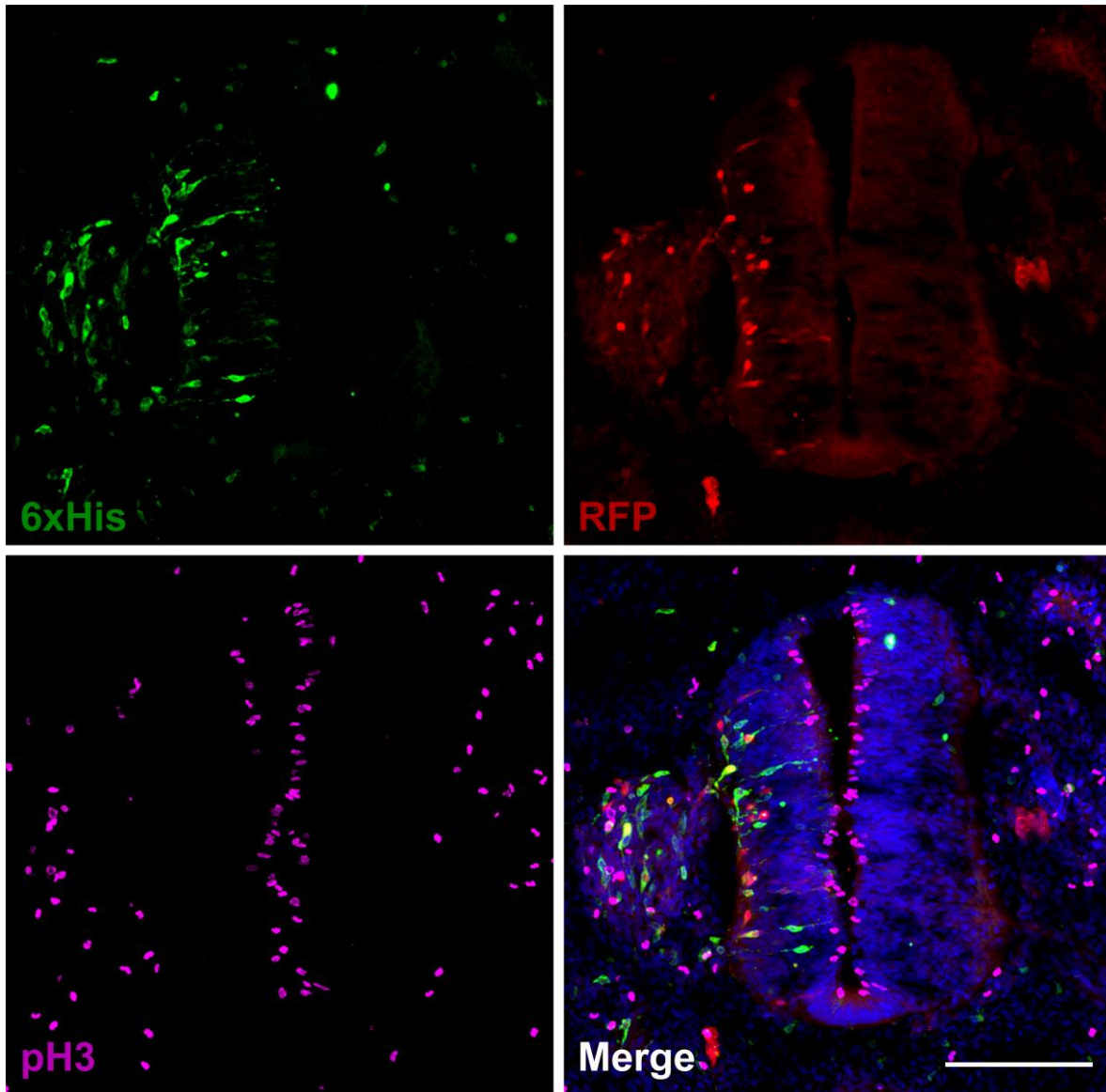


Figura 32. Inmunofluorescencia de cortes transversales del espécimen 1 de embrión *gallus gallus* electroporado con el vector pIRES C-term OSCsp contra el epítipo de histidinas (6xHis) y fosfo-histona III (pH3), junto con la marca fluorescente roja (RFP) endógena del vector. Barra = 100 μ m

Para cuantificar los niveles de proliferación en el lado electroporado y lado control, se delinearon áreas en las imágenes obtenidas del inmunomarcaje de pH3 en ambos lados de la región neuroepitelial de la médula electroporada. Dentro de estas áreas, se cuantificaron tanto el número de núcleos como la intensidad promedio de la señal pH3, normalizada por el área de la región seleccionada en ambos lados. Al comparar la cantidad de núcleos positivos para pH3 y la relación entre la intensidad de señal pH3 entre el lado electroporado y el lado control no se observó un cambio significativo en estos parámetros, lo cual indica que no existe un efecto global del vector sobre el lado electroporado (Figura 33A). Sin embargo, si es posible apreciar a simple vista que existe una disminución de la señal de pH3 en la cercanía de células electroporadas con pIRES C-term OSCsp. Para determinar si existen cambios locales de la señal pH3 en la vecindad de regiones electroporadas se realizó una segmentación de la médula espinal en sextiles a lo largo del eje dorsoventral (Figura 24B).

Dado que la médula espinal presenta múltiples factores de transcripción a lo largo del eje dorsoventral, los cuales conducen a un patrón de regionalización (Le Dréau & Martí, 2013), en los segmentos definidos se cuantificó el número de núcleos positivos y la razón de la intensidad asociada a la señal pH3 para cada segmento respecto al promedio en el total de segmentos (Figura 33C). Este parámetro permite evaluar el nivel de proliferación a lo largo del eje dorsoventral. Al observar la tendencia que sigue esta distribución, se evidenció un mayor nivel de proliferación en la región dorsal que en la ventral, lo cual es concordante con estudios previos que indican que los morfógenos de la familia Wnt generan un gradiente desde la región dorsal, promoviendo la proliferación de progenitores neurales de manera gradual a lo largo del eje dorsoventral (Megason & McMahon, 2002). Además, se observa que la razón entre la señal pH3 para cada segmento, comparada con el promedio entre todos los segmentos,

presenta una menor dispersión en los datos en comparación con el conteo de núcleos, posiblemente debido a la subjetividad inherente en el conteo manual de núcleos positivos (Figura 33C). Por este motivo, se prosiguió trabajando con este tipo de parámetros en los análisis consecutivos.

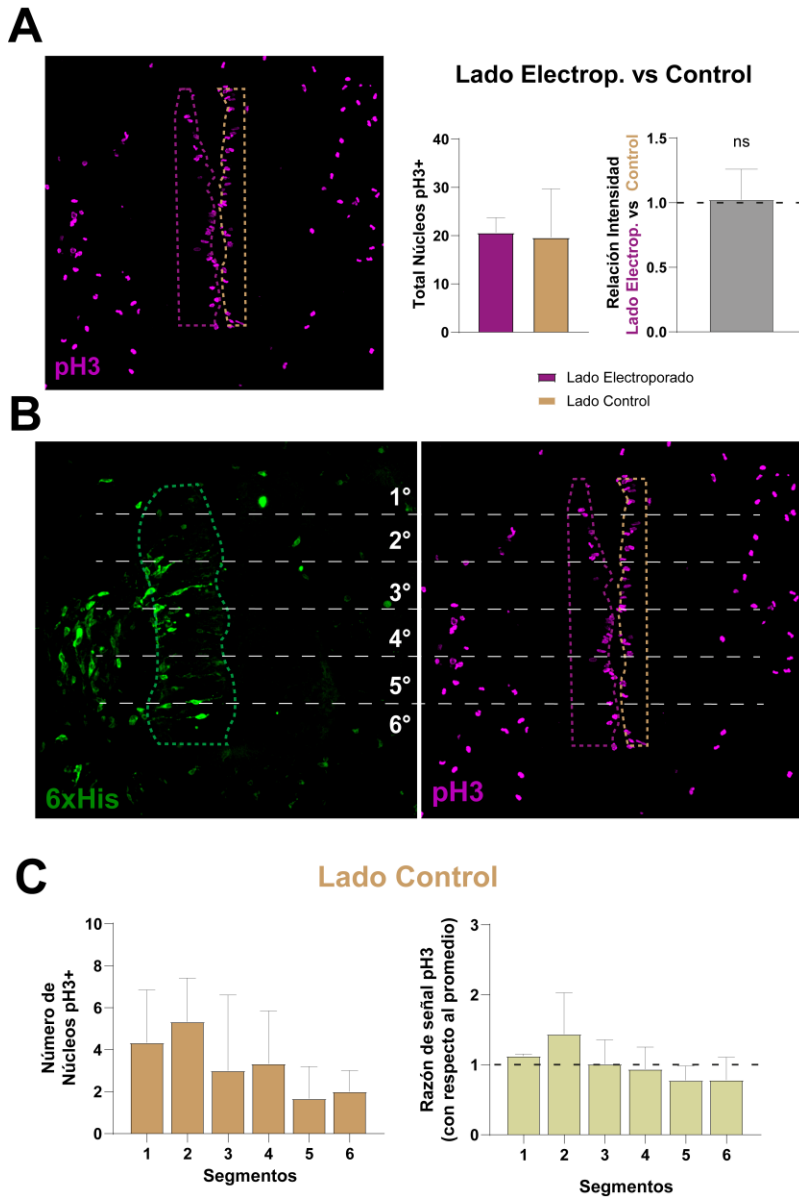


Figura 33. Análisis de proliferación del neuroepitelio de la médula espinal tras la electroporación con pIRES C-term OSCsp. Se compara la marca de proliferación fosfo-histona III (pH3) entre el lado electroporado y el lado control, cuantificando tanto el número de núcleos positivos como la relación entre la intensidad de la señal pH3 del lado electroporado en comparación con el lado control **(A)**. La médula espinal fue segmentada en sextiles a lo largo del eje dorsoventral **(B)**, donde se contabilizaron los núcleos positivos para pH3 por segmento, y se evaluó la razón de intensidad de señal pH3 para cada segmento con respecto al promedio entre todos los segmentos en el lado control **(C)**. Los datos se expresan como promedio \pm SEM. **** $p < 0,0001$; prueba T-Test pareado para la cuantificación del total de señal, One Sample T-test para la relación de intensidad y prueba One-way ANOVA para el análisis por segmentos.

Dado que la señal pH3 se distribuye de manera heterogénea a lo largo de los segmentos, se calculó la relación entre el valor de la razón de señal pH3 para cada segmento en el lado electroporado, normalizada por la razón en el lado control para cada segmento. Esto permite comparar las variaciones de la señal pH3 para cada segmento entre el lado electroporado y el lado control. La relación para cada segmento se graficó por espécimen, junto con el porcentaje de área electroporada en cada segmento (Figura 34A). Considerando que se espera observar un mayor efecto de la región C-terminal de OSCsp en los segmentos con mayor electroporación, se seleccionaron los dos segmentos con un mayor porcentaje de área electroporada, denominados segmentos de electroporación masiva, en contraste con los otros cuatro segmentos, que fueron llamados segmentos de electroporación discreta. Al graficar el promedio de la relación entre ambos tipos de segmentos, se determinó una diferencia significativa entre los segmentos con mayor porcentaje de electroporación en el lado electroporado (Figura 34B). Esta diferencia permite concluir que la región C-terminal de OSCsp disminuye la proliferación de los progenitores neurales en el neuroepitelio de la médula espinal *in vivo*, lo que es concordante con el efecto anti-proliferativo observados al tratar explantes mesencefálicos con medio condicionado con OSCsp nativa (Vera et al., 2013) y al tratar células N2A con la proteína recombinante y LCR_e *in vitro* (objetivo 2 de la presente tesis).

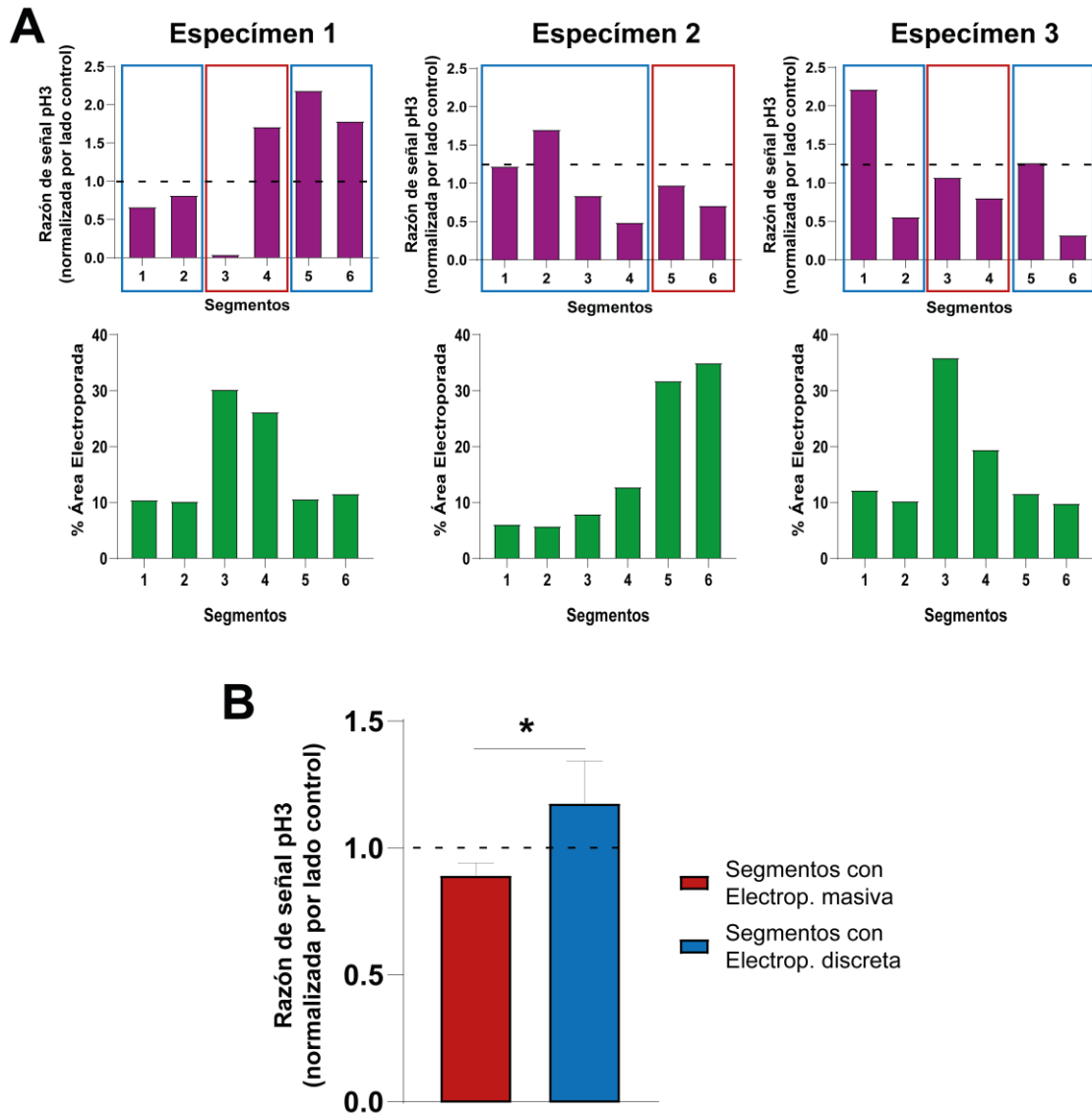


Figura 34. Efecto anti-proliferativo de la región C-terminal de OSCsp sobre progenitores neurales de la médula espinal de *gallus gallus*. Se determinó la relación de señal de fosfo-histona III (pH3) entre cada segmento de lado electroporado y su promedio, normalizada por la relación de ese segmento en el lado control, acompañado del porcentaje de área electroporada, obtenida al comparar la señal del epítipo de histidinas (6xHis) en cada segmento con el total de área electroporada **(A)**. La relación de señal pH3 en el lado electroporado, normalizada por la relación en el lado control, fue comparada entre los dos segmentos más electroporados (segmentos con electrop. masiva), comparados con los otros cuatro segmentos menos electroporados (segmentos con electrop. discreta) **(B)**. Los datos fueron obtenidos desde 3 experimentos independientes, desde los que se obtuvo el promedio \pm SEM. **** $p < 0,0001$; prueba One-way ANOVA. Los datos se expresan como promedio \pm SEM. **** $p < 0,0001$; prueba T-Test no pareado.

3.2. Estudiar el efecto de la región C-terminal de OSCsp sobre la diferenciación de progenitores neurales de la médula espinal mediante electroporación *in-vivo*.

Una de las características que presentan las células neuroepiteliales en la médula espinal es su capacidad para proliferar en la zona interna (en contacto con el LCR_e del canal central) o diferenciarse tanto en glia radial (en contacto con el LCR_e y con la membrana limitante externa) como en neuroblastomas (localizados cerca de la membrana limitante externa, perdiendo el contacto con el LCR_e). Como se mencionó anteriormente, un fenómeno inesperado observado en los cortes de embriones electroporados con el inmunomarcaje contra el epítipo de histidinas presente en la región C-terminal de OSCsp recombinante (6xHis) es la colocación solo parcial de las señales RFP y 6xHis. Dado que el vector diseñado presenta un único promotor para la proteína recombinante y RFP en distintos marcos de lectura, se esperaría una colocación total entre ambas señales para los progenitores neurales electroporados.

Dado que la diferencia de localización de señal podría guardar relación con el tipo de célula hacia la cual se diferencian las células neuroepiteliales, se realizó una medición cuantificable de este fenómeno. Para esto, el lado de la médula electroporada se segmentó en cuartiles en el eje laterolateral, lo que permite separar a las células localizadas en la membrana interna, en contacto con el canal central, de aquellas que se encuentran cercanas a la membrana limitante externa. Al medir el porcentaje de área fluorescente en los segmentos para las señales 6xHis y RFP, se observó que la señal RFP se concentra principalmente en la región externa de la pared de médula espinal, con escasa presencia en el segmento cercano al canal central (Figura 35).

La diferencia en la localización de ambas señales posiblemente está relacionada con el grado de diferenciación de los progenitores neurales electroporados, ya que la posición del núcleo de los progenitores neurales está estrechamente ligada al balance entre proliferación y diferenciación. Los núcleos de los progenitores neurales en contacto con el canal central realizan un movimiento interquinésico nuclear para llevar a cabo la mitosis y proliferar (Molina & Pituello, 2017). A medida que las células pierden contacto con el canal central, comienzan a diferenciarse en neuroblastos, los cuales son precursoras de las neuronas que conectan con los órganos sensoriales y motores a través de sus axones. Considerando esto, se llevó a cabo un recuento de los núcleos de células positivas para la señal 6xHis y RFP en cada uno de los cuartiles segmentados en la pared de la médula espinal. Al graficar el porcentaje de núcleos de estas señales en cada segmento, se observó que los núcleos de células RFP positivas se encuentran localizados en la membrana externa, mientras que los núcleos de células 6xHis positivas se localizan en la membrana interna, manteniendo el contacto con el LCR_e de manera significativa (Figura 35).

Una posible explicación para este fenómeno podría ser que solo las células derivadas de las primeras rondas de proliferación luego de ser electroporadas presentan la señal roja asociada a RFP, perdiendo esta marca fluorescente a medida que las células se dividen. En cambio, la región C-terminal podría mantenerse por más tiempo en las células hijas, permitiendo su detección en la progenie de las células electroporadas. Un posible motivo por el que estas proteínas podrían estar siendo procesadas a diferentes velocidades es la diferencia en su complejidad estructural. RFP presenta un índice de inestabilidad de 28.7%, mientras que la región C-terminal de OSCsp presenta un índice de inestabilidad de 77,4% según el análisis de ProtParam (Expasy) (Gasteiger et al., 2005). Esta diferencia se debe, en parte, a la diferencia en el porcentaje de cisteínas en su estructura, con 0,5% en RFP y 10,4% para la región C-

terminal de OSCsp. Esta diferencia en estabilidad podría impactar en la tasa de expresión y degradación de cada proteína, en donde se esperaría que RFP sea expresada y degradada rápidamente, mientras que la región C-terminal de OSC requiere de un mayor tiempo para su expresión y degradación. Además, las células que presentan RFP, y que por tanto serían descendientes cercanos de las células electroporadas, se ubican en cercanía a la membrana externa, por lo que se sugiere que corresponden a neuroblastos. En cambio, cuando se electropora un vector no relacionado pdTomato, observamos que la gran mayoría de células presenta una morfología de glía radial a los dos días, conectada tanto a la membrana interna como a la externa (Figura 31A). Esto sugiere que la región C-terminal de OSCsp promueve su diferenciación hacia neuroblastos.

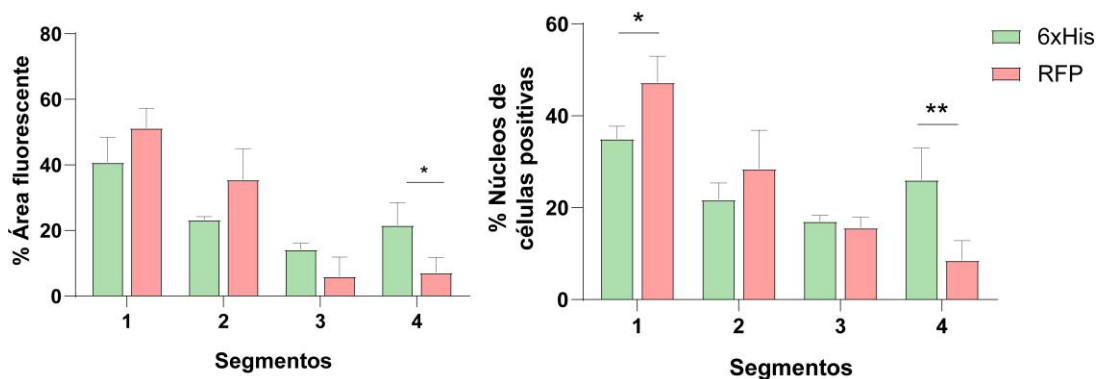
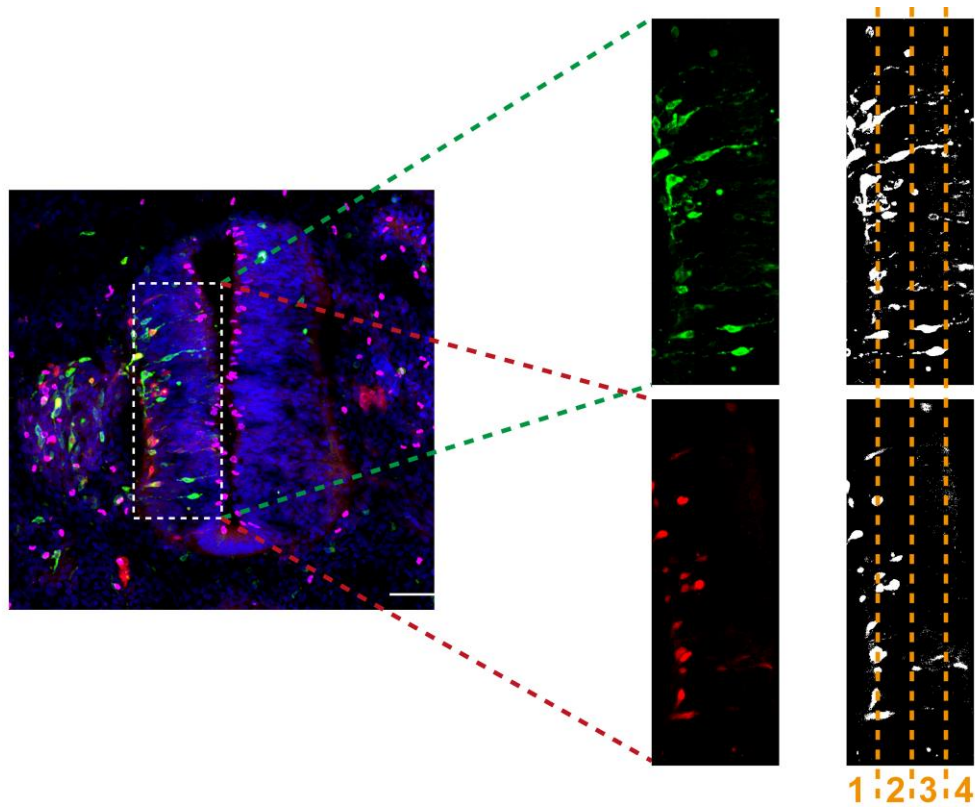
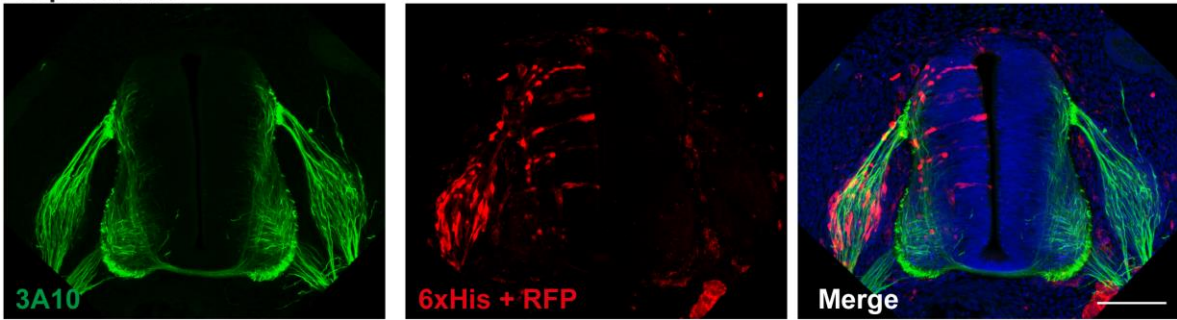


Figura 35. Distribución de la marca RFP y del epítoto de histidinas (6xHis) en la región C-terminal de OSCsp.

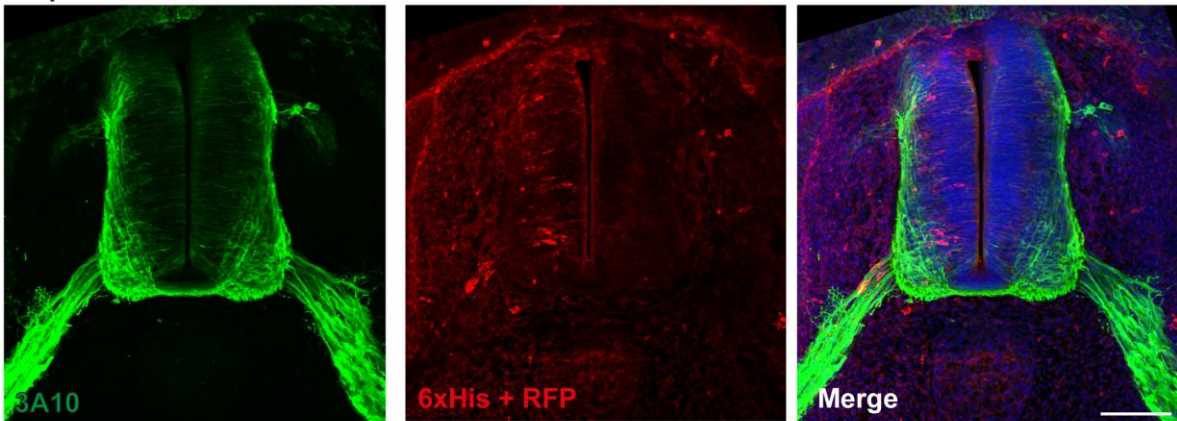
Las áreas de fluorescencia correspondientes a RFP y al epítoto de histidinas (6xHis) se obtuvieron de una región del lado electroporado, sobre la cual se aplicó un umbral para delimitar la señal positiva. La imagen fue segmentada en cuartiles en el eje lateromedial, y se representó el porcentaje de área ocupada en cada sección en comparación con el área total de la señal para ambos canales, junto con el porcentaje de núcleos de células positivas para cada marca. Los datos fueron obtenidos desde 3 experimentos independientes, desde los que se obtuvo el promedio \pm SEM. **** $p < 0,0001$; prueba Two-way ANOVA. Barra = 100 μ m

Experimentos previos en explantes de mesencéfalo mostraron además de su efecto anti-proliferativo, la OSCsp nativa promueve la diferenciación de los progenitores neurales del neuroepitelio (Vera et al., 2013). Para evaluar la contribución de la región C-terminal de OSCsp en el efecto diferenciador de la proteína completa, se electroporó el vector pIRES C-term OSCsp en la médula espinal de embriones de *gallus gallus* en estadio HH12. Dos días después de la electroporación, se diseccionó la región fluorescente observada y cortada en vibrátomo para obtener secciones transversales. En los cortes obtenidos, se evaluó la señal asociada a neurofilamentos mediante inmunofluorescencia, utilizando el anticuerpo 3A10, junto con el epítipo de histidinas perteneciente a la región C-terminal de OSCsp visualizada empleando un anticuerpo secundario en el mismo canal de emisión de la proteína RFP (Figura 36). El conjunto de señal asociada al epítipo de histidinas, junto con la señal RFP permite identificar a los progenitores neurales electroporados localizadas en la región interna y externa de la pared de la médula espinal. La señal de 3A10, asociada a neurofilamentos, permite visualizar un fenotipo neuronal diferenciado y así determinar cambios en el proceso de diferenciación tanto en el lado electroporado como en el lado control. Al igual que en el estudio de proliferación, problemas asociados a la viabilidad y eficiencia de electroporación permitieron seleccionar cortes de solo tres especímenes para los análisis estadísticos posteriores.

Especimen 1



Especimen 2



Especimen 3

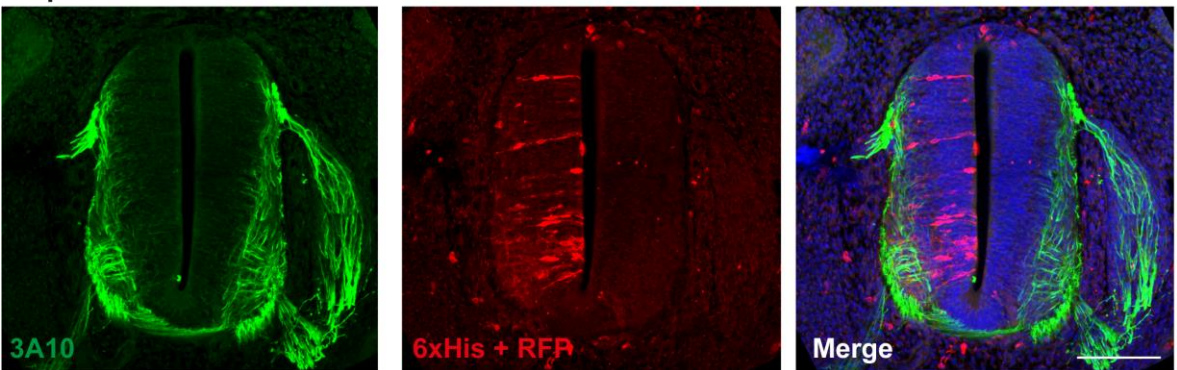


Figura 36. Inmunofluorescencia de cortes transversales de embriones *gallus gallus* electroporado con el vector pIRES C-term OSCsp, usando un anticuerpo contra antígeno asociado a neurofilamento (3A10) y el epítipo de histidinas (6xHis) en conjunto con la señal fluorescente roja (RFP) endógena del vector. Barra = 100 μ m

Para cuantificar los cambios en los niveles de diferenciación entre el lado electroporado y lado control, se delinearon áreas en las imágenes obtenidas del inmunomarcaje de 3A10 en ambos lados de la membrana externa del neuroepitelio de la médula electroporada. Dentro de estas áreas, se cuantificó la intensidad promedio de la señal 3A10, normalizada por el área de la región seleccionada. Al calcular la relación de intensidad de señal 3A10 entre el lado electroporado y control, no se observó un cambio significativo (Figura 37A), lo cual nuevamente indica que la electroporación de pIRES C-term OSCsp no condujo a un efecto global sobre la pared del lado electroporado. Dado que la médula presenta un patrón de regionalización a lo largo de el eje dorsoventral, se realizó una segmentación de la médula espinal en sextiles a lo largo de este eje (Figura 37B). Para medir cuantitativamente las variaciones de la señal 3A10 entre estos segmentos, se cuantificó la razón de la intensidad asociada a la señal 3A10 en cada segmento del lado control, en relación al promedio de señal entre todos los segmentos de este lado, para evaluar su distribución a lo largo del eje dorsoventral (Figura 28C). Como era de esperar, se observó una clara distribución de la señal 3A10 con mayor intensidad en los segmentos ventrales que en los dorsales en el lado control.

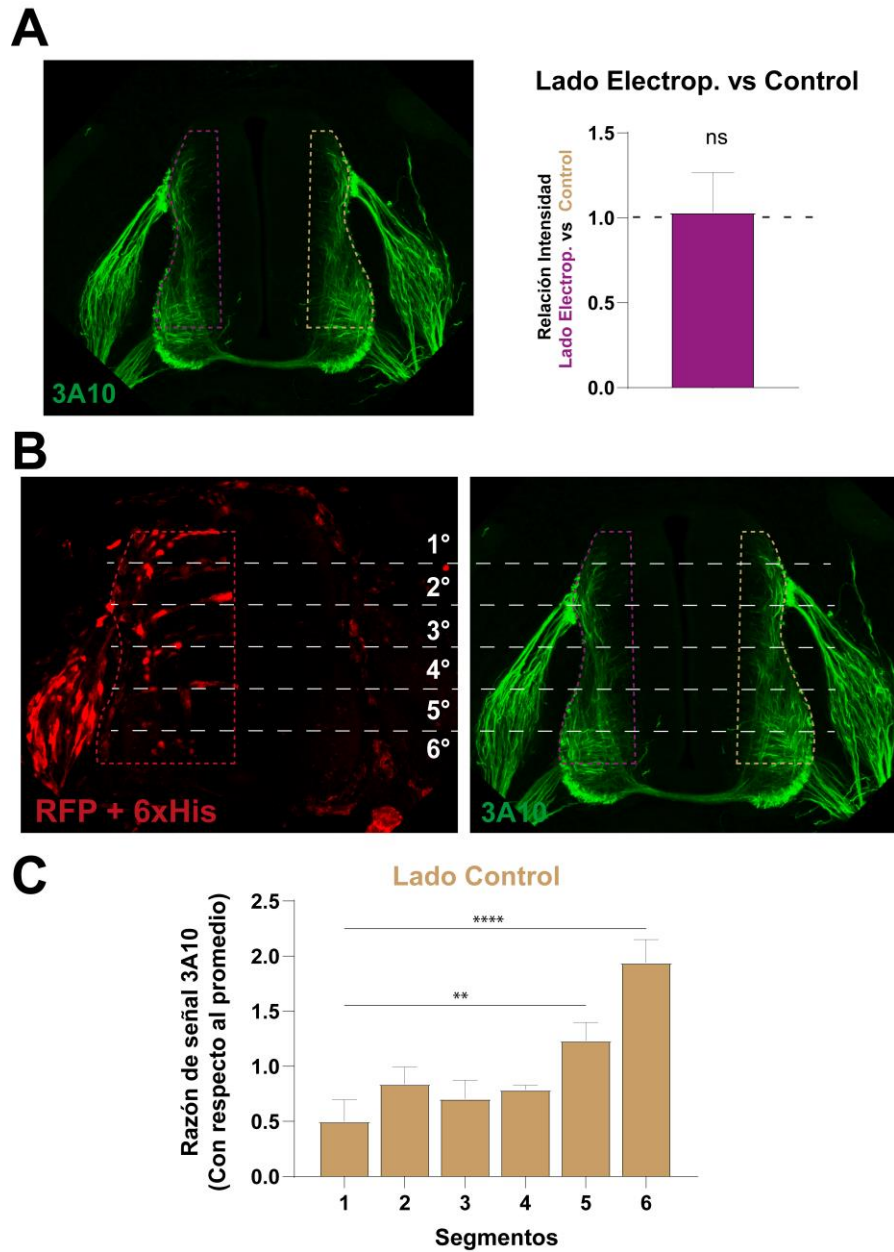


Figura 37. Análisis de diferenciación de progenitores neurales en la región basal de la médula espinal tras la electroporación con pIRES C-term OSCsp. Se compara la marca asociada a neurofilamento (3A10) entre el lado electroporado y el lado control, cuantificando la relación de la intensidad de la señal p3 en el lado electroporado en relación con el lado control **(A)**. La médula espinal fue segmentada en sextiles a lo largo del eje dorsoventral **(B)**, donde se evaluó la razón de la marca asociada a neurofilamento para cada segmento con respecto al promedio del total de segmentos **(C)**. Los datos fueron obtenidos desde 3 experimentos independientes desde los que se obtuvo el promedio \pm SEM. **** $p < 0,0001$; prueba One Sample T-Test para la cuantificación del total de señal y prueba One-way ANOVA para el análisis por segmentos.

De manera similar al análisis realizado para la señal pH3, para evaluar cómo la región C-terminal de OSCsp afecta la diferenciación de los progenitores neurales de la médula espinal, se calculó la relación entre la razón de la señal 3A10 por segmento (comparada por el promedio de señal por lado), y normalizada por la razón por segmento en el lado control. Dado que la distribución de la señal 3A10 entre los segmentos es heterogénea, la relación normalizada por segmento con el lado control permite realizar comparaciones entre estos segmentos. La relación entre segmentos se graficó por espécimen, junto con el porcentaje de área electroporada en cada segmento (Figura 38A).

Al igual que para el análisis de la señal pH3, se identificaron los dos segmentos con un mayor porcentaje de área electroporada, donde se encuentra una mayor abundancia de la región C-terminal de OSCsp recombinante. Estos segmentos se denominaron segmentos de electroporación masiva, mientras que los otros cuatro segmentos fueron clasificados como segmentos de electroporación discreta. Al comparar el promedio de la relación normalizada por segmento entre ambos tipos de cuadrantes, se determinó una diferencia significativa en el lado electroporado entre los cuadrantes clasificados (Figura 38B).

Estos resultados sugieren que la región C-terminal de OSCsp reduce la diferenciación de los progenitores neurales en el neuroepitelio de la médula espinal *in vivo*, en concordancia con los resultados obtenidos al tratar células N2A con la proteína recombinante y LCR_e *in vitro*, pero en contra de lo observado en explantes de mesencéfalo, donde la adición de medio condicionado con OSCsp incrementa enormemente la diferenciación neuroepitelio (Vera et al., 2013). Por otro lado, no son concordantes con la presencia de señal RFP en células

diferenciadas, de morfología similar a neuroblastos (Figura 35). Una posible explicación es que la disminución en la proliferación de células neuroepiteliales reduzca la población total de células con el potencial de diferenciarse. Dado que, el anticuerpo 3A10 marca células con neurofilamentos, y por tanto que ya se encuentran diferenciadas, es necesario realizar nuevos experimentos que permitan evaluar específicamente las poblaciones de células en proceso de diferenciación, como son los marcadores NeuN (Neural nuclear protein) para marcar neuroblastos y GFAP (glial fibrillary acidic protein) para marcar células de la glía radial. Al realizar estos marcajes se podría caracterizar si la región C-terminal de OSCsp promueve la diferenciación de células neuroepiteliales hacia un linaje específico.

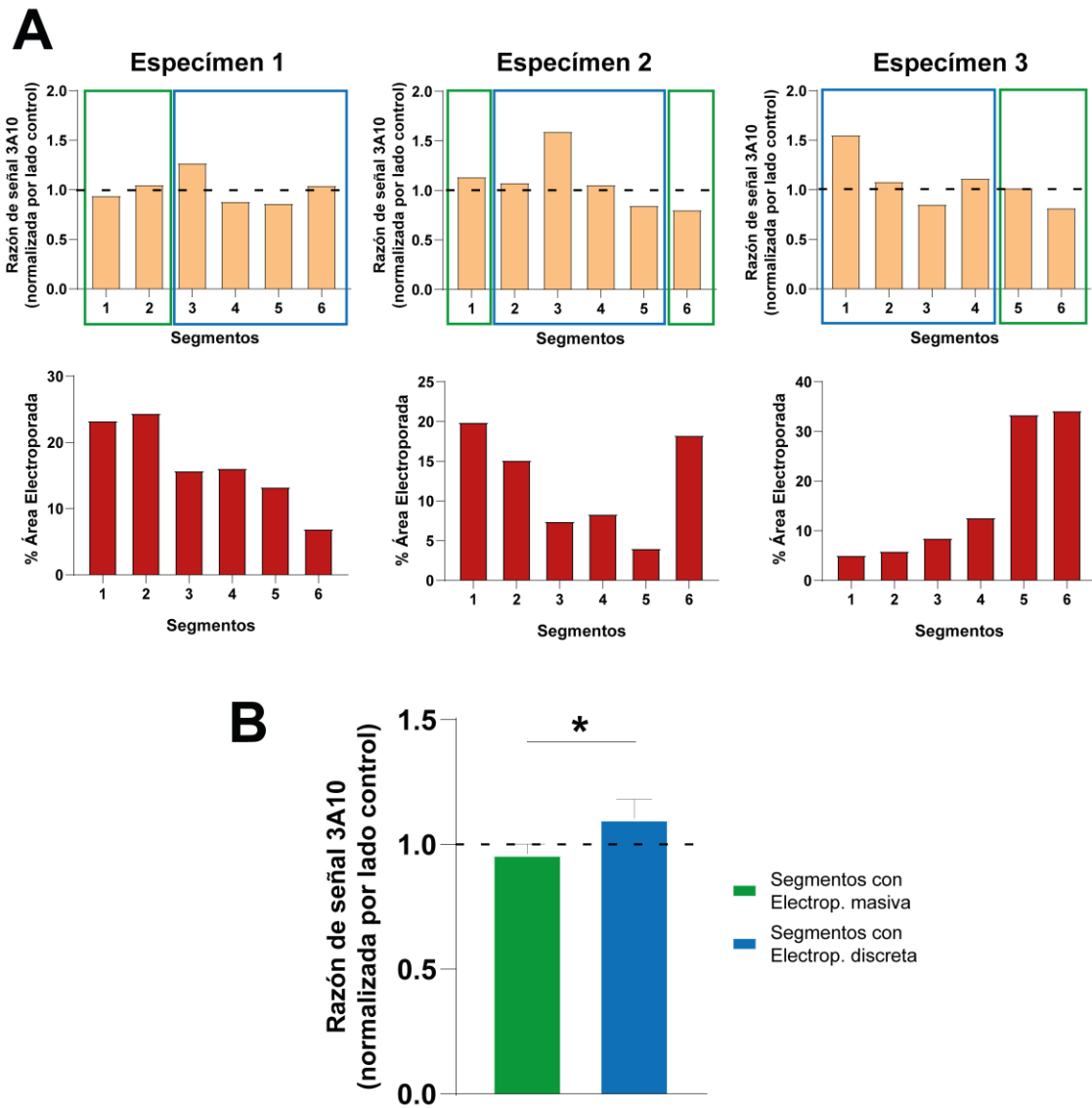


Figura 38. Efecto de la región C-terminal de OSCsp sobre la diferenciación de progenitores neurales de la médula espinal de *gallus gallus*. Se determinó la relación de señal asociada a neurofilamento (3A10) entre cada segmento del lado electroporado y su promedio, normalizada por la relación de señal 3A10 de ese segmento en el lado control. Se muestra el porcentaje de área electroporada, obtenida al comparar la señal del epítipo de histidinas (6xHis) reforzado con RFP en cada segmento con el total **(A)**. La relación de señal 3A10 en el lado electroporado, normalizada por la relación en el lado control, fue comparada entre los dos segmentos más electroporados (segmentos con electrop. masiva), comparados con los otros cuatro segmentos menos electroporados (segmentos con electrop. discreta), tanto en el lado control como en el lado electroporado **(B)**. Los datos fueron obtenidos desde 3 experimentos independientes, desde los que se obtuvo el promedio \pm SEM. **** $p < 0,0001$; prueba T-Test no pareado.

VIII. DISCUSIÓN

La OSCsp y su región C-terminal contienen múltiples dominios que podrían facilitar su interacción con los componentes del LCRé. En este estudio, se identificaron las proteínas que interactúan con la OSCsp nativa y su región C-terminal en el LCRé. Los resultados sugieren que la OSCsp puede interactuar con estructuras complejas en el LCRé, como partículas de lipoproteínas, vesículas extracelulares y complejos de fibrina, actuando potencialmente como una proteína adaptadora entre estas estructuras. Dentro de estas estructuras, la región C-terminal de OSCsp parece tener una mayor afinidad por vesículas extracelulares y complejos de tipo chaperona, los cuales podrían contribuir a una mayor estabilidad de la proteína en el LCRé. Las repercusiones funcionales de estas interacciones con la región C-terminal conllevan a una disminución en los niveles de proliferación y diferenciación de células N2A y progenitores neurales de la médula espinal.

1 OSCsp nativa posiblemente permite la formación de macro-complejos en el LCRé.

Uno de los hallazgos más significativos de esta tesis fue la identificación de 60 proteínas que interactúan con OSCsp en el LCRé. De manera esperada, entre estas proteínas se identificaron las Apolipoproteína B (APOB), Apolipoproteína A-IV (APOA4), Apolipoproteína A-I (APOA1), Apolipoproteína A-V (APOA5), Angiotensinógeno (AGT) y Clusterina (CLU), lo que sugiere la presencia de lipoproteínas entre los interactores de la OSCsp. Es importante señalar que la interacción de apolipoproteínas con OSCsp en el LCRé, específicamente de LDL y HDL,

ya había sido documentada previamente (Vera et al., 2015). Aunque muchas apolipoproteínas pueden asociarse con diferentes tipos de partículas de lipoproteínas, APOA1 se encuentra predominantemente en HDL (Melchior et al., 2021), mientras que APOB está presente en VLDL y LDL, pero no en HDL (Sniderman et al., 2019). La identificación de estas proteínas confirma la presencia de diferentes tipos de partículas de lipoproteínas que interactúan con OSCsp nativa en el LCR. Esta caracterización resulta particularmente relevante, ya que, al menos en el caso de LDL, su interacción con OSCsp inhibe el efecto diferenciador que ambas proteínas ejercen sobre progenitores neurales de células mesencefálicas (Vera et al., 2015).

Clusterina, también conocida como Apolipoproteína J, es una chaperona extracelular que se encuentra tanto en estado soluble como unido a partículas de LDL, con aproximadamente un 30% de su masa molecular compuesta por glicosilaciones (de Silva et al., 1990). Su actividad chaperona es independiente de ATP y radica en su capacidad para unirse irreversiblemente a proteínas que tienden a precipitar, creando complejos solubles de alto peso molecular. Estos complejos previenen la precipitación de estas proteínas y permiten su posterior replegamiento mediante la acción de la proteína de choque término HSP70 (Heat Shock Protein 70) (Poon et al., 2000). De manera interesante, en embriones de ratón E13.5, se ha observado que las lipoproteínas liberadas desde el epitelio del plexo coroideo hacia el LCR contienen clusterina en su estructura. De hecho, la clusterina presente en partículas de LDL y HDL interactúa directamente con el morfógeno Wnt5A, que viaja a largas distancias por LCR y actúa como un regulador clave de la morfogénesis del diencefalo (Kaiser et al., 2019). Anteriormente, se identificó la presencia de clusterina entre las proteínas que componen la fibra de Reissner (Muñoz et al., 2019), lo que sugiere que esta interacción podría depender de su unión a OSCsp. La identificación de clusterina entre las proteínas que interactúan con OSCsp sugiere un

mecanismo integrador que vincula la formación de lipoproteínas, el transporte de morfógenos, y su capacidad para evitar la formación de agregados, como ocurre en la fibra de Reissner.

El angiotensinógeno (AGT) también fue identificado como uno de los interactores de la región C-terminal de OSCsp, y aunque no forma parte de las partículas de lipoproteínas, se ha demostrado que puede aumentar el procesamiento peroxisomal de partículas de LDL, a través de su receptor AT1 (Singh & Mehta, 2003). Durante el desarrollo embrionario, AGT es una glicoproteína expresada en el plexo coroideo y las células endoteliales que delimitan el tercer ventrículo a partir del día 18 de gestación en fetos de ratón. En este contexto, se cree que está involucrado en la maduración del cerebro, el balance de electrolitos y el desarrollo del sistema sensorimotor (Mungall et al., 1995). Dado que el receptor AT1 se expresa en diferentes regiones cerebrales en contacto con el LCR durante el desarrollo (Mao et al., 2009), la formación de un complejo entre OSC, partículas de LDL y AGT podría facilitar el procesamiento de las partículas de lipoproteínas en estas regiones.

Aparentemente, las lipoproteínas no son el único tipo de partícula que interactúa con la OSCsp nativa. El enriquecimiento del término de ontología génica asociada a vesícula extracelular (GO:1903561) reveló la presencia de múltiples genes relacionados con este tipo de estructura, como son EGF, FN1, RBP4A y ACTG1. Entre estas proteínas, destaca el factor de crecimiento epidérmico (EGF) por su función como morfógeno en el LCR, actuando sobre los progenitores neurales del neuroepitelio mesencefálico y promoviendo tanto la proliferación como la diferenciación de estas células (Lamus et al., 2020). De manera similar, la proteína de unión a retinol 4A (RBP4A) es sintetizada y liberada por el istmo mesencefálico-romboencefálico hacia el LCR, junto con ácido retinoico, lo que permite que este último ejerza su función neurogénica sobre el neuroepitelio (Alonso et al., 2011).

Dado que tanto EGF como RBP4A pueden desplazarse de manera soluble a través del LCR_e, se realizó una búsqueda para identificar otras proteínas dentro de los interactores de OSCsp que pudieran formar parte de vesículas extracelulares, con el objetivo de reafirmar la presencia de estas estructuras. Para ello, se compararon las proteínas identificadas como interactoras de OSCsp con las 100 proteínas principales presentes en vesículas extracelulares, según la base de datos Vesiclepedia (Chitti et al., 2024). Este análisis permitió identificar las proteínas ACTB, ALB, GAPDH, TFRC y A2M como posibles constituyentes de vesículas extracelulares que interactúan con OSCsp nativa. Dado que varias de estas proteínas son clásicamente consideradas como proteínas intracelulares, su presencia en vesículas extracelulares podría justificar su interacción con OSCsp en el LCR_e. En resumen, la unión de OSCsp a vesículas extracelulares podría facilitar el transporte de moléculas de señalización, de manera similar a lo observado en otros procesos biológicos (Baixauli et al., 2014; Buzas et al., 2014).

Como se mencionó anteriormente, vesículas extracelulares de distintos tamaños son liberadas por el neuroepitelio en desarrollo hacia el LCR_e (Marzesco et al., 2005), donde se adhieren a una estructura filamentosa cuya composición aún es desconocida (A. Gato et al., 1993). Dado que OSCsp posiblemente interactúa con este tipo de vesículas y tiene la capacidad de formar complejos con múltiples proteínas gracias a la abundancia de dominios matricelulares en su estructura, en esta tesis se propone que la OSCsp podría mediar la interacción de lipoproteínas y vesículas extracelulares con la red filamentosa observada en el LCR_e. Esta hipótesis se ve reforzada por la identificación de proteínas que forman parte del término de ontología génica de complejos de fibrinógeno (GO: 0005577) y de matriz extracelular con colágeno (GO: 0062023), debido a la presencia de las proteínas FN1, FGA, FGB, FGG, THBS1, SOD3, LUM y VTN entre las proteínas que interaccionan con OSCsp.

La identificación de las cadenas alfa, beta y gamma de fibrinógeno (FGA, FGB y FGG, respectivamente) sugieren fuertemente la presencia de complejos de fibrina entre los interactores de OSCsp. La presencia de estas cadenas, junto con fibronectina, facilita la formación de polímeros de fibrina, que actúan como una matriz provisional en la regeneración de tejidos tras una injuria (Clark et al., 1982; Y. Wang et al., 2014; Weisel & Litvinov, 2017), mecanismo por el cual se podría formar una red provisoria en el LCRa a la cual se adhieran diferentes componentes, como OSCsp, lipoproteínas y vesículas extracelulares. Entre los interactores de OSCsp que podrían unirse a esta red se encuentran APO-AI, que interactúa con fibronectina 1 (FN1), y clusterina, la cual es capaz de formar complejos solubles de gran tamaño con fibrinógeno. Estos complejos de gran tamaño han sido propuestos como vehículos para la agregación de proteínas extracelulares mal plegadas (Wyatt et al., 2009). Dado que APO-AI y clusterina forman parte de partículas de lipoproteína, y fibrinógeno y fibronectina-1 son componentes de complejos de fibrina, la interacción de estas proteínas con OSCsp sugieren que OSCsp podría actuar como una molécula adaptadora entre ambos tipos de estructuras. De hecho, en la fibra de Reissner se han observado filamentos y micro vesículas en su periferia (Muñoz et al., 2019), lo que sugiere que OSCsp podría contribuir a la organización estas estructuras en las etapas temprano de su formación.

2 Interactores de la región C-terminal de OSCsp

Al igual que con la OSCsp nativa, se identificaron las proteínas del LCRa que interactúan con la región C-terminal de OSCsp mediante ensayo pull-down y espectrometría de masas. Este análisis reveló 58 proteínas sobrerrepresentadas en la fracción eluida en comparación con el último lavado. Estas proteínas se clasificaron según su ontología génica para inferir cómo

interactúan los diferentes componentes del LCR_e con la región C-terminal de OSC_{sp}. Entre los términos más enriquecidos se encuentran las chaperoninas que forman el complejo T (GO: 0005832), asociado a la presencia de las proteínas TCP1, CCT2 y CCT3. Estas proteínas, junto con otras cuatro, forman una estructura en forma de anillo denominada el complejo T de chaperonas, que en combinación con HSP70 (*Heat Shock Protein 70*) ha sido asociada a la prevención en la formación de agregados proteicos (Behrends et al., 2006; Grantham, 2020; Sot et al., 2017). Aunque no cumplen con el criterio de enriquecimiento ($\text{Log}_2(\text{FC}) > 3$), CCT7 y CCT8 también están sobrerrepresentadas en la fracción de proteínas eluidas con la región C-terminal de OSC_{sp}. Dado que esta región de OSC_{sp} presenta un índice de inestabilidad superior al 40%, teóricamente no sería capaz de mantenerse de manera soluble por sí sola en un medio acuoso (Guruprasad et al., 1990). Por tanto, la presencia de cinco de las siete proteínas que conforman el complejo T, junto con HSP4 (*Heat Shock Protein 70 member 4*), sugiere fuertemente que el complejo T estaría interactuando con la región C-terminal de OSC_{sp}, permitiendo que se mantenga en un estado soluble e impidiendo su agregación.

Además de las proteínas mencionadas anteriormente, la presencia de PRDX4 contribuye al enriquecimiento del término asociado a plegamiento de proteínas (GO: 0006457). Como se mencionó previamente, PRDX4 es el único miembro de la familia de peroxidoxinas que se localiza en el retículo endoplásmico rugoso y es secretado hacia el espacio extracelular (Dai et al., 2022). Esta proteína participa en el plegamiento de proteínas mediante la oxidación de residuos de cisteína (Zhu et al., 2014), los cuales son abundantes en la región C-terminal de OSC_{sp}. Dado que las proteínas con un alto porcentaje de cisteínas tienden a agregarse, generando un estrés en el retículo endoplásmico, y que este estrés se ha asociado con la formación de agregados de PRDX4 con HSPA y ALDOB (Elko et al., 2021), es plausible que PRDX4 se libere en forma de complejo con la región C-terminal de OSC_{sp}. La presencia de

múltiples proteínas asociadas a actividad chaperona y al plegamiento de proteínas sugiere que estas podrían estar interaccionando con la región C-terminal de OSCsp para prevenir su agregación, permitiendo así que la proteína se mantenga en forma soluble, como se ha observado en múltiples otras proteínas (Hipp et al., 2019; Y. E. Kim et al., 2013).

La presencia de chaperonas en el medio extracelular no es un fenómeno nuevo. De hecho, se ha demostrado que las chaperonas del complejo CCT y HSPA4 pueden viajar a través de exosomas, promoviendo el plegamiento correcto de proteínas en células distantes mediante la transmisión intercelular de chaperonas (Rojas-Gómez et al., 2023; Takeuchi et al., 2015). Al igual que la OSCsp nativa, su región C-terminal también podría estar interaccionando con vesículas extracelulares, como lo sugiere el enriquecimiento del término vesícula extracelular (GO: 1903561), debido a la presencia de CUBN, ALDOB y HSPA4. Para identificar otras proteínas dentro de los interactores de la región C-terminal que podrían formar parte de vesículas extracelulares, se compararon las proteínas identificadas como interactoras de OSCsp con las 100 proteínas principales asociadas a vesículas extracelulares, según la base de datos Vesiclepedia (Chitti et al., 2024). Este análisis reveló la presencia de proteínas asociadas a las chaperonas del complejo CCT, junto con PPIA, FASN, A2M y ACLY. La gran variedad de proteínas que pueden formar parte de exosomas sugiere fuertemente la interacción de la región C-terminal de OSCsp con vesículas extracelulares, al igual que la proteína nativa. Esta interacción podría formar parte de un mecanismo de transporte en vesículas extracelulares de la región C-terminal de OSCsp para evitar la formación de agregados, como ocurre con las proteínas α -sinucleína, β -amiloide y proteínas priónicas en enfermedades neurodegenerativas (Bellingham et al., 2012).

Dentro de las proteínas que interaccionan con la región C-terminal de OSCsp, la interacción con OLFM1 y SEMA3A podría tener implicaciones significativas en la morfogénesis del cerebro. OLFM1 es una glicoproteína secretada que desempeña un papel crucial en la guía axonal (Nakaya et al., 2012), mientras que SEMA3 es un morfógeno importante presente en el LCR que, al interaccionar con neuropilinas, promueven la proliferación de progenitores neurales del neuroepitelio (Gerstmann et al., 2022). La interacción de la región C-terminal de OSCsp con OLFM1 y SEMA3A podría generar consecuencias funcionales en su función morfogénica sobre el neuroepitelio.

Además de su posible interacción con vesículas extracelulares y morfógenos, el enriquecimiento del término asociado al procesamiento de moléculas pequeñas biosintéticas (GO: 0044283) sugiere que la región C-terminal de OSCsp podría estar permitiendo una función de procesamiento de moléculas en el entramado filamentoso observado en el LCR (A. Gato et al., 1993), otorgando una función catalítica a esta estructura. Esto es consistente con la participación de estas proteínas en rutas metabólicas, ya sea como enzimas catabólicas (ALDOB, PGD, ADK, ACLY y FASN) o como regulares del metabolismo (C1QTNF3 y PLTP). La presencia de proteínas intracelulares con acción catalítica ya ha sido reportada previamente en el LCR de otras especies, representando un 16% en humano y un 19% en rata del total de proteínas identificadas (Zappaterra et al., 2007). La alta proporción de proteínas con actividad catalítica en el LCR hace plausible que OSCsp pueda interaccionar con algunas de ellas, siendo su región C-terminal fundamental en esta interacción.

Entre las proteínas metabólicas mencionadas, ALDOB, PGD, ADK y ACLY están también vinculadas a rutas relacionadas con el procesamiento de carbohidratos. Estas proteínas, junto con XXYL1, MGAT2, MAN1B1, ST3GAL1 y DPYS, participan en el enriquecimiento del término carbohidrato derivado de proceso metabólico (GO: 1901135). Su función en los procesos de

glicosilación de proteínas varia, abarcando la formación (MGAT2), elongación (XXYL1), modificación (ST3GAL1) o degradación (MAN1B1) de estas estructuras. Dado que la región C-terminal de OSCsp está glicosilada (Figura 17A), es plausible que la presencia de estas proteínas en el LCRé esté relacionada con la modificación de sus glicosilaciones, lo que podría influir en su capacidad para interactuar con otras proteínas.

La diferencia entre las proteínas que interactúan con OSCsp nativa y aquellas que lo hacen con su región C-terminal en el LCRé podría estar relacionada con la diferencia de complejidad estructural entre ambas proteínas. La OSCsp nativa es una proteína de gran tamaño con múltiples dominios, lo que le podrían permitir interactuar con estructuras de gran tamaño, como las lipoproteínas y las redes filamentosas de fibrina. En contraste, la región C-terminal representa solo una pequeña porción de la proteína completa, lo que podría limitar su capacidad de interactuar diferentes proteínas presentes en estas estructuras.

Además, es importante considerar que la OSCsp nativa fue coimmunoprecipitada en su forma nativa desde el LCRé, lo que sugiere que, si esta proteína forma parte del entramado filamentosos observado al interior de los ventrículos en desarrollo (A. Gato et al., 1993), sería esperable encontrar otras proteínas que conforman dicho entramado. Por otro lado, la interacción entre proteínas del LCRé y la región C-terminal de OSCsp se realizó *in vitro*, lo que permitió la interacción de proteínas solubles con alta avidéz por esta región, pero no permitió evaluar si la región C-terminal es capaz de acomplejar otras proteínas para formar un entramado similar al que podría estar formando la proteína nativa.

3 La región C-terminal de OSCsp presenta N-glicosilaciones en su estructura, y posiblemente forma homodímeros en soluciones acuosas.

Mediante el tratamiento con PGNasa F de la región C-terminal de OSCsp producida de manera recombinante, se identificó que esta región se encuentra N-glicosilada, con aproximadamente un 25% de su masa molecular derivada de este tipo de modificaciones (Figura 17A). Esto concuerda con las modificaciones observadas en la OSCsp nativa, la cual es una glicoproteína de gran tamaño con un patrón complejo de N-glicosilaciones, responsables de entre el 10 y el 25% de su masa molecular. Estas glicosilaciones maduran a medida que la proteína es liberada por las células del OSC, pasando de oligosacáridos ricos en manosa a oligosacáridos de tipo complejo (A. Meiniel et al., 1988; Nualart & Rodríguez, 1996; Rodríguez et al., 1986). Dado que la región C-terminal de OSCsp presenta un alto índice de inestabilidad, la presencia de N-glicosilaciones podría contribuir a la reducción en la dinámica de la proteína, aumentando su estabilidad, como ocurre con gran parte de las proteínas glicosiladas (Lee et al., 2015).

Además, la aparición de una banda adicional de menor masa molecular tras la deglicosilación sugiere la acción de proteasas sobre sitios de corte que quedaron expuestos después de este proceso. Estas proteasas podrían estar presentes en el sobrenadante de cultivo post-transfección, incrementando la actividad sobre la región C-terminal debido al aumento de temperatura necesario para que la enzima PGNasa adquiriera su actividad catalítica y a la ausencia de glicosilaciones que podrían haber impedido su acción por impedimento estérico, como ocurre en otras proteínas (Goettig, 2016). Dado que la metalopeptidasa de matriz 17 (MMP17) es uno de los interactores de la región C-terminal en el LCR_e, es posible que esta u otra proteína de esta familia esté presente en el sobrenadante post-transfección, y que, solo

cuando la proteína recombinante se encuentra deglicosilada se produzca el corte en esta región. La inmunoreactividad de banda adicional contra el epítipo de histidinas sugiere que el corte proteolítico putativo liberaría una región de 7-12 KDa de la región N-terminal de la proteína recombinante, lo cual es consistente con un sitio de corte cercano a los sitios glicosilables N86 y N104.

Además de la presencia de glicosilaciones, la región C-terminal de OSCsp también podría encontrarse de manera monomérica o homodimérica, como lo sugiere el patrón de corrida en condiciones denaturantes y no denaturantes, que reveló la presencia de un doble bandeo cuando la proteína no está denaturada (Figura 17C). La segunda banda muestra una masa molecular cercana al doble del tamaño de la proteína recombinante, lo que sugiere que la región C-terminal de OSCsp podría existir en estado monomérico y dimérico en el sobrenadante post-transfección con pIRES C-term OSCsp. El análisis de modelamiento estructural sugiere que la estructura dimérica podría deberse a la interacción entre dominios CTCK en la proteína (Figura 17D). La formación de dímeros a través de la interacción entre dominios CTCK se encuentra ampliamente documentada, permitiendo la polimerización de homo y heterodímeros con otras proteínas que contienen este dominio (Sun & Davies, 1995), así como en la formación de polímeros largos compuestos por el factor de von Willebrand y mucinas (Javitt et al., 2020). La formación de polímeros es crucial para la formación de la fibra de Reissner, donde se ha demostrado que las glicoproteínas que la componen forman enlaces disulfuro intercatenarios tras ser liberadas por el OSC (Wolf & Sterba, 1972). Aunque la capacidad de OSCsp para formar complejos y contribuir a la formación de la fibra de Reissner ha sido reconocida, este resultado proporciona por primera vez evidencia del dominio que facilita este proceso. Tanto la glicosilación de la región C-terminal de OSCsp como su

capacidad de generar dímeros podrían añadir una nueva capa de complejidad a su interacción con otras proteínas.

4 Efecto anti-proliferativo de la región C-terminal de OSCsp.

Tanto en el tratamiento de células N2A como en el modelo de electroporación de médula espinal, se observó una disminución significativa en la proliferación de progenitores neurales asociada a la presencia de la región C-terminal de OSCsp. Este hallazgo sugiere una función anti-proliferativa de esta región de la proteína sobre las células N2A y los progenitores neurales del neuroepitelio. Esto es consistente con los resultados obtenidos al tratar explantes de mesencéfalo con un medio condicionado que contiene la OSCsp nativa (Vera et al., 2013). A pesar de que la región C-terminal representa solo una parte de la proteína completa, posiblemente se encuentra relacionada con la interacción con componentes extracelulares que actúa como mitógenos sobre los progenitores neurales.

En el caso de las células N2A, se observó que el tratamiento combinado con LCRé y la región C-terminal de OSCsp produce un efecto anti-proliferativo, a pesar de que ambos tratamientos por separado generan efectos pro-proliferativos. Las propiedades pro proliferativas del LCRé ya han sido reportada previamente en progenitores neurales embrionarios y de adulto (Alonso et al., 2017; Yari et al., 2013). De manera interesante, la región C-terminal de OSCsp promueve la proliferación de progenitores neurales cuando se emplea por si sola, al igual que un péptido diseñado a partir de uno de los TSR de OSCsp (Sakka et al., 2014). En cambio, el efecto anti-proliferativo observado con la combinación de ambos tratamientos en conjunto es similar al efecto observado al tratar explantes de mesencéfalo con lipoproteínas y OSCsp nativa, donde cada componente por separado genera un efecto diferenciador sobre los progenitores neurales, mientras que su uso combinado inhibe el efecto diferenciador de ambos por

separado (Vera et al., 2015). Esto sugiere que la región C-terminal de OSCsp podría estar interaccionando con mitógenos en el LCR_e, formando complejos que no son capaces de unirse a determinados receptores en las células N2A, impidiendo así el aumento en la proliferación.

De manera similar a los resultados observados en el tratamiento de células N2A con la región C-terminal de OSCsp, la electroporación del vector pIRES C-term OSCsp en la médula espinal mostró una disminución en el número de células positivas para pH3 en zonas de electroporación masiva. Este hallazgo concuerda con el efecto anti proliferativo observado con la región C-terminal en presencia del LCR_e, lo que sugiere que podrían existir componentes compartidos entre el LCR_e y la MEC que inhiben el efecto proliferativo de esta región sobre los progenitores neurales de la médula espinal.

Al analizar las proteínas que interactúan con la región C-terminal de OSCsp, un posible mitógeno presente tanto en el LCR_e como en la médula espinal que podría ser inhibido por esta región es SEMA3A (Gerstmann et al., 2022; Moret et al., 2007). Este mitógeno participa en la generación de interneuronas corticales a través de la proliferación de progenitores neurales (W. D. Andrews et al., 2017) y también se encuentra expresado por los progenitores neurales de la médula espinal, donde participa en la fasciculación de los axones de neuronas motoras (Moret et al., 2007). En el LCR_e, se ha demostrado que SEMA3s forman complejos con neuropilinas, alterando las fuerzas involucradas en el movimiento interquinético nuclear, lo que resulta en un aumento en la proliferación de los progenitores neurales del neuroepitelio (Gerstmann et al., 2022). Estos antecedentes sugieren que la región C-terminal de OSCsp podría interactuar con SEMA3A, impidiendo su acción como mitógeno sobre los progenitores neurales de médula espinal y de las células N2A.

5 Efecto anti-diferenciador de la región C-terminal de OSCsp

Dado que OSCsp nativa ejerce un efecto diferenciador sobre las células progenitoras de explantes de mesencéfalo (Vera et al., 2013), se investigó si la región C-terminal presenta un efecto similar sobre las células N2A y los progenitores neurales en la médula espinal. A diferencia de otros modelos, en los cuales el LCR_e induce un efecto diferenciador sobre progenitores neurales (A. Meiniel, 2001; Vera et al., 2013, 2015), las células N2A adquirieron un fenotipo menos diferenciado cuando se tratan con LCR_e de acuerdo con los parámetros morfológicos estudiados. Una posible explicación es que el LCR_e, al actuar como un potente mitógeno sobre estas células, podría estar impidiendo su diferenciación, manteniéndolas con una morfología redondeada tras su tratamiento. Esto se refleja en el parámetro de solidez, que indica una morfología redondeada en comparación con el control (Figura 18A).

Además, tanto el sobrenadante control como el que contiene la región C-terminal inducen un fenotipo diferenciado en las células N2A en comparación con el tratamiento control, caracterizado por un mayor perímetro (Figura 28D), una menor área de hull convex, una mayor solidez (Figura 29A) y una menor relación de Ferret (Figura 29B). Esto podría estar relacionado con un aumento en la expresión de BDNF debido a factores de sobrevivencia presentes en el sobrenadante post-transfección, como se observa cuando se utilizan este tipo de sobrenadantes condicionados en el tratamiento de neuronas hipocámpales (Bevinahal et al., 2014). Aunque no se han reportado efectos específicos del sobrenadante de células HEK sobre la diferenciación de células N2A, si se ha determinado que la expresión de BDNF está asociada con un aumento en la longitud de neuritas (Yi et al., 2020).

Al analizar el efecto de los sobrenadantes en combinación con LCRE, se observó que el sobrenadante post transfección control combinado con LCRE induce un fenotipo poco diferenciado, con una morfología similar a la observada con el tratamiento solo con LCRE. Un efecto similar se observa cuando se utilizó el sobrenadante que contiene la región C-terminal de OSCsp en conjunto con LCRE, aunque los parámetros tienen a presentar variaciones asociadas a un fenotipo más diferenciado en comparación con el tratamiento con LCRE. Esto se refleja principalmente en los parámetros de área (Figura 28B), perímetro (Figura 28D), relación de Ferret (Figura 29B) y en el número de ramificaciones periféricas (Figura 30B). Esto sugiere que la región C-terminal de OSCsp podría estar acomplejando moléculas del LCRE, impidiendo que estas ejerzan su efecto diferenciativo total. Este efecto podría deberse en parte a la formación de complejos entre la región C-terminal de OSCsp y SEMAs, como indican los análisis de interactores de la región C-terminal de OSCsp en el LCRE. Dado Sema3a estimula el crecimiento de neuritas (Schwamborn et al., 2004), la formación de complejos con estas moléculas podría impedir el crecimiento de neuritas.

A pesar de que el efecto de la región C-terminal de OSCsp en combinación con el LCRE sobre la diferenciación es leve en comparación con su efecto en proliferación, se observó una disminución significativa en la longitud de las neuritas al comparar el efecto del sobrenadante con la región C-terminal y el sobrenadante control, lo que sugiere un efecto anti-diferenciador de la región C-terminal de OSCsp por si sola, independiente de los factores en el LCRE. Este efecto anti-diferenciador es similar a los resultados obtenidos al analizar el efecto de la electroporación de esta región en la médula espinal de embriones de pollo sobre la señal 3A10, un marcador asociado a neurodiferenciación.

El efecto de la región C-terminal de OSCsp sobre la diferenciación es contrario al observado cuando se utilizó un péptido derivado de un dominio TSR de OSCsp sobre neuronas corticales y células de neuroblastoma en cultivo celular, debido a la activación de receptores de alfa y beta integrinas (Bamdad et al., 2004; F. et al., 2001; Monnerie et al., 1998). Dado que, la activación de estos receptores promueve diferenciación de células neuroepiteliales mediante la acción de decorina y Wnt7a (Long et al., 2016), una posible explicación para el efecto dispar de la región C-terminal de OSCsp con el péptido TSR podría ser que en ambos casos el dominio TSR se une a los receptores de alfa y beta integrinas, pero que en el caso de la región C-terminal los dominios aledaños bloquean los sitios de unión para moléculas efectoras como decorina y Wnt7a.

Dado que 3A10 un marcador de fenotipo neuronal tardío, no es posible concluir si el efecto anti diferenciativo de la región C-terminal de OSC sobre las células de la médula espinal se debe a una reducción en el número de células progenitoras producto de la capacidad anti-proliferativa de la región C-terminal, o si se debe a un mecanismo específico por el cual la región C-terminal mantiene a las células en un estado de diferenciación intermedio debido a un bloqueo de sus receptores de alfa y beta integrinas. Por lo tanto, para evaluar si efectivamente las células se mantienen en un estado indiferenciado es necesario realizar nuevos experimentos en los que se evalúen marcadores específicos para distintas poblaciones asociadas a la diferenciación de los progenitores neurales, como son los marcadores de células de tipo glía radial, neuroblasto y neuronas intermedias.

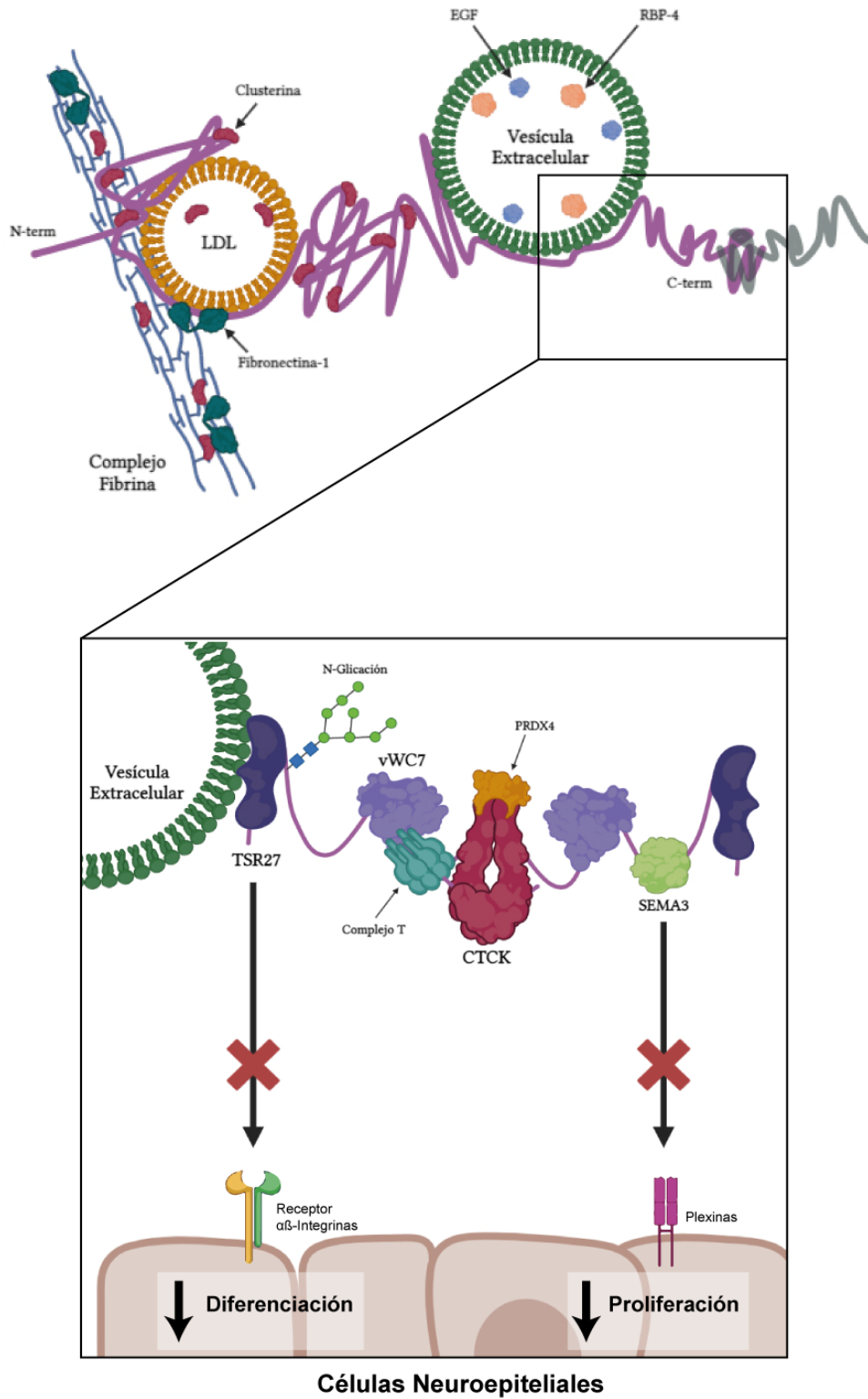


Figura 39. Resumen gráfico de la posible función matricelular de OSCsp nativa y su región C-terminal en el LCRc.

IX. CONCLUSIONES

En base a los hallazgos obtenidos en esta tesis es posible concluir que:

1. La OSCsp nativa interaccionan componentes estructurales extracelulares, lo que avala su función como una proteína matricelular que actúa como adaptadora entre diferentes proteínas, permitiendo la formación de macro-complejos. Dentro de estos complejos destaca la interacción con lipoproteínas, proteínas clásicas de vesículas extracelulares, y fibrinógeno, encargado de formar un entramado proteico en el LCRé.
2. La región C-terminal de OSCsp interacciona principalmente con estructuras de menor tamaño, asociadas a la estabilización de proteínas con capacidad agregativa, además de mitógenos como SEMA3A.
3. La interacción entre la región C-terminal de OSCsp y los componentes del LCRé disminuye el efecto proliferativo y diferenciador del LCRé sobre las células N2A, lo que sugiere la formación de complejos proteicos con moléculas mitogénicas del LCRé, impidiendo su efecto.
4. La expresión de la región C-terminal de OSCsp en la médula espinal tiene un efecto anti proliferativo y anti diferenciador, el cual podría estar relacionado con la interacción con molecular mitogénicas y diferenciadoras presentes en el LCRé y en la MEC.

X. BIBLIOGRAFÍA

- Abreu, J. G., Ketpura, N. I., Reversade, B., & De Robertis, E. M. (2002). Connective-tissue growth factor (CTGF) modulates cell signalling by BMP and TGF- β . *Nature Cell Biology*, 4(8), 599–604. <https://doi.org/10.1038/ncb826>
- Alexandre, C., Baena-Lopez, A., & Vincent, J.-P. (2014). Patterning and growth control by membrane-tethered Wingless. *Nature*, 505(7482), 180–185. <https://doi.org/10.1038/nature12879>
- Alonso, M. I., Gato, A., Moro, J. A., & Barbosa, E. (1998). Disruption of proteoglycans in neural tube fluid by β -D-xyloside alters brain enlargement in chick embryos. *The Anatomical Record*, 252(4), 499–508. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0185\(199812\)252:4<499::AID-AR1>3.0.CO;2-1](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0185(199812)252:4<499::AID-AR1>3.0.CO;2-1)
- Alonso, M. I., Lamus, F., Carnicero, E., Moro, J. A., de la Mano, A., Fernández, J. M. F., Desmond, M. E., & Gato, A. (2017). Embryonic Cerebrospinal Fluid Increases Neurogenic Activity in the Brain Ventricular-Subventricular Zone of Adult Mice. *Frontiers in Neuroanatomy*, 11. <https://doi.org/10.3389/fnana.2017.00124>
- Alonso, M. I., Martín, C., Carnicero, E., Bueno, D., & Gato, A. (2011). Cerebrospinal fluid control of neurogenesis induced by retinoic acid during early brain development. *Developmental Dynamics*, 240(7), 1650–1659. <https://doi.org/10.1002/dvdy.22657>
- Anastasi, C., Rousselle, P., Talantikite, M., Tessier, A., Cluzel, C., Bachmann, A., Mariano, N., Dussoyer, M., Alcaraz, L. B., Fortin, L., Aubert, A., Delolme, F., El Kholti, N., Armengaud, J., Fournié, P., Auxenfans, C., Valcourt, U., Goff, S. V.-L., & Moali, C. (2020). BMP-1 disrupts cell adhesion and enhances TGF- β activation through cleavage of the matricellular protein thrombospondin-1. *Science Signaling*, 13(639), eaba3880. <https://doi.org/10.1126/scisignal.aba3880>
- Andrews, M. G., del Castillo, L. M., Ochoa-Bolton, E., Yamauchi, K., Smogorzewski, J., & Butler, S. J. (2017). BMPs direct sensory interneuron identity in the developing spinal cord using signal-specific not morphogenic activities. *ELife*, 6. <https://doi.org/10.7554/eLife.30647>
- Andrews, W. D., Barber, M., Nemitz, M., Memi, F., & Parnavelas, J. G. (2017). Semaphorin3A–neuropilin1 signalling is involved in the generation of cortical interneurons. *Brain Structure and Function*, 222(5), 2217–2233. <https://doi.org/10.1007/s00429-016-1337-3>
- Bachy, I., Kozyraki, R., & Wassef, M. (2008). The particles of the embryonic cerebrospinal fluid : How could they influence brain development ? *Brain Research Bulletin*, 75, 289–294. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2007.10.010>
- Baixauli, F., López-Otán, C., & Mittelbrunn, M. (2014). Exosomes and Autophagy: Coordinated Mechanisms for the Maintenance of Cellular Fitness. *Frontiers in Immunology*, 5. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00403>

- Ball, D., Rachfal, A., Kemper, S., & Brigstock, D. (2003). The heparin-binding 10 kDa fragment of connective tissue growth factor (CTGF) containing module 4 alone stimulates cell adhesion. *Journal of Endocrinology*, *176*(2), R1–R7. <https://doi.org/10.1677/joe.0.176r001>
- Bamdad, M., Volle, D., Dastugue, B., & Meiniel, A. (2004). $\alpha 1\beta 1$ -Integrin is an for neurite outgrowth induced by thrombospondin type 1 of SCO-spondin. *Cell and Tissue Research*, *315*(1), 15–25. <https://doi.org/10.1007/s00441-003-0793-2>
- Behrends, C., Langer, C. A., Boteva, R., Böttcher, U. M., Stemp, M. J., Schaffar, G., Rao, B. V., Giese, A., Kretzschmar, H., Siegers, K., & Hartl, F. U. (2006). Chaperonin TRiC Promotes the Assembly of polyQ Expansion Proteins into Nontoxic Oligomers. *Molecular Cell*, *23*(6), 887–897. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2006.08.017>
- Bellingham, S. A., Guo, B. B., Coleman, B. M., & Hill, A. F. (2012). Exosomes: Vehicles for the Transfer of Toxic Proteins Associated with Neurodegenerative Diseases? *Frontiers in Physiology*, *3*. <https://doi.org/10.3389/fphys.2012.00124>
- Bevinahal, P. K. K., Venugopal, C., Yencharla, H. C. P. S., Chandanala, S., Trichur, R. R., Talakad, S. N., Bhonde, R. R., & Dhanushkodi, A. (2014). Conditioned Medium Reconditions Hippocampal Neurons against Kainic Acid Induced Excitotoxicity: An *In Vitro* Study. *Journal of Toxicology*, *2014*, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2014/194967>
- Birge, W. J., Rose, A. D., Haywood, J. R., & Doolin, P. F. (1974). Development of the blood-cerebrospinal fluid barrier to proteins and differentiation of cerebrospinal fluid in the chick embryo. *Developmental Biology*, *41*(2), 245–254. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(74\)90303-0](https://doi.org/10.1016/0012-1606(74)90303-0)
- Bjornsson, C. S., Apostolopoulou, M., Tian, Y., & Temple, S. (2015). It Takes a Village: Constructing the Neurogenic Niche. *Developmental Cell*, *32*(4), 435–446. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2015.01.010>
- Bochter, M. S., Servello, D., Kakuda, S., D’Amico, R., Ebetino, M. F., Haltiwanger, R. S., & Cole, S. E. (2022). Lfng and Dll3 cooperate to modulate protein interactions in cis and coordinate oscillatory Notch pathway activation in the segmentation clock. *Developmental Biology*, *487*, 42–56. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2022.04.004>
- Bornstein, P. (1995). Diversity of function is inherent in matricellular proteins: an appraisal of thrombospondin 1. *The Journal of Cell Biology*, *130*(3), 503–506. <https://doi.org/10.1083/jcb.130.3.503>
- Bornstein, P., & Sage, E. H. (2002). Matricellular proteins: extracellular modulators of cell function Bornstein and Sage 609. *Current Opinion in Cell Biology*, *14*(5), 608–616.
- Bräutigam, K., Vakis, A., & Tsitsipanis, C. (2019). Pathogenesis of idiopathic Normal Pressure Hydrocephalus: A review of knowledge. *Journal of Clinical Neuroscience*, *61*, 10–13. <https://doi.org/10.1016/j.jocn.2018.10.147>
- Briscoe, J., & Small, S. (2015). Morphogen rules: design principles of gradient-mediated embryo patterning. *Development*, *142*(23), 3996–4009. <https://doi.org/10.1242/dev.129452>

- Bueno, D., Parvas, M., & Garcia-Fernández, J. (2014). The embryonic blood-cerebrospinal fluid barrier function before the formation of the fetal choroid plexus: role in cerebrospinal fluid formation and homeostasis. *Croatian Medical Journal*, *55*(4), 306–316. <https://doi.org/10.3325/cmj.2014.55.306>
- Bueno, D., Parvas, M., Nabiuni, M., & Miyan, J. (2020). Embryonic cerebrospinal fluid formation and regulation. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, *102*(July), 3–12. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2019.09.006>
- Buzas, E. I., György, B., Nagy, G., Falus, A., & Gay, S. (2014). Emerging role of extracellular vesicles in inflammatory diseases. *Nature Reviews Rheumatology*, *10*(6), 356–364. <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2014.19>
- Campana, C., van Koetsveld, P. M., Feelders, R. A., de Herder, W. W., Iyer, A. M., van Velthuysen, M.-L. F., Veenstra, M. J., van den Dungen, E. S. R., Franck, S. E., Ferone, D., Gatto, F., & Hofland, L. J. (2022). Digital quantification of somatostatin receptor subtype 2a immunostaining: a validation study. *European Journal of Endocrinology*, *187*(3), 399–411. <https://doi.org/10.1530/EJE-22-0339>
- Cantaut-Belarif, Y., Sternberg, J. R., Thouvenin, O., Wyart, C., & Bardet, P. L. (2018). The Reissner Fiber in the Cerebrospinal Fluid Controls Morphogenesis of the Body Axis. *Current Biology*, *28*(15), 2479–2486.e4. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.05.079>
- Carnicero, E., Alonso, M. I., Carretero, R., Lamus, F., Moro, J. A., De La Mano, A., Fernández, J. M. F., & Gato, A. (2014). Embryonic cerebrospinal fluid activates neurogenesis of neural precursors within the subventricular zone of the adult mouse brain. *Cells Tissues Organs*, *198*(5), 398–404. <https://doi.org/10.1159/000356983>
- Castells, A., Parvas, M., & Bueno, D. (2012). Homeostasis of cerebrospinal fluid has a role in early brain development. *NeuroReport*, *23*(16), 917–921. <https://doi.org/10.1097/WNR.0b013e3283582067>
- Cavanagh, M. E., Cornelis, M. E. P., Dziegielewska, K. M., Evans, C. A. N., Lorscheider, F. L., Møllgård, K., Reynolds, M. L., & Saunders, N. R. (1983). Comparison of proteins in CSF of lateral and IVth ventricles during early development of fetal sheep. *Developmental Brain Research*, *11*(2), 159–167. [https://doi.org/10.1016/0165-3806\(83\)90213-4](https://doi.org/10.1016/0165-3806(83)90213-4)
- Chau, K. F., Springel, M. W., Broadbelt, K. G., Park, H., Topal, S., Lun, M. P., Mullan, H., Maynard, T., Steen, H., LaMantia, A. S., & Lehtinen, M. K. (2015). Progressive Differentiation and Instructive Capacities of Amniotic Fluid and Cerebrospinal Fluid Proteomes following Neural Tube Closure. *Developmental Cell*, *35*(6), 789–802. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2015.11.015>
- Chen, H., Herndon, M. E., & Lawler, J. (2000). The cell biology of thrombospondin-1. *Matrix Biology*, *19*(7), 597–614. [https://doi.org/10.1016/S0945-053X\(00\)00107-4](https://doi.org/10.1016/S0945-053X(00)00107-4)
- Chitti, S. V., Gummadi, S., Kang, T., Shahi, S., Marzan, A. L., Nedeva, C., Sanwlani, R., Bramich, K., Stewart, S., Petrovska, M., Sen, B., Ozkan, A., Akinfenwa, M., Fonseka, P., & Mathivanan, S.

- (2024). Vesiclepedia 2024: an extracellular vesicles and extracellular particles repository. *Nucleic Acids Research*, 52(D1), D1694–D1698. <https://doi.org/10.1093/nar/gkad1007>
- Chung, H.-Y., Chang, C.-T., Young, H.-W., Hu, S. P., Tzou, W.-S., & Hu, C.-H. (2013). Ethanol inhibits retinal and CNS differentiation due to failure of cell cycle exit via an apoptosis-independent pathway. *Neurotoxicology and Teratology*, 38, 92–103. <https://doi.org/10.1016/j.ntt.2013.05.006>
- Clark, R. A. F., Lanigan, J. M., DellaPelle, P., Manseau, E., Dvorak, H. F., & Colvin, R. B. (1982). Fibronectin and Fibrin Provide a Provisional Matrix for Epidermal Cell Migration During Wound Reepithelialization. *Journal of Investigative Dermatology*, 79(5), 264–269. <https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12500075>
- Cox, J., & Mann, M. (2008). MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nature Biotechnology*, 26(12), 1367–1372. <https://doi.org/10.1038/nbt.1511>
- Cui, Y., Li, C., Wang, H., Li, L., Xie, J., Zhou, X., Zhang, H., & Sun, J. (2024). Hemicentin-1 is an essential extracellular matrix component during tooth root formation by promoting mesenchymal cells differentiation. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fcell.2024.1435241>
- Cushing, H. (1914). Studies on the Cerebro-Spinal Fluid : I. Introduction. *The Journal of Medical Research*, 31(1), 1–19.
- Daems, M., Peacock, H. M., & Jones, E. A. V. (2020). Fluid flow as a driver of embryonic morphogenesis. *Development*, 147(15). <https://doi.org/10.1242/dev.185579>
- Dai, W., Zou, X., Jia, H., Peng, Y., La, B., Yan, Z., Gao, L., Qin, L., Diao, F., Ma, X., Meng, Y., Cui, Y., & Liu, J. (2022). Peroxiredoxin 4 secreted by cumulus cells ameliorates the maturation of oocytes in vitro. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 636, 155–161. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2022.10.073>
- Danesin, C., Agius, E., Escalas, N., Ai, X., Emerson, C., Cochard, P., & Soula, C. (2006). Ventral Neural Progenitors Switch toward an Oligodendroglial Fate in Response to Increased Sonic Hedgehog (Shh) Activity: Involvement of Sulfatase 1 in Modulating Shh Signaling in the Ventral Spinal Cord. *The Journal of Neuroscience*, 26(19), 5037–5048. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0715-06.2006>
- Date, P., Ackermann, P., Furey, C., Fink, I. B., Jonas, S., Khokha, M. K., Kahle, K. T., & Deniz, E. (2019). Visualizing flow in an intact CSF network using optical coherence tomography: implications for human congenital hydrocephalus. *Scientific Reports*, 9(1), 6196. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-42549-4>
- Dattatreyamurthy, B., Roux, E., Horbinski, C., Kaplan, P. L., Robak, L. A., Beck, H. N., Lein, P., Higgins, D., & Chandrasekaran, V. (2001). Cerebrospinal Fluid Contains Biologically Active Bone Morphogenetic Protein-7. *Experimental Neurology*, 172(2), 273–281. <https://doi.org/10.1006/exnr.2001.7728>

- de Silva, H. V., Stuart, W. D., Park, Y. B., Mao, S. J., Gil, C. M., Wetterau, J. R., Busch, S. J., & Harmony, J. A. (1990). Purification and characterization of apolipoprotein J. *Journal of Biological Chemistry*, 265(24), 14292–14297. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)77299-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)77299-2)
- Delétage, N., Le Douce, J., Callizot, N., Godfrin, Y., & Lemarchant, S. (2021). SCO-spondin-derived Peptide Protects Neurons from Glutamate-induced Excitotoxicity. *Neuroscience*, 463, 317–336. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2021.02.005>
- Dendy, A. (1902). On a pair of ciliated grooves in the brain of the ammocœte apparently serving to promote the circulation of the fluid in the brain-cavity. *Proceedings of the Royal Society of London*, 69(451–458), 485–494. <https://doi.org/10.1098/rspl.1901.0136>
- Dendy, A., & Nicholls, G. E. (1910). On the occurrence of a mesocœlic recess in the human brain, and its relation to the sub-commissural organ of lower vertebrates; with special reference to the distribution of Reissner's fibre in the vertebrate series and its possible function. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Containing Papers of a Biological Character*, 82(558), 515–529. <https://doi.org/10.1098/rspb.1910.0046>
- Desmond, M. E. (1985). Reduced number of brain cells in so-called neural overgrowth. *The Anatomical Record*, 212(2), 195–198. <https://doi.org/10.1002/ar.1092120214>
- Desmond, M. E., & Jacobson, A. G. (1977). Embryonic brain enlargement requires cerebrospinal fluid pressure. *Developmental Biology*, 57(1), 188–198. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(77\)90364-5](https://doi.org/10.1016/0012-1606(77)90364-5)
- Desmond, M. E., Knepper, J. E., Dibenedetto, A. J., Malaugh, E., Callejo, S., Carretero, R., Alonso, M.-I., & Gato, A. (2014). Focal adhesion kinase as a mechanotransducer during rapid brain growth of the chick embryo. *The International Journal of Developmental Biology*, 58(1), 35–43. <https://doi.org/10.1387/ijdb.130305md>
- Desmond, M. E., & Levitan, M. L. (2002). Brain expansion in the chick embryo initiated by experimentally produced occlusion of the spinal neurocoel. *The Anatomical Record*, 268(2), 147–159. <https://doi.org/10.1002/ar.10146>
- Desmond, M. E., Levitan, M. L., & Haas, A. R. (2005). Internal luminal pressure during early chick embryonic brain growth: Descriptive and empirical observations. *The Anatomical Record Part A: Discoveries in Molecular, Cellular, and Evolutionary Biology*, 285A(2), 737–747. <https://doi.org/10.1002/ar.a.20211>
- Dessaud, E., Yang, L. L., Hill, K., Cox, B., Ulloa, F., Ribeiro, A., Mynett, A., Novitch, B. G., & Briscoe, J. (2007). Interpretation of the sonic hedgehog morphogen gradient by a temporal adaptation mechanism. *Nature*, 450(7170), 717–720. <https://doi.org/10.1038/nature06347>
- Didier, R., Creveaux, I., Meiniel, R., Herbet, A., Dastugue, B., & Meiniel, A. (2000). SCO-spondin and RF-GlyI: Two designations for the same glycoprotein secreted by the subcommissural organ. *Journal of Neuroscience Research*, 61(5), 500–507. [https://doi.org/10.1002/1097-4547\(20000901\)61:5<500::AID-JNR4>3.0.CO;2-L](https://doi.org/10.1002/1097-4547(20000901)61:5<500::AID-JNR4>3.0.CO;2-L)

- Didier, R., Meiniel, O., & Meiniel, A. (2007). Molecular cloning and early expression of chick embryo SCO-spondin. *Cell and Tissue Research*, *327*(1), 111–119. <https://doi.org/10.1007/s00441-006-0259-4>
- Didier-Bazes, M., Chouaf, L., Hardin, H., Aguera, M., Voutsinos, B., & Belin, M. F. (1992). *Chapter 45: Developmental neuron-glia interactions: role of serotonin innervation upon the differentiation of the ependymocytes of the rat subcommissural organ* (pp. 343–347). [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(08\)62352-3](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(08)62352-3)
- Dos Santos, C., Blanc, C., Elahouel, R., Prescott, M., Carpentier, G., Ori, A., Courty, J., Hamma-Kourbali, Y., Fernig, D. G., & Delbé, J. (2014). Proliferation and migration activities of fibroblast growth factor-2 in endothelial cells are modulated by its direct interaction with heparin affinity regulatory peptide. *Biochimie*, *107*(PB), 350–357. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2014.10.002>
- Dziegielewska, K. M., Evans, C. A. N., Lai, P. C. W., Lorscheider, F. L., Malinowska, D. H., Møllgrd, K., & Saunders, N. R. (1981). Proteins in cerebrospinal fluid and plasma of fetal rats during development. *Developmental Biology*, *83*(1), 193–200. [https://doi.org/10.1016/S0012-1606\(81\)80024-3](https://doi.org/10.1016/S0012-1606(81)80024-3)
- Dziegielewska, K. M., Evans, C. A. N., Malinowska, D. H., Møllgård, K., Reynolds, M. L., & Saunders, N. R. (1980). Blood—cerebrospinal fluid transfer of plasma proteins during fetal development in the sheep. *The Journal of Physiology*, *300*(1), 457–465. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1980.sp013172>
- El Bitar, F., Dastugue, B., & Meiniel, A. (1999). Neuroblastoma B104 cell line as a model for analysis of neurite outgrowth and neuronal aggregation induced by Reissner's fiber material. *Cell and Tissue Research*, *298*(2), 233–242. <https://doi.org/10.1007/s004419900081>
- El-Gammal, S. (1981). The development of the diencephalic choroid plexus in the chick. *Cell and Tissue Research*, *219*(2). <https://doi.org/10.1007/BF00210150>
- Elko, E. A., Manuel, A. M., White, S., Zito, E., van der Vliet, A., Anathy, V., & Janssen-Heininger, Y. M. W. (2021). Oxidation of peroxiredoxin-4 induces oligomerization and promotes interaction with proteins governing protein folding and endoplasmic reticulum stress. *Journal of Biological Chemistry*, *296*, 100665. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.100665>
- F El-Bitar, M Bamdad, B Dastugue & A. Meiniel. (2001). Effects of SCO-spondin thrombospondin type 1 repeats (TSR) in comparison to Reissner's fiber material on the differentiation of the B104 neuroblastoma cell line. *Cell and Tissue Research*, *304*(3), 361–369. <https://doi.org/10.1007/s004410100383>
- Fame, R. M., & Lehtinen, M. K. (2020). Emergence and Developmental Roles of the Cerebrospinal Fluid System. *Developmental Cell*, *52*(3), 261–275. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2020.01.027>
- Farhad Mashayekhi1 and Zivar Salehi. (2011). Relative expression of hepatocyte growth factor in cerebrospinal fluid during mouse embryonic development and early postnatal stage; A Western Blot analysis. *Annals of Biological Research*, *2*(5), 1–7.

- Farkas, C., Recabal, A., Mella, A., Candia-Herrera, D., Olivero, M. G., Haigh, J. J., Tarifeño-Saldivia, E., & Caprile, T. (2022). annotate_my_genomes: an easy-to-use pipeline to improve genome annotation and uncover neglected genes by hybrid RNA sequencing. *GigaScience*, *11*.
<https://doi.org/10.1093/gigascience/giac099>
- Farreny, M.-A., Agius, E., Bel-Vialar, S., Escalas, N., Khouri-Farah, N., Soukkarieh, C., Danesin, C., Pituello, F., Cochard, P., & Soula, C. (2018). FGF signaling controls Shh-dependent oligodendroglial fate specification in the ventral spinal cord. *Neural Development*, *13*(1), 3.
<https://doi.org/10.1186/s13064-018-0100-2>
- Fielitz, W., Esteves, A., & Moro, R. (1984). Protein composition of cerebrospinal fluid in the developing chick embryo. *Developmental Brain Research*, *13*(1), 111–115.
[https://doi.org/10.1016/0165-3806\(84\)90082-8](https://doi.org/10.1016/0165-3806(84)90082-8)
- Gao, R. (2006). A novel integrin 5 1 binding domain in module 4 of connective tissue growth factor (CCN2/CTGF) promotes adhesion and migration of activated pancreatic stellate cells. *Gut*, *55*(6), 856–862. <https://doi.org/10.1136/gut.2005.079178>
- Gao, R., & Brigstock, D. R. (2004). Connective Tissue Growth Factor (CCN2) Induces Adhesion of Rat Activated Hepatic Stellate Cells by Binding of Its C-terminal Domain to Integrin $\alpha\beta 3$ and Heparan Sulfate Proteoglycan. *Journal of Biological Chemistry*, *279*(10), 8848–8855.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M313204200>
- García-Lecea, M., Kondrychyn, I., Fong, S. H., Ye, Z.-R., & Korzh, V. (2008). In vivo analysis of choroid plexus morphogenesis in zebrafish. *PLoS One*, *3*(9), e3090.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003090>
- Garis, M., Meyer, M. D., & Lwigale, P. (2024). Expression of Nephronectin in the Descemet's membrane of mouse corneas during development and adult homeostasis. *Experimental Eye Research*, *240*, 109797. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2024.109797>
- Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M. R., Appel, R. D., & Bairoch, A. (2005). Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. In *The Proteomics Protocols Handbook* (pp. 571–607). Humana Press. <https://doi.org/10.1385/1-59259-890-0:571>
- Gato, A., Alonso, M. I., Martín, C., Carnicero, E., Moro, J. A., De la Mano, A., Fernández, J. M. F., Lamus, F., & Desmond, M. E. (2014). Embryonic cerebrospinal fluid in brain development: Neural progenitor control. *Croatian Medical Journal*, *55*(4), 299–305.
<https://doi.org/10.3325/cmj.2014.55.299>
- Gato, A., & Desmond, M. E. (2009). Why the embryo still matters: CSF and the neuroepithelium as interdependent regulators of embryonic brain growth, morphogenesis and histogenesis. *Developmental Biology*, *327*(2), 263–272. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2008.12.029>
- Gato, A., Martín, P., Alonso, M. I., Martín, C., Pulgar, M. A., & Moro, J. A. (2004). Analysis of cerebro-spinal fluid protein composition in early developmental stages in chick embryos. *Journal of Experimental Zoology Part A: Comparative Experimental Biology*, *301A*(4), 280–289. <https://doi.org/10.1002/jez.a.20035>

- Gato, Á., Moro, J. A., Alonso, M. I., Bueno, D., De La Mano, A., & Martín, C. (2005). Embryonic cerebrospinal fluid regulates neuroepithelial survival, proliferation, and neurogenesis in chick embryos. *The Anatomical Record Part A: Discoveries in Molecular, Cellular, and Evolutionary Biology*, 284A(1), 475–484. <https://doi.org/10.1002/ar.a.20185>
- Gato, A., Moro, J. A., Alonso, M. I., Pastor, J. F., Represa, J. J., & Barbosa, E. (1993). Chondroitin sulphate proteoglycan and embryonic brain enlargement in the chick. *Anatomy and Embryology*, 188(1). <https://doi.org/10.1007/BF00191455>
- Ge, S. X., Jung, D., & Yao, R. (2020). ShinyGO: a graphical gene-set enrichment tool for animals and plants. *Bioinformatics*, 36(8), 2628–2629. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btz931>
- Gerstmann, K., Kindbeiter, K., Telley, L., Bozon, M., Reynaud, F., Théouille, E., Charoy, C., Jabaudon, D., Moret, F., & Castellani, V. (2022). A balance of noncanonical Semaphorin signaling from the cerebrospinal fluid regulates apical cell dynamics during corticogenesis. *Science Advances*, 8(46). <https://doi.org/10.1126/sciadv.abo4552>
- Gobron, S., Creveaux, I., Meiniel, R., Didier, R., Herbet, A., Bamdad, M., El Bitar, F., Dastugue, B., & Meiniel, A. (2000). Subcommissural organ/Reissner's fiber complex: characterization of SCO-spondin, a glycoprotein with potent activity on neurite outgrowth. *Glia*, 32(2), 177–191. [https://doi.org/10.1002/1098-1136\(200011\)32:2<177::aid-glia70>3.0.co;2-v](https://doi.org/10.1002/1098-1136(200011)32:2<177::aid-glia70>3.0.co;2-v)
- Gobron, S., Monnerie, H., Meiniel, R., Creveaux, I., Lehmann, W., Lamalle, D., Dastugue, B., & Meiniel, A. (1996). SCO-spondin: a new member of the thrombospondin family secreted by the subcommissural organ is a candidate in the modulation of neuronal aggregation. *Journal of Cell Science*, 109 (Pt 5), 1053–1061. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8743952>
- Goettig, P. (2016). Effects of Glycosylation on the Enzymatic Activity and Mechanisms of Proteases. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(12), 1969. <https://doi.org/10.3390/ijms17121969>
- González Loyola, M. A. (2015). *Variación del LCR-E durante etapas tempranas del desarrollo*. Universidad de Concepción.
- Grantham, J. (2020). The Molecular Chaperone CCT/TRiC: An Essential Component of Proteostasis and a Potential Modulator of Protein Aggregation. *Frontiers in Genetics*, 11. <https://doi.org/10.3389/fgene.2020.00172>
- Green, M. R., & Sambrook, J. (2018). The Hanahan Method for Preparation and Transformation of Competent *Escherichia coli* : High-Efficiency Transformation. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2018(3), pdb.prot101188. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot101188>
- Guerra, M. M., González, C., Caprile, T., Jara, M., Vío, K., Muñoz, R. I., Rodríguez, S., & Rodríguez, E. M. (2015). Understanding how the subcommissural organ and other periventricular secretory structures contribute via the cerebrospinal fluid to neurogenesis. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 9(DEC), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fncel.2015.00480>
- Guillon-Munos, A., Oikonomopoulou, K., Michel, N., Smith, C. R., Petit-Courty, A., Canepa, S., Reverdiau, P., Heuzé-Vourc'h, N., Diamandis, E. P., & Courty, Y. (2011). Kallikrein-related

- Peptidase 12 Hydrolyzes Matricellular Proteins of the CCN Family and Modifies Interactions of CCN1 and CCN5 with Growth Factors. *Journal of Biological Chemistry*, 286(29), 25505–25518. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.213231>
- Guruprasad, K., Reddy, B. V. B., & Pandit, M. W. (1990). Correlation between stability of a protein and its dipeptide composition: a novel approach for predicting *in vivo* stability of a protein from its primary sequence. *Protein Engineering, Design and Selection*, 4(2), 155–161. <https://doi.org/10.1093/protein/4.2.155>
- Hachim, D., Whittaker, T. E., Kim, H., & Stevens, M. M. (2019). Glycosaminoglycan-based biomaterials for growth factor and cytokine delivery: Making the right choices. *Journal of Controlled Release*, 313, 131–147. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2019.10.018>
- Hamburger, V., & Hamilton, H. L. (1992). A series of normal stages in the development of the chick embryo. 1951. *Developmental Dynamics : An Official Publication of the American Association of Anatomists*, 195(4), 231–272. <https://doi.org/10.1002/aja.1001950404>
- Hassija, V., Chamola, V., Mahapatra, A., Singal, A., Goel, D., Huang, K., Scardapane, S., Spinelli, I., Mahmud, M., & Hussain, A. (2024). Interpreting Black-Box Models: A Review on Explainable Artificial Intelligence. *Cognitive Computation*, 16(1), 45–74. <https://doi.org/10.1007/s12559-023-10179-8>
- Heanue, T. A., Shepherd, I. T., & Burns, A. J. (2016). Enteric nervous system development in avian and zebrafish models. *Developmental Biology*, 417(2), 129–138. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2016.05.017>
- Hipp, M. S., Kasturi, P., & Hartl, F. U. (2019). The proteostasis network and its decline in ageing. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 20(7), 421–435. <https://doi.org/10.1038/s41580-019-0101-y>
- Holbourn, K. P., Acharya, K. R., & Perbal, B. (2008). The CCN family of proteins: structure-function relationships. *Trends in Biochemical Sciences*, 33(10), 461–473. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2008.07.006>
- Hollyday, M. (2001). Neurogenesis in the vertebrate neural tube. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 19(2), 161–173. [https://doi.org/10.1016/S0736-5748\(00\)00093-9](https://doi.org/10.1016/S0736-5748(00)00093-9)
- Hoyo-Becerra, C., López-Ávalos, M. D., Cifuentes, M., Visser, R., Fernández-Llebrez, P., & Grondona, J. M. (2010). The subcommissural organ and the development of the posterior commissure in chick embryos. *Cell and Tissue Research*, 339(2), 383–395. <https://doi.org/10.1007/s00441-009-0899-2>
- Hoyo-Becerra, C., López-Ávalos, M. D., Pérez, J., Miranda, E., Rojas-Ríos, P., Fernández-Llebrez, P., & Grondona, J. M. (2006). Continuous delivery of a monoclonal antibody against Reissner's fiber into CSF reveals CSF-soluble material immunorelated to the subcommissural organ in early chick embryos. *Cell and Tissue Research*, 326(3), 771–786. <https://doi.org/10.1007/s00441-006-0231-3>

- Huang, L.-K., & Wang, M.-J. J. (1995). Image thresholding by minimizing the measures of fuzziness. *Pattern Recognition*, 28(1), 41–51. [https://doi.org/10.1016/0031-3203\(94\)E0043-K](https://doi.org/10.1016/0031-3203(94)E0043-K)
- Huang, X., Liu, J., Ketova, T., Fleming, J. T., Grover, V. K., Cooper, M. K., Litingtung, Y., & Chiang, C. (2010). Transventricular delivery of sonic hedgehog is essential to cerebellar ventricular zone development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(18), 8422–8427. <https://doi.org/10.1073/pnas.0911838107>
- Jacobson, A. G., & Gordon, R. (1976). Changes in the shape of the developing vertebrate nervous system analyzed experimentally, mathematically and by computer simulation. *Journal of Experimental Zoology*, 197(2), 191–246. <https://doi.org/10.1002/jez.1401970205>
- Javitt, G., Khmel'nitsky, L., Albert, L., Bigman, L. S., Elad, N., Morgenstern, D., Ilani, T., Levy, Y., Diskin, R., & Fass, D. (2020). Assembly Mechanism of Mucin and von Willebrand Factor Polymers. *Cell*, 183(3), 717-729.e16. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.09.021>
- Johansson, P. A., Irmeler, M., Acampora, D., Beckers, J., Simeone, A., & Götz, M. (2013). The transcription factor Otx2 regulates choroid plexus development and function. *Development (Cambridge)*, 140(5), 1055–1066. <https://doi.org/10.1242/dev.090860>
- Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A., Green, T., Figurnov, M., Ronneberger, O., Tunyasuvunakool, K., Bates, R., Žídek, A., Potapenko, A., Bridgland, A., Meyer, C., Kohl, S. A. A., Ballard, A. J., Cowie, A., Romera-Paredes, B., Nikolov, S., Jain, R., Adler, J., ... Hassabis, D. (2021). Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature*, 596(7873), 583–589. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2>
- Kaiser, K., Gyllborg, D., Procházka, J., Salašová, A., Kompaníková, P., Molina, F. L., Laguna-Goya, R., Radaszkiewicz, T., Harnoš, J., Procházková, M., Potěšil, D., Barker, R. A., Casado, Á. G., Zdráhal, Z., Sedláček, R., Arenas, E., Villaescusa, J. C., & Bryja, V. (2019). WNT5A is transported via lipoprotein particles in the cerebrospinal fluid to regulate hindbrain morphogenesis. *Nature Communications*, 10(1), 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09298-4>
- Kim, J.-Y., Jeong, H. S., Chung, T., Kim, M., Lee, J. H., Jung, W. H., & Koo, J. S. (2017). The value of phosphohistone H3 as a proliferation marker for evaluating invasive breast cancers: A comparative study with Ki67. *Oncotarget*, 8(39), 65064–65076. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.17775>
- Kim, Y. E., Hipp, M. S., Bracher, A., Hayer-Hartl, M., & Ulrich Hartl, F. (2013). Molecular Chaperone Functions in Protein Folding and Proteostasis. *Annual Review of Biochemistry*, 82(1), 323–355. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060208-092442>
- Kokovay, E., Wang, Y., Kusek, G., Wurster, R., Lederman, P., Lowry, N., Shen, Q., & Temple, S. (2012). VCAM1 Is Essential to Maintain the Structure of the SVZ Niche and Acts as an Environmental Sensor to Regulate SVZ Lineage Progression. *Cell Stem Cell*, 11(2), 220–230. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2012.06.016>

- Kolle, G., Jansen, A., Yamada, T., & Little, M. (2003). In ovo electroporation of *Crim1* in the developing chick spinal cord. *Developmental Dynamics*, 226(1), 107–111. <https://doi.org/10.1002/dvdy.10204>
- Kramer, R. H., Cheng, Y. F., & Clyman, R. (1990). Human microvascular endothelial cells use beta 1 and beta 3 integrin receptor complexes to attach to laminin. *The Journal of Cell Biology*, 111(3), 1233–1243. <https://doi.org/10.1083/jcb.111.3.1233>
- Kubota, S., & Takigawa, M. (2013). The CCN family acting throughout the body: recent research developments. *BioMolecular Concepts*, 4(5), 477–494. <https://doi.org/10.1515/bmc-2013-0018>
- Lamus, F., Martín, C., Carnicero, E., Moro, J. A., Fernández, J. M. F., Mano, A., Gato, & Alonso, M. I. (2020). FGF2/EGF contributes to brain neuroepithelial precursor proliferation and neurogenesis in rat embryos: the involvement of embryonic cerebrospinal fluid. *Developmental Dynamics*, 249(1), 141–153. <https://doi.org/10.1002/dvdy.135>
- Latinkic, B. V. (2003). Xenopus Cyr61 regulates gastrulation movements and modulates Wnt signalling. *Development*, 130(11), 2429–2441. <https://doi.org/10.1242/dev.00449>
- Lau, L. F. (2016). Cell surface receptors for CCN proteins. *Journal of Cell Communication and Signaling*, 10(2), 121–127. <https://doi.org/10.1007/s12079-016-0324-z>
- Le Douarin, N. M. (2004). The avian embryo as a model to study the development of the neural crest: a long and still ongoing story. *Mechanisms of Development*, 121(9), 1089–1102. <https://doi.org/10.1016/j.mod.2004.06.003>
- Le Dréau, G., & Martí, E. (2013). The multiple activities of BMPs during spinal cord development. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 70(22), 4293–4305. <https://doi.org/10.1007/s00018-013-1354-9>
- Lee, H. S., Qi, Y., & Im, W. (2015). Effects of N-glycosylation on protein conformation and dynamics: Protein Data Bank analysis and molecular dynamics simulation study. *Scientific Reports*, 5(1), 8926. <https://doi.org/10.1038/srep08926>
- Lehtinen, M. K., & Walsh, C. A. (2011). Neurogenesis at the Brain–Cerebrospinal Fluid Interface. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 27(1), 653–679. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-092910-154026>
- Lehtinen, M. K., Zappaterra, M. W., Chen, X., Yang, Y. J., Hill, A. D., Lun, M., Maynard, T., Gonzalez, D., Kim, S., Ye, P., D’Ercole, A. J., Wong, E. T., LaMantia, A. S., & Walsh, C. A. (2011). The Cerebrospinal Fluid Provides a Proliferative Niche for Neural Progenitor Cells. *Neuron*, 69(5), 893–905. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.01.023>
- Long, K., Moss, L., Laursen, L., Boulter, L., & French-Constant, C. (2016). Integrin signalling regulates the expansion of neuroepithelial progenitors and neurogenesis via Wnt7a and Decorin. *Nature Communications*, 7(1), 10354. <https://doi.org/10.1038/ncomms10354>
- Louche, A., Salcedo, S. P., & Bigot, S. (2017). *Protein–Protein Interactions: Pull-Down Assays* (pp. 247–255). https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7033-9_20

- Lowery, L. A., & Sive, H. (2009). Totally tubular: the mystery behind function and origin of the brain ventricular system. *BioEssays*, *31*(4), 446–458. <https://doi.org/10.1002/bies.200800207>
- Madrigal, M., Martín, P., Lamus, F., Fernandez, J. M., Gato, A., & Alonso, M. I. (2023). Embryonic cerebrospinal fluid influence in the subependymal neurogenic niche in adult mouse hippocampus. *Tissue and Cell*, *82*, 102120. <https://doi.org/10.1016/j.tice.2023.102120>
- Mao, C., Shi, L., Xu, F., Zhang, L., & Xu, Z. (2009). Development of fetal brain renin–angiotensin system and hypertension programmed in fetal origins. *Progress in Neurobiology*, *87*(4), 252–263. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2008.12.001>
- Martin, C., Alonso, M. I., Santiago, C., Moro, J. A., De la Mano, A., Carretero, R., & Gato, A. (2009). Early embryonic brain development in rats requires the trophic influence of cerebrospinal fluid. *International Journal of Developmental Neuroscience*, *27*(7), 733–740. <https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2009.06.002>
- Martín, C., Bueno, D., Alonso, M. I., Moro, J. A., Callejo, S., Parada, C., Martín, P., Carnicero, E., & Gato, A. (2006). FGF2 plays a key role in embryonic cerebrospinal fluid trophic properties over chick embryo neuroepithelial stem cells. *Developmental Biology*, *297*(2), 402–416. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2006.05.010>
- Martín, D., Ruano, D., Yúfera, A., & Daza, P. (2024). Electrical pulse stimulation parameters modulate N2a neuronal differentiation. *Cell Death Discovery*, *10*(1), 49. <https://doi.org/10.1038/s41420-024-01820-y>
- Marzesco, A.-M., Janich, P., Wilsch-Bräuninger, M., Dubreuil, V., Langenfeld, K., Corbeil, D., & Huttner, W. B. (2005). Release of extracellular membrane particles carrying the stem cell marker prominin-1 (CD133) from neural progenitors and other epithelial cells. *Journal of Cell Science*, *118*(13), 2849–2858. <https://doi.org/10.1242/jcs.02439>
- Mashayekhi, F., Azari, M., Moghadam, L. M., Yazdankhah, M., Najji, M., & Salehi, Z. (2009). Changes in cerebrospinal fluid nerve growth factor levels during chick embryonic development. *Journal of Clinical Neuroscience*, *16*(10), 1334–1337. <https://doi.org/10.1016/j.jocn.2009.03.023>
- Massarwa, R., & Niswander, L. (2013). *In toto* live imaging of mouse morphogenesis and new insights into neural tube closure. *Development*, *140*(1), 226–236. <https://doi.org/10.1242/dev.085001>
- Mastick, G. S., & Easter, Jr., S. S. (1996). Initial Organization of Neurons and Tracts in the Embryonic Mouse Fore- and Midbrain. *Developmental Biology*, *173*(1), 79–94. <https://doi.org/10.1006/dbio.1996.0008>
- McDonald, N. Q., & Hendrickson, W. A. (1993). A structural superfamily of growth factors containing a cystine knot motif. *Cell*, *73*(3), 421–424. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90127-C](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90127-C)

- Megason, S. G., & McMahon, A. P. (2002). A mitogen gradient of dorsal midline Wnts organizes growth in the CNS. *Development*, *129*(9), 2087–2098. <https://doi.org/10.1242/dev.129.9.2087>
- Meiniel, A. (2001). SCO-spondin, a glycoprotein of the subcommissural organ/reissner's fiber complex: Evidence of a potent activity on neuronal development in primary cell cultures. *Microscopy Research and Technique*, *52*(5), 484–495. [https://doi.org/10.1002/1097-0029\(20010301\)52:5<484::AID-JEMT1034>3.0.CO;2-0](https://doi.org/10.1002/1097-0029(20010301)52:5<484::AID-JEMT1034>3.0.CO;2-0)
- Meiniel, A., Molat, J.-L., & Meiniel, R. (1988). Complex-type glycoproteins synthesized in the subcommissural organ of mammals. *Cell And Tissue Research*, *253*(2). <https://doi.org/10.1007/BF00222295>
- Meiniel, O., & Meiniel, A. (2007). The complex multidomain organization of SCO-spondin protein is highly conserved in mammals. *Brain Research Reviews*, *53*(2), 321–327. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2006.09.007>
- Meiniel, R., Didier, R., Molat, J. L., & Meiniel, A. (1993). Developmental Aspects of the Subcommissural Organ: An Approach Using Lectins and Monoclonal Antibodies. In *The Subcommissural Organ* (pp. 51–59). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-78013-4_7
- Melchior, J. T., Street, S. E., Vaisar, T., Hart, R., Jerome, J., Kuklenyik, Z., Clouet-Foraison, N., Thornock, C., Bedi, S., Shah, A. S., Segrest, J. P., Heinecke, J. W., & Davidson, W. S. (2021). Apolipoprotein A-I modulates HDL particle size in the absence of apolipoprotein A-II. *Journal of Lipid Research*, *62*, 100099. <https://doi.org/10.1016/j.jlr.2021.100099>
- Melo, D., Coimbra, S., Rocha, S., & Santos-Silva, A. (2024). Influence of inhibiting methemoglobin formation on erythrocyte antioxidant defense. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *760*, 110121. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2024.110121>
- Mercurio, S. (2004). Connective-tissue growth factor modulates WNT signalling and interacts with the WNT receptor complex. *Development*, *131*(9), 2137–2147. <https://doi.org/10.1242/dev.01045>
- Mok, G. F., Alrefaei, A. F., McColl, J., Grocott, T., & Münsterberg, A. (2015). Chicken as a Developmental Model. In *Encyclopedia of Life Sciences* (pp. 1–8). Wiley. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0021543>
- Molina, A., & Pituello, F. (2017). Playing with the cell cycle to build the spinal cord. *Developmental Biology*, *432*(1), 14–23. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2016.12.022>
- Monnerie, H., Dastugue, B., & Meiniel, A. (1997). In vitro differentiation of chick spinal cord neurons in the presence of Reissner's fibre, an ependymal brain secretion. *Developmental Brain Research*, *102*(2), 167–176. [https://doi.org/10.1016/S0165-3806\(97\)00094-1](https://doi.org/10.1016/S0165-3806(97)00094-1)
- Monnerie, H., Dastugue, B., & Meiniel, A. (1998). Effect of synthetic peptides derived from SCO-spondin conserved domains on chick cortical and spinal-cord neurons in cell cultures. *Cell and Tissue Research*, *293*(3), 407–418. <https://doi.org/10.1007/s004410051132>

- Moret, F., Renaudot, C., Bozon, M., & Castellani, V. (2007). Semaphorin and neuropilin co-expression in motoneurons sets axon sensitivity to environmental semaphorin sources during motor axon pathfinding. *Development*, *134*(24), 4491–4501. <https://doi.org/10.1242/dev.011452>
- Mungall, B. A., Shinkel, T. A., & Sernia, C. (1995). Immunocytochemical localization of angiotensinogen in the fetal and neonatal rat brain. *Neuroscience*, *67*(2), 505–524. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(95\)00044-J](https://doi.org/10.1016/0306-4522(95)00044-J)
- Muñoz, R. I., Kähne, T., Herrera, H., Rodríguez, S., Guerra, Ma. M., Vío, K., Hennig, R., Rapp, E., & Rodríguez, E. (2019). The subcommissural organ and the Reissner fiber: old friends revisited. *Cell and Tissue Research*, *375*(2), 507–529. <https://doi.org/10.1007/s00441-018-2917-8>
- Murphy-Ullrich, J. E., & Sage, E. H. (2014). Revisiting the matricellular concept. *Matrix Biology*, *37*, 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2014.07.005>
- Nakaya, N., Sultana, A., Lee, H.-S., & Tomarev, S. I. (2012). Olfactomedin 1 Interacts with the Nogo A Receptor Complex to Regulate Axon Growth. *Journal of Biological Chemistry*, *287*(44), 37171–37184. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.389916>
- Nualart, F., & Hein, S. (2001). Biosynthesis and molecular biology of the secretory proteins of the subcommissural organ. *Microscopy Research and Technique*, *52*(5), 468–483. [https://doi.org/10.1002/1097-0029\(20010301\)52:5<468::AID-JEMT1033>3.0.CO;2-U](https://doi.org/10.1002/1097-0029(20010301)52:5<468::AID-JEMT1033>3.0.CO;2-U)
- Nualart, F., & Rodríguez, E. M. (1996). Immunochemical analysis of the subcommissural organ-Reissner's fiber complex using antibodies against alkylated and deglycosylated glycoproteins of the bovine Reissner's fiber. *Cell and Tissue Research*, *286*(1), 23–31. <https://doi.org/10.1007/s004410050671>
- Oksche, A. (1961). [Histochemically demonstrable synthesis and degradation of glycogen in astrocytes and ependymal cells as an example of functionally-dependent metabolic activity of the neuroglia]. *Zeitschrift Fur Zellforschung Und Mikroskopische Anatomie (Vienna, Austria : 1948)*, *54*, 307–361.
- Ortega, E., Muñoz, R. I., Luza, N., Guerra, F., Guerra, M., Vio, K., Henzi, R., Jaque, J., Rodriguez, S., McAllister, J. P., & Rodriguez, E. (2016). The value of early and comprehensive diagnoses in a human fetus with hydrocephalus and progressive obliteration of the aqueduct of Sylvius: Case Report. *BMC Neurology*, *16*(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s12883-016-0566-7>
- Oshio, K., Watanabe, H., Song, Y., Verkman, A. S., & Manley, G. T. (2005). Reduced cerebrospinal fluid production and intracranial pressure in mice lacking choroid plexus water channel Aquaporin-1. *The FASEB Journal*, *19*(1), 76–78. <https://doi.org/10.1096/fj.04-1711fj>
- Otsu, N. (1979). A Threshold Selection Method from Gray-Level Histograms. *IEEE Transactions on Systems, Man, and Cybernetics*, *9*(1), 62–66. <https://doi.org/10.1109/TSMC.1979.4310076>
- Panchision, D. M., & McKay, R. D. G. (2002). The control of neural stem cells by morphogenic signals. *Current Opinion in Genetics & Development*, *12*(4), 478–487. [https://doi.org/10.1016/S0959-437X\(02\)00329-5](https://doi.org/10.1016/S0959-437X(02)00329-5)

- Parada, C., Escolà-Gil, J. C., & Bueno, D. (2008). Low-density lipoproteins from embryonic cerebrospinal fluid are required for neural differentiation. *Journal of Neuroscience Research*, *86*(12), 2674–2684. <https://doi.org/10.1002/jnr.21724>
- Parada, C., Gato, A., Aparicio, M., & Bueno, D. (2006). Proteome analysis of chick embryonic cerebrospinal fluid. *Proteomics*, *6*(1), 312–320. <https://doi.org/10.1002/pmic.200500085>
- Parada, C., Gato, A., & Bueno, D. (2005). Mammalian embryonic cerebrospinal fluid proteome has greater apolipoprotein and enzyme pattern complexity than the avian proteome. *Journal of Proteome Research*, *4*(6), 2420–2428. <https://doi.org/10.1021/pr050213t>
- Parada, C., Gato, A., & Bueno, D. (2008). All-trans retinol and retinol-binding protein from embryonic cerebrospinal fluid exhibit dynamic behaviour during early central nervous system development. *NeuroReport*, *19*(9), 945–950. <https://doi.org/10.1097/WNR.0b013e3283021c94>
- Parvas, M., & Bueno, D. (2010). The embryonic blood-CSF barrier has molecular elements to control E-CSF osmolarity during early CNS development. *Journal of Neuroscience Research*, *88*(6), 1205–1212. <https://doi.org/10.1002/jnr.22293>
- Parvas, M., Parada, C., & Bueno, D. (2008). A blood–CSF barrier function controls embryonic CSF protein composition and homeostasis during early CNS development. *Developmental Biology*, *321*(1), 51–63. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2008.05.552>
- Pavlakis, E., Chiotaki, R., & Chalepakis, G. (2011). The role of Fras1/Frem proteins in the structure and function of basement membrane. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, *43*(4), 487–495. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2010.12.016>
- Pérez-Fígares, J. M., Jimenez, A. J., & Rodríguez, E. M. (2001). Subcommissural organ, cerebrospinal fluid circulation, and hydrocephalus. *Microscopy Research and Technique*, *52*(5), 591–607. [https://doi.org/10.1002/1097-0029\(20010301\)52:5<591::AID-JEMT1043>3.0.CO;2-7](https://doi.org/10.1002/1097-0029(20010301)52:5<591::AID-JEMT1043>3.0.CO;2-7)
- Pexieder, T., & Jelínek, R. (1970). Pressure of the CSF and the morphogenesis of the CNS. II. Pressure necessary for normal development of brain vesicles. *Folia Morphologica*, *18*(2), 181–192.
- Poon, S., Easterbrook-Smith, S. B., Rybchyn, M. S., Carver, J. A., & Wilson, M. R. (2000). Clusterin Is an ATP-Independent Chaperone with Very Broad Substrate Specificity that Stabilizes Stressed Proteins in a Folding-Competent State. *Biochemistry*, *39*(51), 15953–15960. <https://doi.org/10.1021/bi002189x>
- Purves D. (2018). *Neuroscience* (Sixth). Oxford University Press.
- Reissner E. (1860). Beiträge zur Kenntnis vom Bau des Rückenmarkes von Petromyzon fluviatilis L. *Anat Physiol Wiss Med*, 545–588.
- Rodríguez, E. M., Oksche, A., Hein, S., & Yulis, C. R. (1992). Cell Biology of the Subcommissural Organ. *International Review of Cytology*, *135*(C), 39–121. [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(08\)62038-0](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(08)62038-0)

- Rodríguez, E. M., Oksche, A., & Montecinos, H. (2001). Human subcommissural organ, with particular emphasis on its secretory activity during the fetal life. *Microscopy Research and Technique*, 52(5), 573–590. [https://doi.org/10.1002/1097-0029\(20010301\)52:5<573::AID-JEMT1042>3.0.CO;2-6](https://doi.org/10.1002/1097-0029(20010301)52:5<573::AID-JEMT1042>3.0.CO;2-6)
- Rodríguez, E. M., Rodríguez, S., & Hein, S. (1998). The subcommissural organ. *Microscopy Research and Technique*, 41(2), 98–123. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0029\(19980415\)41:2<98::AID-JEMT2>3.0.CO;2-M](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0029(19980415)41:2<98::AID-JEMT2>3.0.CO;2-M)
- Rodríguez, S., & Caprile, T. (2001). Functional aspects of the subcommissural organ-Reissner's fiber complex with emphasis in the clearance of brain monoamines. *Microscopy Research and Technique*, 52(5), 564–572. [https://doi.org/10.1002/1097-0029\(20010301\)52:5<564::AID-JEMT1041>3.0.CO;2-7](https://doi.org/10.1002/1097-0029(20010301)52:5<564::AID-JEMT1041>3.0.CO;2-7)
- Rodríguez, E., Herrera, H., Peruzzo, B., Rodríguez, S., Hein, S., & Oksche, A. (1986). Light and electron-microscopic immunocytochemistry and lectin histochemistry of the subcommissural organ: Evidence for processing of the secretory material. *Cell and Tissue Research*, 243(3). <https://doi.org/10.1007/BF00218061>
- Rogers, K. W., & Schier, A. F. (2011). Morphogen Gradients: From Generation to Interpretation. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 27(1), 377–407. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-092910-154148>
- Rojas-Gómez, A., Dosil, S. G., Chichón, F. J., Fernández-Gallego, N., Ferrarini, A., Calvo, E., Calzadafraile, D., Requena, S., Otón, J., Serrano, A., Tarifa, R., Arroyo, M., Sorrentino, A., Pereiro, E., Vázquez, J., Valpuesta, J. M., Sánchez-Madrid, F., & Martín-Cófreces, N. B. (2023). Chaperonin CCT controls extracellular vesicle production and cell metabolism through kinesin dynamics. *Journal of Extracellular Vesicles*, 12(6). <https://doi.org/10.1002/jev2.12333>
- Rose, C. D., Pompili, D., Henke, K., Van Gennip, J. L. M., Meyer-Miner, A., Rana, R., Gobron, S., Harris, M. P., Nitz, M., & Ciruna, B. (2020). SCO-Spondin Defects and Neuroinflammation Are Conserved Mechanisms Driving Spinal Deformity across Genetic Models of Idiopathic Scoliosis. *Current Biology*, 30(12), 2363–2373.e6. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2020.04.020>
- Rubenstein, J. L. R., Martinez, S., Shimamura, K., & Puellas, L. (1994). The Embryonic Vertebrate Forebrain: the Prosomeric Model. *Science*, 266(5185), 578–580. <https://doi.org/10.1126/science.7939711>
- Sakka, L., Delétage, N., Lalloué, F., Duval, A., Chazal, J., Lemaire, J.-J., Meiniel, A., Monnerie, H., & Gobron, S. (2014). SCO-Spondin Derived Peptide NX210 Induces Neuroprotection In Vitro and Promotes Fiber Regrowth and Functional Recovery after Spinal Cord Injury. *PLoS ONE*, 9(3), e93179. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0093179>
- Salehi, Z., Mashayekhi, F., Najji, M., & Pandamooz, S. (2009). Insulin-like growth factor-1 and insulin-like growth factor binding proteins in cerebrospinal fluid during the development of mouse embryos. *Journal of Clinical Neuroscience*, 16(7), 950–953. <https://doi.org/10.1016/j.jocn.2008.09.018>

- Sallon, C., Callebaut, I., Boulay, I., Fontaine, J., Logeart-Avramoglou, D., Henriquet, C., Pugnère, M., Cayla, X., Monget, P., Harichaux, G., Labas, V., Canepa, S., & Taragnat, C. (2017). Thrombospondin-1 (TSP-1), a new bone morphogenetic Protein-2 and -4 (BMP-2/4) antagonist identified in pituitary cells. *Journal of Biological Chemistry*, 292(37), 15352–15368. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.736207>
- Sánchez-Jaramillo, E. A., Gasca-Lozano, L. E., Vera-Cruz, J. M., Hernández-Ortega, L. D., Gurrola-Díaz, C. M., Bastidas-Ramírez, B. E., Vargas-Guerrero, B., Mena-Enríquez, M., Martínez-Limón, F. de J., & Salazar-Montes, A. M. (2022). Nanoparticles Formulation Improves the Antifibrogenic Effect of Quercetin on an Adenine-Induced Model of Chronic Kidney Disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(10), 5392. <https://doi.org/10.3390/ijms23105392>
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J.-Y., White, D. J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P., & Cardona, A. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods*, 9(7), 676–682. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>
- Schoebitz, K., Garrido, O., Heinrichs, M., Speer, L., & Rodríguez, E. M. (1986). Ontogenetical development of the chick and duck subcommissural organ. *Histochemistry*, 84(1), 31–40. <https://doi.org/10.1007/BF00493417>
- Schoenwolf, G. C. (2018). Contributions of the chick embryo and experimental embryology to understanding the cellular mechanisms of neurulation. *The International Journal of Developmental Biology*, 62(1-2-3), 49–55. <https://doi.org/10.1387/ijdb.170288gs>
- Schoenwolf, G. C., & Desmond, M. E. (1984). Neural tube occlusion precedes rapid brain enlargement. *Journal of Experimental Zoology*, 230(3), 405–407. <https://doi.org/10.1002/jez.1402300309>
- Schoenwolf, G. C., & Smith, J. L. (1990). Mechanisms of neurulation: traditional viewpoint and recent advances. *Development*, 109(2), 243–270. <https://doi.org/10.1242/dev.109.2.243>
- Schwamborn, J. C., Fiore, R., Bagnard, D., Kappler, J., Kaltschmidt, C., & Püschel, A. W. (2004). Semaphorin 3A Stimulates Neurite Extension and Regulates Gene Expression in PC12 Cells. *Journal of Biological Chemistry*, 279(30), 30923–30926. <https://doi.org/10.1074/jbc.C400082200>
- Segkilia, A., Seuntjens, E., Elkouris, M., Tsalavos, S., Stappers, E., Mitsiadis, T. A., Huylebroeck, D., Remboutsika, E., & Graf, D. (2012). Bmp7 regulates the survival, proliferation, and neurogenic properties of neural progenitor cells during corticogenesis in the mouse. *PLoS ONE*, 7(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034088>
- Sepúlveda, V., Maurelia, F., González, M., Aguayo, J., & Caprile, T. (2021). SCO-spondin, a giant matricellular protein that regulates cerebrospinal fluid activity. *Fluids and Barriers of the CNS*, 18(1), 45. <https://doi.org/10.1186/s12987-021-00277-w>

- Silva-Vargas, V., Maldonado-Soto, A. R., Mizrak, D., Codega, P., & Doetsch, F. (2016). Age-Dependent Niche Signals from the Choroid Plexus Regulate Adult Neural Stem Cells. *Cell Stem Cell*, 19(5), 643–652. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2016.06.013>
- Singh, B. M., & Mehta, J. L. (2003). Interactions Between the Renin-Angiotensin System and Dyslipidemia. *Archives of Internal Medicine*, 163(11), 1296. <https://doi.org/10.1001/archinte.163.11.1296>
- Smith, J. L., & Schoenwolf, G. C. (1997). Neurulation: coming to closure. *Trends in Neurosciences*, 20(11), 510–517. [https://doi.org/10.1016/s0166-2236\(97\)01121-1](https://doi.org/10.1016/s0166-2236(97)01121-1)
- Sniderman, A. D., Thanassoulis, G., Glavinovic, T., Navar, A. M., Pencina, M., Catapano, A., & Ference, B. A. (2019). Apolipoprotein B Particles and Cardiovascular Disease. *JAMA Cardiology*, 4(12), 1287. <https://doi.org/10.1001/jamacardio.2019.3780>
- Sot, B., Rubio-Muñoz, A., Leal-Quintero, A., Martínez-Sabando, J., Marcilla, M., Roodveldt, C., & Valpuesta, J. M. (2017). The chaperonin CCT inhibits assembly of α -synuclein amyloid fibrils by a specific, conformation-dependent interaction. *Scientific Reports*, 7(1), 40859. <https://doi.org/10.1038/srep40859>
- Šťastný, F., & Rychter, Z. (1976). QUANTITATIVE DEVELOPMENT OF CHOROID PLEXUSES IN CHICK EMBRYO CEREBRAL VENTRICLES. *Acta Neurologica Scandinavica*, 53(4), 251–259. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0404.1976.tb04346.x>
- Stirling, D. R., Carpenter, A. E., & Cimini, B. A. (2021). CellProfiler Analyst 3.0: accessible data exploration and machine learning for image analysis. *Bioinformatics*, 37(21), 3992–3994. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btab634>
- Stirling, D. R., Swain-Bowden, M. J., Lucas, A. M., Carpenter, A. E., Cimini, B. A., & Goodman, A. (2021). CellProfiler 4: improvements in speed, utility and usability. *BMC Bioinformatics*, 22(1), 433. <https://doi.org/10.1186/s12859-021-04344-9>
- Sun, P. D., & Davies, D. R. (1995). The Cystine-Knot Growth-Factor Superfamily. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, 24(1), 269–292. <https://doi.org/10.1146/annurev.bb.24.060195.001413>
- Takeuchi, T., Suzuki, M., Fujikake, N., Popiel, H. A., Kikuchi, H., Futaki, S., Wada, K., & Nagai, Y. (2015). Intercellular chaperone transmission via exosomes contributes to maintenance of protein homeostasis at the organismal level. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(19). <https://doi.org/10.1073/pnas.1412651112>
- Takigawa, M. (2017). *Chapter 1 The CCN Proteins : An Overview*. 1489, 1–8. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6430-7>
- Tan, E., Chin, C. S. H., Lim, Z. F. S., & Ng, S. K. (2021). HEK293 Cell Line as a Platform to Produce Recombinant Proteins and Viral Vectors. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.796991>

- Tanaka, M., Kokubo, M., & Marunouchi, T. (2007). Asymmetric localization of Notch2 on the microvillous surface in choroid plexus epithelial cells. *Histochemistry and Cell Biology*, 127(4), 449–456. <https://doi.org/10.1007/s00418-006-0260-8>
- Teli, P., Kale, V., & Vaidya, A. (2022). Mesenchymal stromal cells-derived secretome protects Neuro-2a cells from oxidative stress-induced loss of neurogenesis. *Experimental Neurology*, 354, 114107. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2022.114107>
- Thouvenin, O., Keiser, L., Cantaut-Belarif, Y., Carbo-Tano, M., Verweij, F., Jurisch-Yaksi, N., Bardet, P. L., van Niel, G., Gallaire, F., & Wyart, C. (2020). Origin and role of the cerebrospinal fluid bidirectional flow in the central canal. *ELife*, 9, 1–37. <https://doi.org/10.7554/eLife.47699>
- Tremblay, R. G., Sikorska, M., Sandhu, J. K., Lanthier, P., Ribocco-Lutkiewicz, M., & Bani-Yaghoub, M. (2010). Differentiation of mouse Neuro 2A cells into dopamine neurons. *Journal of Neuroscience Methods*, 186(1), 60–67. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2009.11.004>
- Troutwine, B. R., Gontarz, P., Konjikusic, M. J., Minowa, R., Monstad-Rios, A., Sepich, D. S., Kwon, R. Y., Solnica-Krezel, L., & Gray, R. S. (2020). The Reissner Fiber Is Highly Dynamic In Vivo and Controls Morphogenesis of the Spine. *Current Biology*, 30(12), 2353-2362.e3. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2020.04.015>
- Tyanova, S., Temu, T., Sinitcyn, P., Carlson, A., Hein, M. Y., Geiger, T., Mann, M., & Cox, J. (2016). The Perseus computational platform for comprehensive analysis of (prote)omics data. *Nature Methods*, 13(9), 731–740. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3901>
- Ulloa, F., & Briscoe, J. (2007). Morphogens and the Control of Cell Proliferation and Patterning in the Spinal Cord. *Cell Cycle*, 6(21), 2640–2649. <https://doi.org/10.4161/cc.6.21.4822>
- Umulis, D., O'Connor, M. B., & Blair, S. S. (2009). The extracellular regulation of bone morphogenetic protein signaling. *Development*, 136(22), 3715–3728. <https://doi.org/10.1242/dev.031534>
- Umur, N., Gurgen, S. G., Yesil Sarsmaz, H., & Umur, A. S. (2022). Use of chicken embryos as an angiogenesis model for central nervous system malignant tumor research. *Turkish Neurosurgery*. <https://doi.org/10.5137/1019-5149.JTN.40861-22.3>
- Upender, I., Yoshida, O., Schrecengost, A., Ranson, H., Wu, Q., Rowley, D. C., Kishore, S., Cywes, C., Miller, E. L., & Whalen, K. E. (2023). A marine-derived fatty acid targets the cell membrane of Gram-positive bacteria. *Journal of Bacteriology*, 205(11). <https://doi.org/10.1128/jb.00310-23>
- Vallet, S. D., Clerc, O., & Ricard-Blum, S. (2020). Glycosaminoglycan–Protein Interactions: The First Draft of the Glycosaminoglycan Interactome. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. <https://doi.org/10.1369/0022155420946403>
- van Boxel, A. L., Economou, A. D., Heliot, C., & Hill, C. S. (2018). Long-Range Signaling Activation and Local Inhibition Separate the Mesoderm and Endoderm Lineages. *Developmental Cell*, 44(2), 179-191.e5. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2017.11.021>

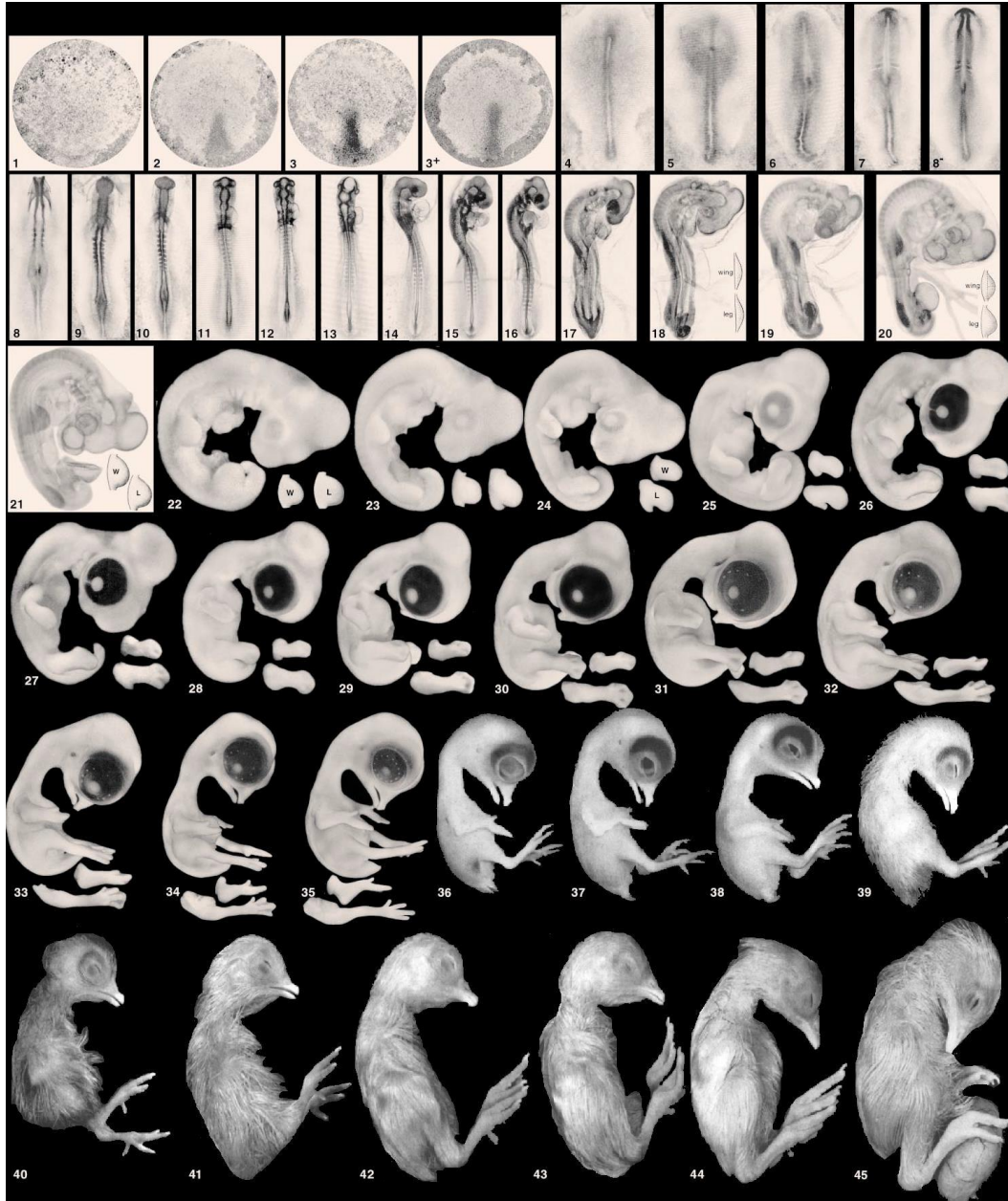
- Vera, A., Recabal, A., Saldivia, N., Stanic, K., Torrejon, M., Montecinos, H., & Caprile, T. (2015). Interaction between sco-spondin and low density lipoproteins from embryonic cerebrospinal fluid modulates their roles in early neurogenesis. *Frontiers in Neuroanatomy*, 9(May), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fnana.2015.00072>
- Vera, A., Stanic, K., Montecinos, H., Torrejón, M., Marcellini, S., & Caprile, T. (2013). SCO-spondin from embryonic cerebrospinal fluid is required for neurogenesis during early brain development. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 7(MAY), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fncel.2013.00080>
- Viloria, K., & Hill, N. J. (2016). Embracing the complexity of matricellular proteins: The functional and clinical significance of splice variation. *Biomolecular Concepts*, 7(2), 117–132. <https://doi.org/10.1515/bmc-2016-0004>
- Vio, K., Rodríguez, S., Navarrete, E. H., Pérez-Fígares, J. M., Jiménez, A. J., & Rodríguez, E. M. (2000). Hydrocephalus induced by immunological blockage of the subcommissural organ-Reissner's fiber (RF) complex by maternal transfer of anti-RF antibodies. *Experimental Brain Research*, 135(1), 41–52. <https://doi.org/10.1007/s002210000474>
- Vio, K., Rodríguez, S., Yulis, C. R., Oliver, C., & Rodríguez, E. M. (2008). The subcommissural organ of the rat secretes Reissner's fiber glycoproteins and CSF-soluble proteins reaching the internal and external CSF compartments. *Cerebrospinal Fluid Research*, 5, 1–14. <https://doi.org/10.1186/1743-8454-5-3>
- Vitt, U. A., Hsu, S. Y., & Hsueh, A. J. W. (2001). Evolution and Classification of Cystine Knot-Containing Hormones and Related Extracellular Signaling Molecules. *Molecular Endocrinology*, 15(5), 681–694. <https://doi.org/10.1210/mend.15.5.0639>
- Wang, Q., Chuikov, S., Taitano, S., Wu, Q., Rastogi, A., Tuck, S., Corey, J., Lundy, S., & Mao-Draayer, Y. (2015). Dimethyl Fumarate Protects Neural Stem/Progenitor Cells and Neurons from Oxidative Damage through Nrf2-ERK1/2 MAPK Pathway. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(6), 13885–13907. <https://doi.org/10.3390/ijms160613885>
- Wang, Y., Rehemian, A., Spring, C. M., Kalantari, J., Marshall, A. H., Wolberg, A. S., Gross, P. L., Weitz, J. I., Rand, M. L., Mosher, D. F., Freedman, J., & Ni, H. (2014). Plasma fibronectin supports hemostasis and regulates thrombosis. *Journal of Clinical Investigation*, 124(10), 4281–4293. <https://doi.org/10.1172/JCI74630>
- Wartlick, O., Kicheva, A., & Gonzalez-Gaitan, M. (2009). Morphogen Gradient Formation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 1(3), a001255–a001255. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a001255>
- Weisel, J. W., & Litvinov, R. I. (2017). *Fibrin Formation, Structure and Properties* (pp. 405–456). https://doi.org/10.1007/978-3-319-49674-0_13
- Wharton, K. A., & Serpe, M. (2013). Fine-tuned shuttles for bone morphogenetic proteins. *Current Opinion in Genetics and Development*, 23(4), 374–384. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2013.04.012>

- Wichmann, T. O., Damkier, H. H., & Pedersen, M. (2022). A Brief Overview of the Cerebrospinal Fluid System and Its Implications for Brain and Spinal Cord Diseases. *Frontiers in Human Neuroscience*, *15*. <https://doi.org/10.3389/fnhum.2021.737217>
- Wilde, J. J., Petersen, J. R., & Niswander, L. (2014). Genetic, Epigenetic, and Environmental Contributions to Neural Tube Closure. *Annual Review of Genetics*, *48*(1), 583–611. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-120213-092208>
- Wolf, G., & Sterba, G. (1972). Zur stofflichen Charakteristik des Reissnerschen Fadens. *Acta Zoologica*, *53*(2), 147–154. <https://doi.org/10.1111/j.1463-6395.1972.tb00582.x>
- Wyatt, A. R., Yerbury, J. J., & Wilson, M. R. (2009). Structural Characterization of Clusterin-Chaperone Client Protein Complexes. *Journal of Biological Chemistry*, *284*(33), 21920–21927. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.033688>
- Xu, E.-R., Blythe, E. E., Fischer, G., & Hyvönen, M. (2017). Structural analyses of von Willebrand factor C domains of collagen 2A and CCN3 reveal an alternative mode of binding to bone morphogenetic protein-2. *Journal of Biological Chemistry*, *292*(30), 12516–12527. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.788992>
- Xu, H., Fame, R. M., Sadegh, C., Sutin, J., Naranjo, C., Della Syau, Cui, J., Shipley, F. B., Vernon, A., Gao, F., Zhang, Y., Holtzman, M. J., Heiman, M., Warf, B. C., Lin, P.-Y., & Lehtinen, M. K. (2021). Choroid plexus NKCC1 mediates cerebrospinal fluid clearance during mouse early postnatal development. *Nature Communications*, *12*(1), 447. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-20666-3>
- Yamada, S. (2014). Cerebrospinal fluid physiology: visualization of cerebrospinal fluid dynamics using the magnetic resonance imaging Time-Spatial Inversion Pulse method. *Croatian Medical Journal*, *55*(4), 337–346. <https://doi.org/10.3325/cmj.2014.55.337>
- Yang, C., Li, S., Li, X., Li, H., Li, Y., Zhang, C., & Lin, J. (2019). Effect of sonic hedgehog on motor neuron positioning in the spinal cord during chicken embryonic development. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, *23*(5), 3549–3562. <https://doi.org/10.1111/jcmm.14254>
- Yari, S., Parivar, K., Nabiuni, M., & Keramatipour, M. (2013). Effect of embryonic cerebrospinal fluid on proliferation and differentiation of neuroprogenitor cells. *Cell Journal*, *15*(1), 29–36.
- Yi, J., Zhu, M., Qiu, F., Zhou, Y., Shu, P., Liu, N., Wei, C., & Xiang, S. (2020). TNFAIP1 Mediates Formaldehyde-Induced Neurotoxicity by Inhibiting the Akt/CREB Pathway in N2a Cells. *Neurotoxicity Research*, *38*(1), 184–198. <https://doi.org/10.1007/s12640-020-00199-9>
- Zappaterra, M. D., Lisgo, S. N., Lindsay, S., Gygi, S. P., Walsh, C. A., & Ballif, B. A. (2007). A Comparative Proteomic Analysis of Human and Rat Embryonic Cerebrospinal Fluid. *Journal of Proteome Research*, *6*(9), 3537–3548. <https://doi.org/10.1021/pr070247w>
- Zhang, J.-L., Huang, Y., Qiu, L.-Y., Nickel, J., & Sebald, W. (2007). von Willebrand Factor Type C Domain-containing Proteins Regulate Bone Morphogenetic Protein Signaling through Different Recognition Mechanisms. *Journal of Biological Chemistry*, *282*(27), 20002–20014. <https://doi.org/10.1074/jbc.M700456200>

- Zhang, K., Li, M., Yin, L., Fu, G., & Liu, Z. (2020). Role of thrombospondin-1 and thrombospondin-2 in cardiovascular diseases (Review). *International Journal of Molecular Medicine*. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2020.4507>
- Zhang, M. (2004). Tracking global patterns of N-linked glycosylation site variation in highly variable viral glycoproteins: HIV, SIV, and HCV envelopes and influenza hemagglutinin. *Glycobiology*, *14*(12), 1229–1246. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwh106>
- Zhang, T., Ai, D., Wei, P., Xu, Y., Bi, Z., Ma, F., Li, F., Chen, X.-J., Zhang, Z., Zou, X., Guo, Z., Zhao, Y., Li, J.-L., Ye, M., Feng, Z., Zhang, X., Zheng, L., Yu, J., Li, C., ... Ge, W.-P. (2024). The subcommissural organ regulates brain development via secreted peptides. *BioRxiv : The Preprint Server for Biology*. <https://doi.org/10.1101/2024.03.30.587415>
- Zhou, Y.-F., Eng, E. T., Zhu, J., Lu, C., Walz, T., & Springer, T. A. (2012). Sequence and structure relationships within von Willebrand factor. *Blood*, *120*(2), 449–458. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-01-405134>
- Zhu, L., Yang, K., Wang, X., Wang, X., & Wang, C. (2014). A Novel Reaction of Peroxiredoxin 4 towards Substrates in Oxidative Protein Folding. *PLoS ONE*, *9*(8), e105529. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0105529>

XI. ANEXOS

Anexo 1: Etapas del desarrollo embrionario de Gallus gallus de Hamburger y Hamilton (1951).



Estadio HH	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	13	14	15	
Edad	1-6h	12-13h	18-19h	19-22h	23-15h	23-26h	26-29h	29-33h	33-38h	40-45h	45-49h	48-52h	50-53h	50-55h		
Estadio HH	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	
Edad	51-56h	52-64h	3d	3-3,5d	3-3,5d	3,5d	3,5-4d	4d	4,5d	4,5-5d	5d	5,5d	5,5-6d	6-6,5d	6,5-7d	
Estadio HH	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46
Edad	7-7,5d	7,5d	7,5-8d	8d	8,5-9d	10d	11d	12d	13d	14d	15d	16d	17d	18d	19-20d	20-21d

Estadios del desarrollo de Hamburger y Hamilton. 46 estadios del desarrollo y el tiempo al cual corresponden en horas (h) o días (d).

Anexo 2: Concentración de las proteínas en el LCR-E por estadio

Autores Estadio	Birge y cols., 1974	Fielitz y cols., 1984	Gato y cols., 2004	Gato y cols., 1998
HH23		2,35µg/µL	2,85µg/µL	2,95µg/µL
HH24			2,92µg/µL	
HH26	3,25µg/µL	3,4µg/µL	3,5µg/µL	
HH29	3,49µg/µL		3,77µg/µL	
HH31		3,9µg/µL	4,18µg/µL	
HH34	4,18µg/µL			
HH35	4,49µg/µL	4,45µg/µL		
HH36	5,1µg/µL			
HH37	5,32µg/µL	5,1µg/µL		
HH38	5,17µg/µL			
HH39	4,9µg/µL	4,05µg/µL		
HH40	4,43µg/µL			
HH41	3,72µg/µL	3,5µg/µL		
HH42	3,13µg/µL			
HH43		2,5µg/µL		
HH44	2,22µg/µL			
HH45		1,5µg/µL		
HH46	1,42µg/µL			

Tabla 1. Mediciones de concentración proteica del LCR-E durante el desarrollo de *Gallus gallus*. En esta tabla se presentan las mediciones entregadas por distintos estudios del LCR-E, los cuales indican que la concentración aumenta entre el estadio HH23 y HH37, para luego descender hasta el final del desarrollo embrionario.

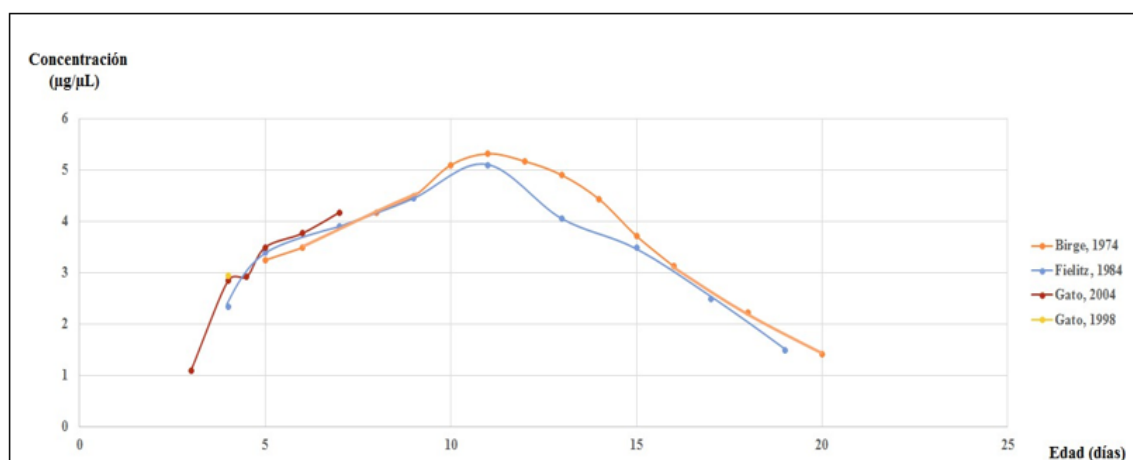
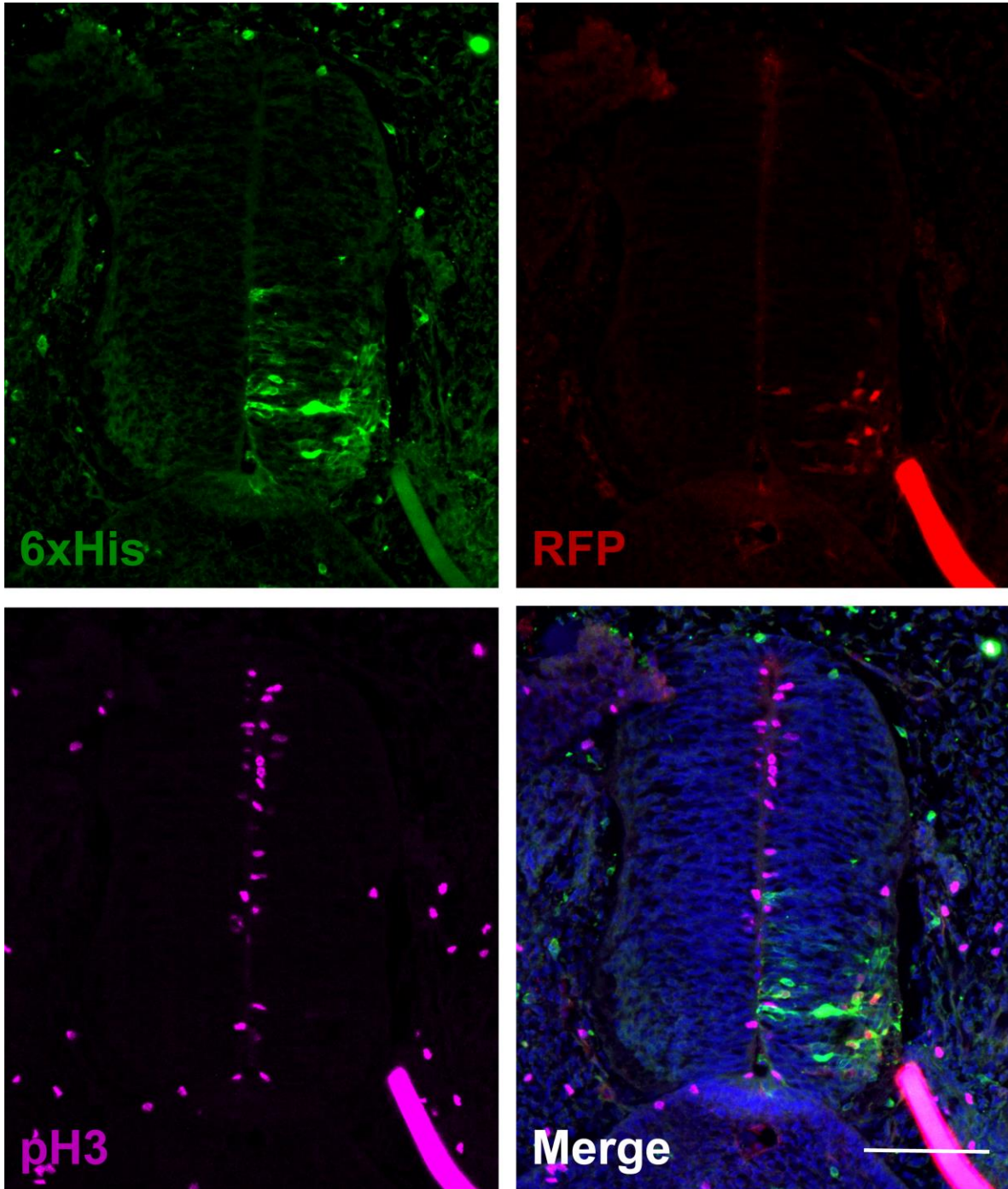
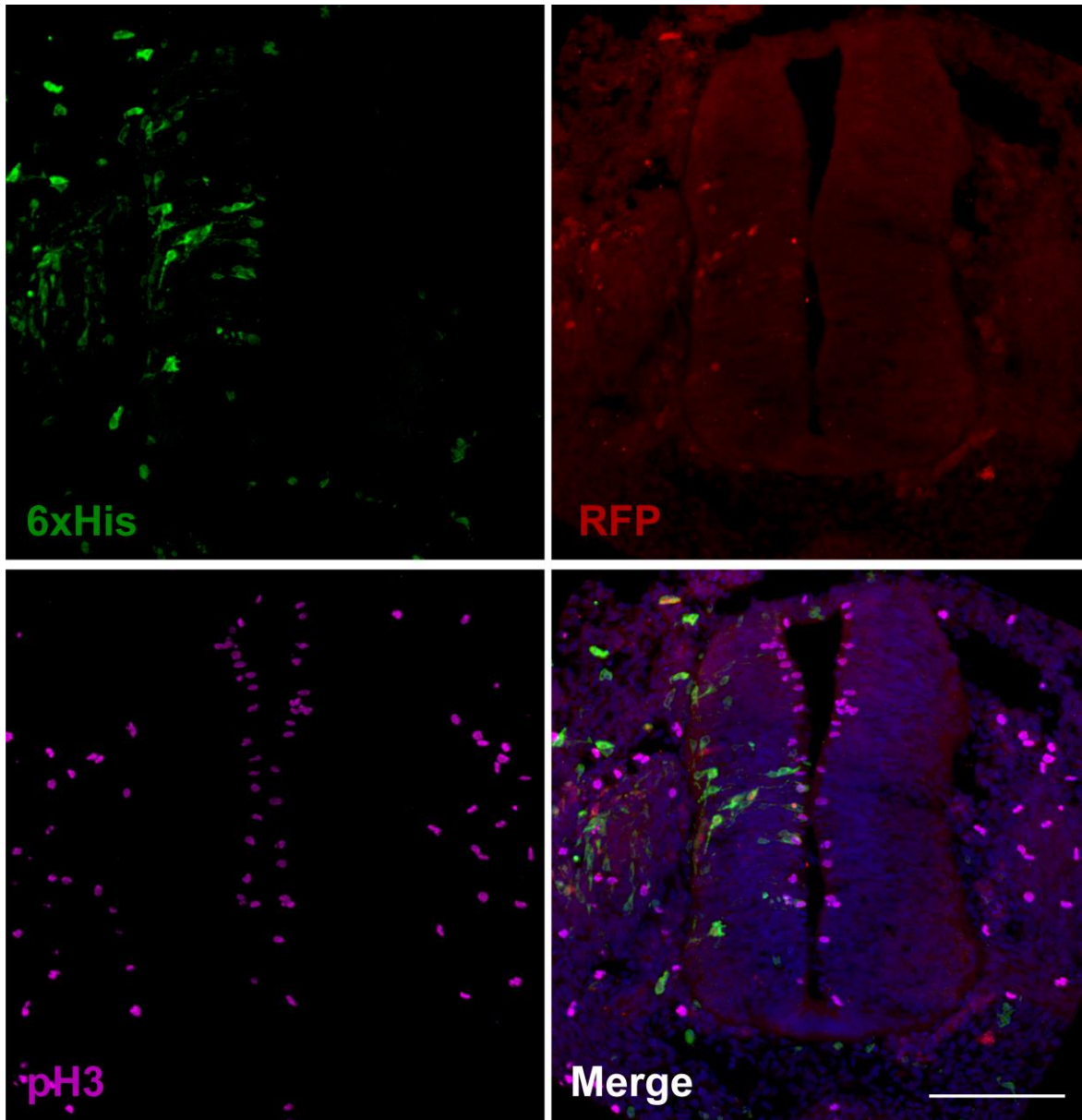


Gráfico 1. Gráfico de concentraciones proteicas del LCR-E durante el desarrollo de *Gallus gallus*. En este gráfico se representan las mediciones entregadas por distintos estudios del LCR-E entre el día 4 y 20 (Estadios HH23 y HH46).

Anexo 3: Cortes transversales de especímenes electroporados, sometidos a inmunofluorescencia contra pH3.



Inmunofluorescencia de cortes transversales del espécimen 2 de embrión *Gallus gallus* electroporado con el vector pIRES C-term OSCsp contra el epítipo de histidinas (6xHis) y fosfo-histona III (pH3), junto con la marca fluorescente roja (RFP) endógena del vector. Barra = 100 μ m



Inmunofluorescencia de cortes transversales del espécimen 3 de embrión *gallus gallus* electroporado con el vector pIRES C-term OSCsp, contra el epítotope de histidinas (6xHis) y fosfo-histona III (pH3), junto con la marca fluorescente roja (RFP) endógena del vector. Barra = 100 μ m