



**Universidad de Concepción
Facultad Farmacia**

**CARACTERIZACIÓN DE LA EXPRESION DE
PROTEÍNAS PERTENECIENTES A LA FAMILIA DE
EPH/EFRINAS DE TIPO A EN EL TECHO
DIENCEFÁLICO DE EMBRIONES DE *GALLUS GALLUS***

POR JAIME ALEXIS AGUAYO CISTERNA

Plan de trabajo de Tesis presentado a la Facultad de Farmacia de la
Universidad de Concepción para optar el título profesional de Bioquímico

Profesor Guía y Patrocinante:

Dra. Teresa Caprile Elola-Olaso

Dpto. de Biología Celular, Facultad de Ciencias Biológicas

Universidad de Concepción

NOVIEMBRE, 2022
CONCEPCIÓN CHILE

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	VIII
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Cono de crecimiento axonal.....	1
1.2. Mecanismos de guía axonal.	2
1.3. Línea media, punto de decisión.....	4
1.4. Moléculas de guía axonal.....	6
1.5. Familia de Eph/Efrinas.....	8
1.6. Señalización de Eph/Efrinas.	10
1.7. Techo diencefálico y formación de la comisura posterior.	14
1.8. Secuenciación transcriptómica de tejido proveniente de la placa del techo diencefálico.	18
2. HIPOTESIS Y OBJETIVOS	22
2.1. Hipótesis.	22
2.2. Objetivo general.....	22
2.3. Objetivos específicos.	22
3. MATERIALES Y METODOS	24
3.1. Modelo animal de estudio.....	24
3.2. Análisis de datos obtenidos de la secuenciación transcriptómica de muestras de OSC.....	24
3.3. Extracción de ARN y obtención de producto RT-PCR para moléculas de estudio.	26
3.4. Western-blot de extractos provenientes de OSC.....	29
3.5. Inmunofluorescencia de cortes provenientes de OSC.	30
4. RESULTADOS	35
4.1. Análisis de la expresión de ARNm en el OSC de moléculas pertenecientes a la familia de Eph/efrinas del tipo A durante el desarrollo temprano.	35
4.1.1. Análisis de datos obtenidos de la secuenciación transcriptómica de muestras de OSC.....	35
4.1.2. Validación de los resultados obtenidos del análisis de la secuenciación transcriptómica por RT-qPCR.....	44

4.2. Análisis de la expresión proteica en el techo diencefálico de moléculas pertenecientes a la familia de Eph/ efrinas tipo A durante su desarrollo temprano.	45
4.2.1. Western-blot de extracto proveniente del OSC de embriones de <i>G. gallus</i>	45
4.2.1.1. Estandarización de la técnica de Western Blot.....	45
4.2.1.2. Expresión de moléculas Eph/efrinas en el OSC.	47
4.1.3. Inmunofluorescencia en corte proveniente del techo diencefálico de embriones de <i>G. gallus</i>	51
5. DISCUSION	55
5.1. Expresión de Eph/efrinas en la PTD de embriones de <i>G. gallus</i>	56
5.2. Expresión de EphA4 en la PTD de embriones de <i>G. gallus</i>	58
5.3. Expresión de EFNA5 y EphA7 en la placa de techo diencefálico de embriones de <i>G. gallus</i>	60
5.4. Mapas topográficos de Eph/efrinas tipo A en embriones de <i>G. gallus</i>	64
5.5. Otras moléculas relevantes expresadas en la zona estudiada.	65
6. CONCLUSIONES	68
7. BIBLIOGRAFIA	69

INDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Protocolo de obtención de ADNc.....	27
Tabla 2.	Reactivos y volúmenes utilizados para la reacción de qPCR.....	27
Tabla 3.	Secuencia de partidores Forward (Fw) y Reverse (Rv) para EFNA5 y EphA7 utilizados en la qPCR.....	28
Tabla 4.	Programa utilizado para la reacción de qPCR.....	28
Tabla 5.	Anticuerpos primarios, secundarios y otros marcadores utilizados en la elaboración de este trabajo.....	34
Tabla 6.	Clasificación según Receptor, Ligando y Correceptor de los transcritos contados por duplicados en estadios HH23 y HH30.....	41
Tabla 7.	Tabulación de datos entregados por edge-R para moléculas de Eph/efrinas clasificadas según receptor o ligando de tipo A y B.....	42

INDICE DE ILUSTRACIONES

Figura 1.	Esquema de la estructura del cono de crecimiento.....	2
Figura 2.	Mecanismos de guía axonal.....	4
Figura 3.	Esquema del cruce de axones comisurales a través de la línea media en la médula espinal de vertebrados.....	6
Figura 4.	Moléculas clásicas de señalización y sus receptores.....	8
Figura 5.	Eph y efrinas.....	10
Figura 6.	Proyección de axones retinales hacia el tectum anterior y posterior.....	13
Figura 7.	Inmunohistoquímica en bloque de embriones de <i>G. gallus</i> con anticuerpo anti-neurofilamento.....	15
Figura 8.	Expresión de EphA7 y OSC-espondina en el prosómero 1.....	16
Figura 9.	Inhibición “in vivo” de EphA7 con morfolino y posterior análisis de estadio HH31.....	18
Figura 10.	Cortes de disección realizados al embrión para realizar el extracto de ARN.....	28
Figura 11.	Representación gráfica del flujo de trabajo para la técnica Western Blot.....	30
Figura 12.	Tinción con hematoxilina y eosina de Corte frontal y corte sagital de órgano subcomisural (OSC) de embriones <i>G. gallus</i> HH30.....	31
Figura 13.	Representación del flujo de trabajo para la inmunofluorescencia.....	32
Figura 14.	Porcentaje de genes relacionados con “GO:0007411 axon guidance” del conteo total de genes anotados.....	35

Figura 15.	Clasificación por GO de moléculas clásicas de guía axonal de la población total de <i>counts</i> relacionados con guía axonal.....	36
Figura 16.	Gráfico de barras para los conteos de moléculas de Eph/efrinas detectados por secuenciación transcriptómica en la zona del OSC.....	38
Figura 17.	Cuantificación de transcritos de Eph/efrinas A por ARNseq y normalizado respecto a GAPDH	39
Figura 18.	Cuantificación de transcritos de Eph/efrinas B por ARNseq y normalizado respecto a GAPDH.....	40
Figura 19.	Estudio de expresión diferencial mediante pHeatmap de Eph/efrinas tipo A y B obtenido con RStudio®.....	43
Figura 20.	Curva de amplificación, curva de <i>Melting</i> para reacción de qPCR contra EFNA5 Y Cuantificación por RT-qPCR de transcritos de EFNA5 en OSC de embriones de <i>G. gallus</i>	45
Figura 21.	Western Blot para EphA4 previo a la estandarización del ensayo.....	47
Figura 22.	Western Blot para EphA4 post estandarización del ensayo.....	48
Figura 23.	Western Blot para EFNA5.....	49
Figura 24.	Western Blot para EphA7.....	50
Figura 25.	Inmunofluorescencia en corte de embriones de <i>G. gallus</i> HH30 para estudio de expresión y localización de EFNA5 en prosómero 1.....	52
Figura 26.	Inmunofluorescencia para EphA7 en cortes de prosómero 1 de embriones de <i>G. gallus</i>	54

RESUMEN

Una fase crítica del desarrollo temprano del sistema nervioso es el establecimiento de conexiones adecuadas entre neuronas y sus células objetivo. La formación de estas "redes" está controlada por la capacidad del axón para percibir e integrar diversas señales del medio. En animales bilaterales, la línea media es un punto de decisión, en el que axones pueden decidir si cruzar o no, en respuesta a moléculas que actúan como señales de guía. La comisura posterior (CP) es un tracto axonal situado en la placa del techo diencefálico (PTD). Análisis de hibridación "in situ" mostraron que EphA7, un receptor de efrina, se expresa en la PTD, y su inhibición afecta el desarrollo de esta estructura, incluyendo la guía axonal en la CP. La familia Eph/efrina está compuesta por varios miembros que suelen actuar en grupo. Nos propusimos determinar la expresión transcriptómica y proteica de Eph/efrina tipo A durante el desarrollo de la PTD. La expresión del ARNm de Eph/efrina se analizó mediante análisis bioinformático de los datos obtenidos por ARNseq de la PTD (4-7 días de desarrollo de embriones de pollo) y validado por RT-qPCR. La expresión de proteínas se analizó mediante ensayos de western blot (WB) con anticuerpos contra las moléculas Eph/efrina y mediante inmunohistoquímica (IHC) en corte. El análisis mostró la expresión diferencial del ARNm de Eph/efrina, validada por RT-qPCR. El ensayo WB y la IHC mostraron la expresión de varios miembros en la PTD. Nuestros resultados sugieren que las moléculas Eph/efrina se expresan en la PTD, permitiendo el correcto desarrollo de esta región.

1. INTRODUCCIÓN

La formación de redes neuronales funcionales está determinada por la correcta interacción entre las células que conforman el sistema nervioso (SN). Estas conexiones se establecen durante el desarrollo embrionario, en donde las neuronas extienden sus axones pasando por variados e inapropiados destinos sinápticos hasta encontrar su objetivo blanco estableciendo la sinapsis adecuada. El reconocimiento y la relación topológica entre el axón en crecimiento y su objetivo requieren de un mecanismo de reconocimiento de señales ambientales. De este modo, la porción terminal del axón, correspondiente a una protuberancia denominada cono de crecimiento, guiará la proyección axonal reconociendo y convirtiendo señales + y/o – del medio, o de células cercanas y traduciéndolas en ordenes yuxtacelulares que regularán la arquitectura del citoesqueleto determinando el trayecto y la rapidez del crecimiento. A este fenómeno se le ha denominado guía axonal (Stoeckli, E., 2018; Kim, S., & Kim, K., 2020).

1.1. Cono de crecimiento axonal.

El cono de crecimiento consiste en una estructura altamente dinámica y sensitiva, el cual por medio del reconocimiento y la interpretación de diversas señales externas determinará la prolongación del axón en crecimiento (Dent et al., 2011). En función a los componentes que conforman el citoesqueleto del cono de

crecimiento este se puede dividir en un dominio P o periférico, conformado por largos paquetes de filamentos de actina; un dominio C o central, que consiste en paquetes estables de microtúbulos y un dominio T o de transición, ubicado entre el dominio C y el dominio P, compuesto por estructuras contráctiles de actomiosina (figura 1). La capacidad sensitiva observada en el cono axónico depende de las estructuras móviles denominadas filopodios, las que consisten en prolongaciones de forma cilíndrica, ricas en actina y cuyas membranas poseen receptores para moléculas que sirven como señales de crecimiento y de dirección para el axón, haciendo que el cono de crecimiento avance, se retraiga o gire (Lowery, L. A., & Van Vactor, D., 2009).

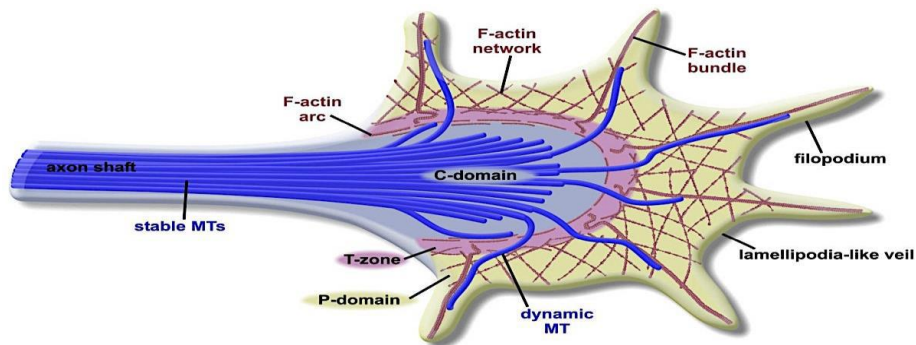


Figura 1. Esquema de la estructura del cono de crecimiento. Se observan los tres dominios: Periférico “P”, Central “C” y de Transición “T” con sus respectivos componentes. (Modificado de Lowery y Van Vactor, 2009).

1.2. Mecanismos de guía axonal.

El cono de crecimiento se puede extender o retraer en respuesta a moléculas que determinan la guía axonal, que pueden ser del tipo atractiva o repulsiva.

Algunas de estas moléculas de guía axonal corresponden a proteínas secretadas que forman gradientes difusivos de largo alcance que promueven la quimiotaxis, mientras que otras señales están unidas a membrana y se presentan como señales de adhesión o localizadas que promueven la haptotaxis de corto alcance (figura 2.A). Se han descrito a lo menos 6 mecanismos por los cuales el cono de crecimiento puede ser guiado: (1) Atracción mediada por contacto, (2) Repulsión mediada por contacto, (3) Quimioatracción, (4) Quimiorepulsión, (5) Fasciculación y (6) Acción de la matriz extracelular (MEC) (figura 2.B) (Goodman, 1996; Tessier-Lavigne y Goodman, 1996). El control de la guía axonal consiste en una combinación de señalizaciones de corto y de largo alcance. Las señalizaciones de corto alcance corresponden a aquellas mediadas por atracción o repulsión por contacto, en donde las moléculas expresadas en las membranas celulares interaccionan entre si activando cascadas de señalización intracelulares que resultarán en la modificación del citoesqueleto. Por otro lado, la señalización de largo alcance corresponde a moléculas solubles que difunden generando gradientes, que repelen o atraen los axones a distancia, proceso denominado quimiorrepulsión o quimioatracción respectivamente. Los primeros axones en proyectarse son denominados axones pioneros, el resto de los axones seguirán a estos pioneros ulteriormente por afinidad adhesiva en un proceso denominado fasciculación hasta que otras señales inducen la separación del axón (Bak y Fraser, 2003). Estos mecanismos permiten al axón establecer las sinapsis adecuadas con sus células objetivo independiente de lo alejada que esta

se encuentre, siguiendo una serie de pasos individuales y tomando decisiones con intervalos relativamente frecuentes durante su trayecto, es decir, la trayectoria se divide en segmentos, donde el final de uno y el inicio del otro están dados por “puntos de decisión” los cuales están compuestos por pequeños grupos de células especializadas y morfológicamente distintas a sus vecinas, que presentan al cono axónico la información necesaria para seguir hacia el próximo trayecto de su viaje (Tessier-Lavigne y Goodman, 1996).

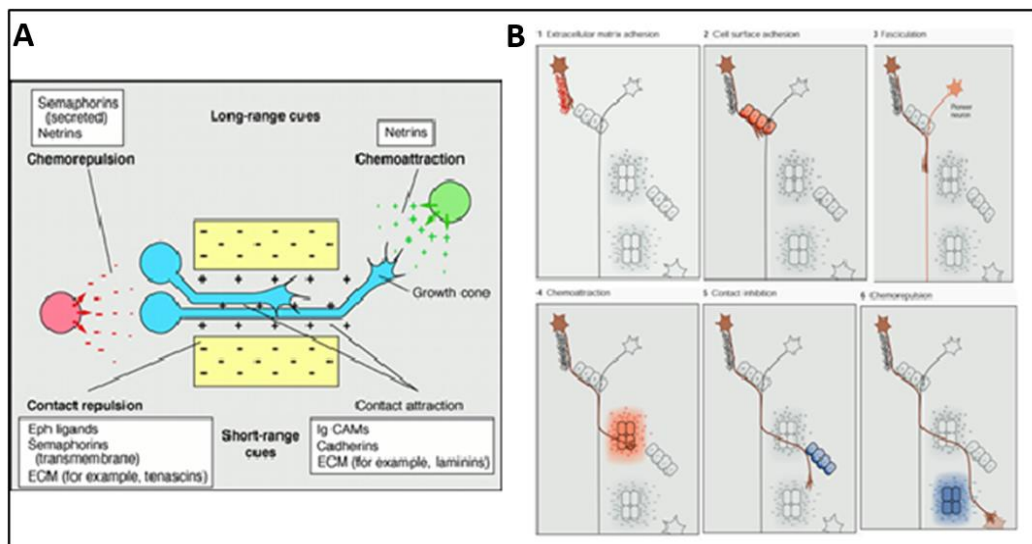


Figura 2. Mecanismos de guía axonal A) Tipos de señalización y ejemplos de moléculas señalizadoras. B) Mecanismos con los que opera la guía axonal (1) Atracción mediada por contacto, (2) Repulsión mediada por contacto, (3) Quimioatracción, (4) Quimiorepulsión, (5) Fasciculación y (6) Acción de la matriz extracelular (ME) (Adaptado de Kandel, E. (2011) Principios de neurociencia)

1.3. Línea media, punto de decisión.

Los organismos con una simetría bilateral necesitan intercambiar información entre cada lado del eje medial del cuerpo para integrar las entradas sensoriales

y coordinar el control motor. Este intercambio se produce por la formación de comisuras, las cuales consisten en una densa red axones que pasan a través de la línea media hasta su lado contralateral. Aquellos axones que atraviesan la línea media son denominados axones comisurales, en cambio aquellos que “deciden” no cruzar la línea media y seguir una proyección paralela a esta, son denominados ipsilaterales (Pignata et al., 2016). La línea media es por tanto un punto de decisión para el axón en proyección (Evans y Bashaw, 2010), donde decide si cruza o no este eje medial en respuesta a moléculas de señalización de guía axonal. La línea media se ha constituido por tanto como un modelo de estudio importante para la guía axonal, siendo la línea media de la médula espinal en desarrollo el lugar más estudiado, donde mecanismos de guía de largo y corto alcance operan coordinativamente (figura 3). Es en esta región donde el estudio de guía axonal fue inicialmente descrito, y donde se descubrieron las primeras moléculas de guía axonal. Ha sido descrito que para llegar a la línea media los axones comisurales de las neuronas son atraídos por gradientes quimioatrayentes de netrina y Shh (Sonic hedgehog) hacia la placa del piso ventral y son repelidos por BMP7 (Bone Morphogenetic Protein 7) y draxina desde la placa del techo dorsal. En la línea media los axones comisurales entran en la placa del piso a través de la atracción mediada por contacto por parte de Nr-CAM (Neural-glia relacionada con la molécula de adhesión celular). Después de cruzar la línea media la repulsión mediada por contacto por slit permite que

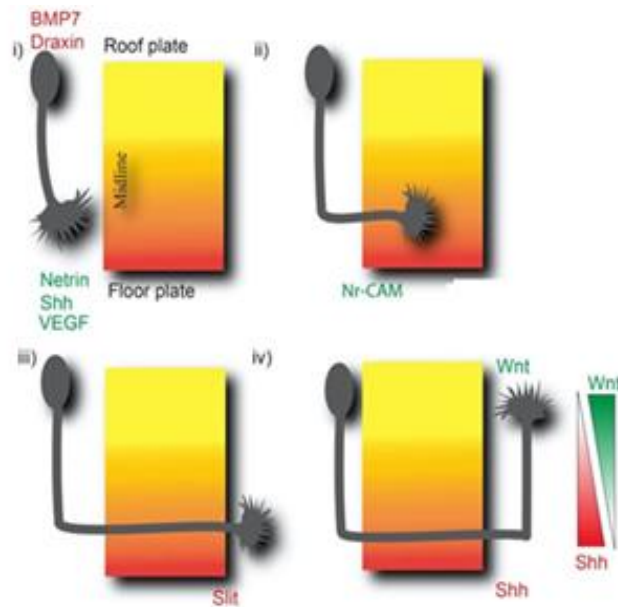


Figura 3. Esquema del cruce de axones comisurales a través de la línea media en la médula espinal de vertebrados. (i) los axones son guiados hacia la placa del suelo por un gradiente de factores repelentes y atractantes. (ii) el axón comisural es atraído hacia la línea media. (iii) el axón cruza la línea media gracias a la expresión de slit (repulsión) (iv) Proyección axonal rostro-caudal. (Mutalik, S. & Gupton, S., 2021).

los axones se proyecten fuera de la placa del piso, entonces los axones se extienden rostralmente en respuesta a gradientes opuestos de Wnt atractivo y Shh repulsivo (Mutalik, S. & Gupton, S., 2021).

1.4. Moléculas de guía axonal.

Durante los últimos 30 años se han identificado una serie de moléculas de señalización de guía axonal que dirigen el crecimiento, clásicamente divididas en cuatro familias. Semaforinas, efrinas, netrinas y slits (figura 4) (McCormick y Gupton, 2020). Respecto a la función de las moléculas implicadas en la guía axonal originalmente se pensó que las moléculas descritas funcionarían siempre

de la misma forma, es decir las netrinas por ejemplo se comportarían como moléculas exclusivamente atractivas mientras que las efrinas se comportarían como moléculas repulsivas (Kennedy et al., 1994). Sin embargo, estudios posteriores avalan que los procesos de atracción y repulsión no son una propiedad intrínseca de las moléculas, sino de la matriz extracelular en la que el cono de crecimiento está inmerso, de los receptores específicos expresados en el cono axónico y del medio de señalización interna de este, por lo que cada una de estas estructuras tendría una identidad propia que reaccionará de forma específica a los diversos estímulos extracelulares (Short et al., 2016). Es así como netrina, una molécula originalmente descrita como una molécula de señalización netamente atractiva puede tener un comportamiento tanto repulsivo como atractivo, esto dependiendo de la expresión del receptor UNC-40 (también llamado DCC) y si este heterodimeriza con UNC-5 o no. De este modo Hong y colaboradores en el año 1999 describen que cuando neuronas de *Xenopus* solo expresan DCC entonces los axones son atraídos por netrina, en cambio cuando coexpresan UNC-5 junto con DCC entonces los axones serán repelidos por netrina (Hong et al., 1999).

Por esta razón, al estudiar el fenómeno de guía axonal se debe enmarcar en un contexto celular y una etapa del desarrollo específico. Dentro de las moléculas de guía axonal una de las familias más amplias es la Eph/efrina, la cual poseen numerosos receptores y ligandos.

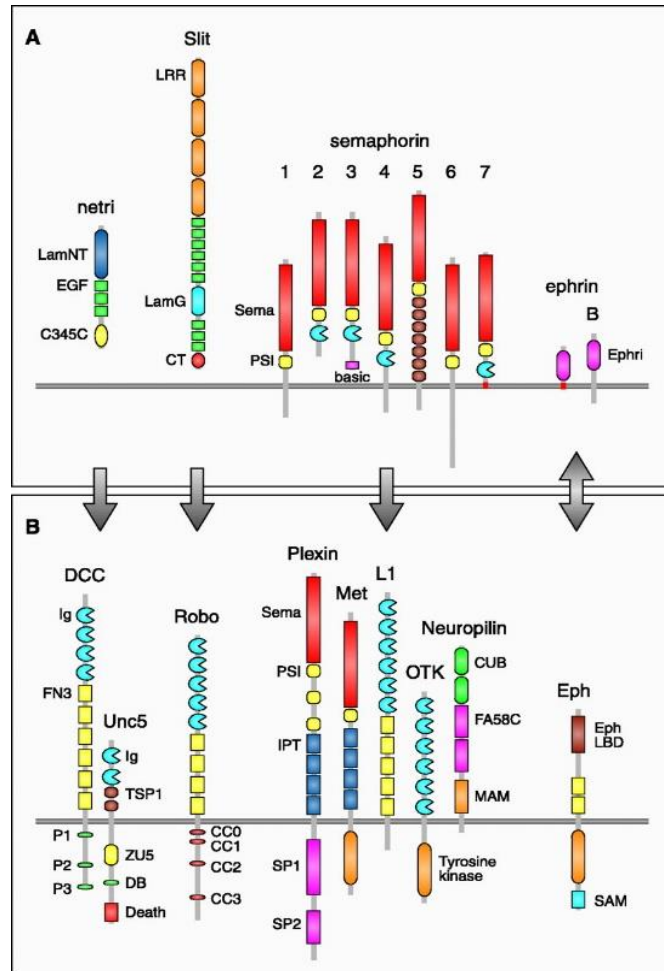


Figura 4. Moléculas clásicas de señalización (A) y sus receptores (B). *Extraído de Dickson BJ (2002), Science*

1.5. Familia de Eph/Efrinas.

Los receptores de efrina (Eph) conforman una gran familia de receptores tirosina kinasa (TRKs) y estos juegan un rol importante en diversos contextos celulares, tales como la migración celular y la guía axonal. Desde que Hirai y colaboradores en el año 1987 identificaron por primera vez el receptor EphA1, estas proteínas

se han convertido en el grupo de TRK más grande hasta la actualidad. Se han descrito 14 Eph en mamíferos (Mellott & Burke, 2008) que se caracterizan por poseer una región extracelular con un único motivo rico en cisteína por sobre la región amino terminal, seguido de dos repeticiones de fibronectina. El dominio intracelular de Eph's poseen un motivo juxtamembrana que contiene tirosina, un dominio tirosina quinasa y un dominio SAM seguido del extremo C-terminal de la proteína. Existen dos subgrupos de Eph's, las cuales incluye tipo A (EphA) y tipo B (EphB) las que comparten los mismos tipos de dominios diferenciándose por su afinidad a ligandos específicos que tendrán estructuras diferentes. Se han descrito 8 de estos ligandos, llamados efrinas, los cuales también se dividen en tipo A y tipo B. Ambos tipos están ancladas a la membrana, las efrinas de tipo A (EFNA) están ancladas por medio de un dominio de unión a glicosilfosfatidilinositol (GPI) lo cual le permite adherirse a la membrana formando balsas lipídicas. Por otro lado, los ligandos de efrina de tipo B (efrina-B) se caracterizan por poseer un dominio transmembrana que los fija a esta (Cramer & Miko, 2016) (Figura 5 A). Los ensayos de unión *in vitro* sugieren promiscuidad en las interacciones receptor-ligando dentro de cada clase. Es decir, cada EphA puede unirse con alta afinidad a todos los efrina-A, y cada EphB puede unirse a cada efrina-B, pero también se ha observado que receptores EphA4 interactúan con ligandos efrina-B y que EphB2 interactúa con efrina-A5 (Himanen et al., 2004; Kullander y Klein, 2002) (Figura 5 B).

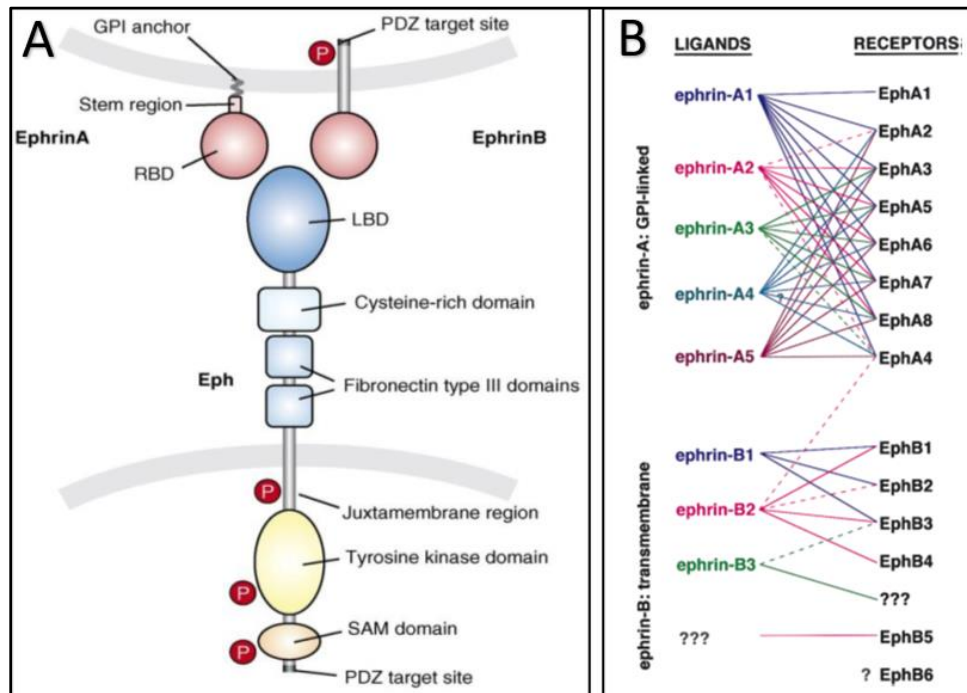


Figura 5. Eph y efrinas (A) Representación gráfica de la estructura de Eph y efrinas A y B. (B) Interacción entre receptores de efrinas y sus posibles ligandos con alta promiscuidad (modificado de Zhou, 1998).

1.6. Señalización de Eph/Efrinas.

Cuando entran en contacto las células que expresan Eph y efrinas en sus membranas, estas interactúan entre sí produciendo señalizaciones intracelulares en la célula que expresa Eph y en la célula que expresa el ligando, por lo que ha sido denominada señalización bidireccional. A la señalización intracelular producida en la célula que expresa el receptor se le ha denominado “directa” e involucra vías dependientes de actividad TRK y la acción de Rho GTPasas resultando, por lo general, en la respuesta de guía axónica repulsiva en el crecimiento del axón, mediante la regulación de la organización del citoesqueleto

y reordenamiento de actina. La señalización en la célula que expresa el ligando de efrina se ha denominado “reversa” la cual en el caso de efrina-B involucra la fosforilación de los dominios tirosina quinasa y en el caso de las efrina-A se ha demostrado en la actualidad que su tipo de respuesta ya sea repulsiva o atractiva dependerá de la expresión de correceptores asociados (Wan et al., 2018). A pesar de que en un comienzo las efrinas fueron descritas como moléculas de señalización de guía axonal repulsivas, en la actualidad se conoce que la señalización reversa de los ligandos efrina-A dependen de la coexpresión de receptores con los cuales interaccionaran en cis. Es así como la coexpresión de receptores para el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), TrkB o p75NTR determinarán el tipo de señalización resultante al formarse el complejo EphA-efrina A-Coreceptor. La expresión de TrkB en la membrana de la célula que expresa el ligando efrina-A permite una interacción del tipo cis entre ambas moléculas resultando en un tipo de respuesta atractiva estimulando el crecimiento del axón mediado por TrkB (Xu, N.J. & Henkemeyer, N., 2012). Por otro lado, la interacción del ligando de efrina-A con p75NTR de manera cis y EphA5 de manera trans resulta en la repulsión de los axones retinales (Poopalasundaram et al., 2011). Otro ejemplo, es el caso de la interacción con Ret, una proteína tirosina-quinasa, que se ha establecido que genera atracción de los axones motores mediada por señalización reversa de las efrinas-A (Bonanomi et al., 2012).

La formación de complejos Eph/efrina permite una señalización bidireccional lo cual le confiere la propiedad a las Eph de comportarse como receptores y como ligandos, lo mismo con las efrinas. Por otro lado, la formación de estos complejos tetraméricos es necesario para inicio de esta señalización bidireccional, comprobándose al mismo tiempo que proteínas monoméricas solubles podrían actuar como antagonistas de Eph (lo que se traduce en una respuesta de tipo atractiva) (Wan et al., 2018). Además de la interacción trans entre receptor y ligando, esta unión también depende de la interacción de receptores adyacentes, así como de la participación de más de un tipo de receptor Eph de un mismo grupo expresados en la membrana de la misma célula (Cramer & Miko, 2016). Por otro lado, las Eph/efrinas participan en la guía axonal a través de la expresión en gradiente, formando verdaderos mapas topológicos, lo cual se puede observar en la proyección axonal de las células ganglionares retinales (RGC), hacia el tectum anterior y posterior, dándose una guía selectiva hacia el tectum anterior por parte de los axones retinales temporales y hacia el tectum posterior los axones de la retina nasal (figura 6). Esta guía axonal depende de la expresión en gradiente de EphA y efrinas-A en las distintas zonas lo cual determina el tipo de señalización (directa o reversa) del complejo. Es así como en aquellas zonas donde exista una menor formación de complejos de Eph/efrina predominaría la respuesta de tipo atractiva y en aquellas zonas donde existe una menor formación de estos complejos, existiría un predominio de la respuesta de tipo repulsiva (Klein et al., 2004).

Otro hallazgo interesante es el realizado por Iguchi y colaboradores en el año 2021, donde se propone un modelo en el que conexiones entre regiones son restringidas dependiendo de la expresión de moléculas mutuamente excluyentes, como es el caso de EFNA5 y EphA7 las cuales se expresan en la corteza y cuya interacción generaría una respuesta del tipo repulsiva. Los resultados del ensayo a rayas (stripe assay) y de colapso del cono de crecimiento indicaron que EphA7 es el receptor principal de EFNA5 en la corteza (Iguchi et al.,2021). Esta interacción ya había sido advertida por Lee et al. en el año 2013 donde el complejo entre ambas proteínas sería necesario para la interacción con TNFR1 (receptor de factor tumoral 1) induciendo la internalización del complejo final activando la cascada apoptótica en células HEK293 transfectadas.

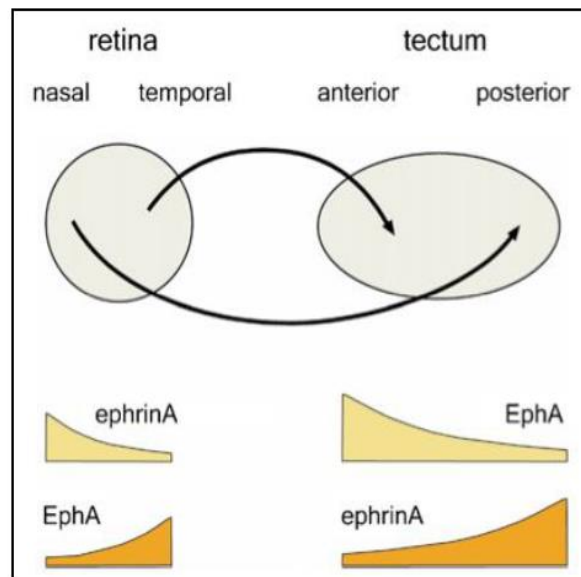


Figura 6. Proyección de axones retinales hacia el tectum anterior y posterior. Este proceso es guiado por la expresión en gradiente de ligando de efrina A y receptor de efrina A tanto en el tectum como en los axones en proyección.

1.7. Techo diencefálico y formación de la comisura posterior.

Así como se han estudiado y descrito procesos de guía axonal en la comisura de la medula espinal en vertebrados, existen otras comisuras en estos organismos que han sido mucho menos estudiadas, especialmente a nivel encefálico, tales como la comisura posterior (CP). La CP corresponde a una decusación de fibras que se originan principalmente en la región dorso-caudal (pretectum comisural) del prosómero 1 y que se extiende desde el receso pineal hasta la zona más caudal del diencéfalo dorsal y está en contacto desde estadíos tempranos con la placa del techo diencefálica (PTD). El proceso de formación de la CP no está caracterizado en su totalidad por esto el gran interés de estudio. La PTD está conformada por células del tipo glía radial, las cuales poseen largos procesos basales que atraviesan los fascículos axonales de la CP y se unen con la glía limitante (Caprile et al., 2009). Las células de la glía radial presentes en esta zona crecen de forma simultánea a la comisura posterior, motivo por el cual a este grupo de células se les ha denominado órgano subcomisural (OSC), el cual se ubica justo por debajo de la CP (Rodríguez et al., 1992; Sterba et al., 1982). Desde estadíos tempranos de desarrollo, antes de que comience el desarrollo de la CP, la PTD expresa y secreta una glicoproteína de alto peso molecular denominada OSC-espondina (Caprile et al., 2009) la cual estaría involucrada en el correcto desarrollo de la CP. Esta glicoproteína se expresa exclusivamente en la PTD, zona en la que se expresa generando un patrón de inmunorreactividad tanto cefalocaudal con disminución hacia la zona caudal, así como también un

gradiente latero-medial en donde la inmunorreactividad se ve disminuida a medida que avanza hacia la línea media. De esta manera, se puede dividir la PTD en una placa del techo diencefálica lateral (PTDL), y una placa del techo diencefálica medial (PTDM) con una clara disminución de la expresión de OSC-espondina (figura 7) (Stanic et al., 2010). Con esta información surge como interrogante conocer que moléculas serían expresadas y secretadas por las células de la zona medial.

Al realizar estudios de expresión en la zona en donde se ubica la CP nuestro grupo de investigación logró evidenciar por hibridación *in situ* en embriones de *G. gallus* la expresión de EphA7. Se observó que es altamente expresada en células localizadas en la línea media de la PTD (figura 8 A). Por otro lado, se

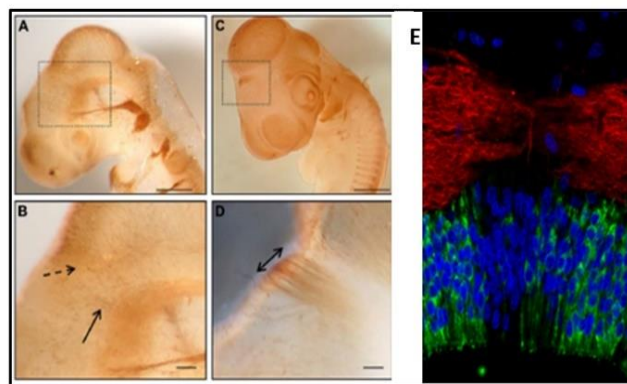


Figura 7. Inmunohistoquímica en bloque de embriones de *G. gallus* con anticuerpo anti-neurofilamentos. (A,B) Embriones de estadio HH17, en los cuales se observan los axones provenientes del área dorsal de prosómero 1 (flecha discontinua en B) (B) y axones provenientes de la placa basal del diencefalo (C,D) En estadio HH18 se observa la comisura posterior (flecha doble) como el primer tracto transversal de la región dorsal del diencefalo. (E) Inmunofluorescencia de corte frontal de CP y OSC en el prosómero 1. Verde, OSC-espondina; Rojo, NCAM; Azul, núcleos celulares (Modificado de Stanic et al., 2010).

observó que poseía un patrón de expresión complementario al de la OSC-espondina, proteína secretada por el OSC y que se conoce su relación directa con el correcto desarrollo de la CP (figura 8 B). Además, se ha observado que se expresa entre la placa pretecal basal y alar formando dos columnas celulares, una cerca de la pared endodermal y otra próxima a la membrana pial (figura 8 C) (Stanic et al., 2014). Se sospecha que esta proteína estaría involucrada en la guía de los axones de neuronas pioneras que provienen de núcleos localizados en la región ventral y de la región dorsal las cuales se proyectan hasta la línea media en donde decidirán si cruzar o girar hacia el lado ipsilateral. Esta posible participación plantea la interrogante sobre como ocurriría este proceso y cuáles serían los posibles ligandos axonales involucrados.

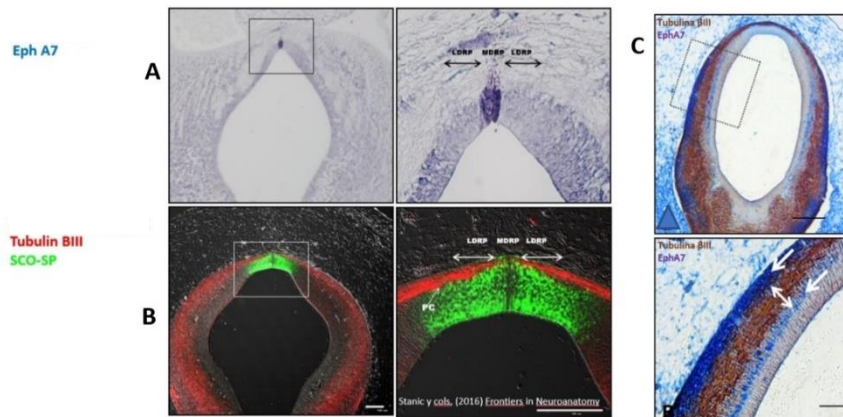


Figura 8. Expresión de EphA7 y OSC-espondina en el prosómero 1. (A) Hibridación in situ en corte para EphA7 en cortes frontales de comisura posterior y PTD de embriones de 5 días (HH26). (B) inmunofluorescencia de CP y PTD para SCO-spondina (C) Patrón de expresión EphA7 entre placa pretecal basal y alar.

Estudios previos realizados por Stanic y colaboradores en el año 2016 (Stanic et al. 2016) en donde se utilizaron morfolidos dirigidos contra la proteína de estudio EphA7 se pudo observar que el eje medial se pierde desplazando la línea media hacia la zona lateral (figura 9 B'). Por otro lado, también se puede observar la pérdida de la simetría de la estructura (Figura 9 C – C'''). Al observar el marcaje para NCAM para seguir la guía axonal de los axones en proyección podemos evidenciar la pérdida del sentido y direccionalidad de estos, resultando en la pérdida de la correcta formación de la CP. (Figura 9 C'''- D'''). Los resultados muestran la pérdida de la integridad en la formación de la CP esperada, pero, por otro lado, se pudo observar que el efecto producido por la inhibición de EphA7 fue mucho más drástico que el esperado e involucró la integridad de la PTD en su totalidad. Estos resultados sugieren que además de una función de guía axonal, esta molécula estaría involucrada en procesos de proliferación celular y morfogénesis.

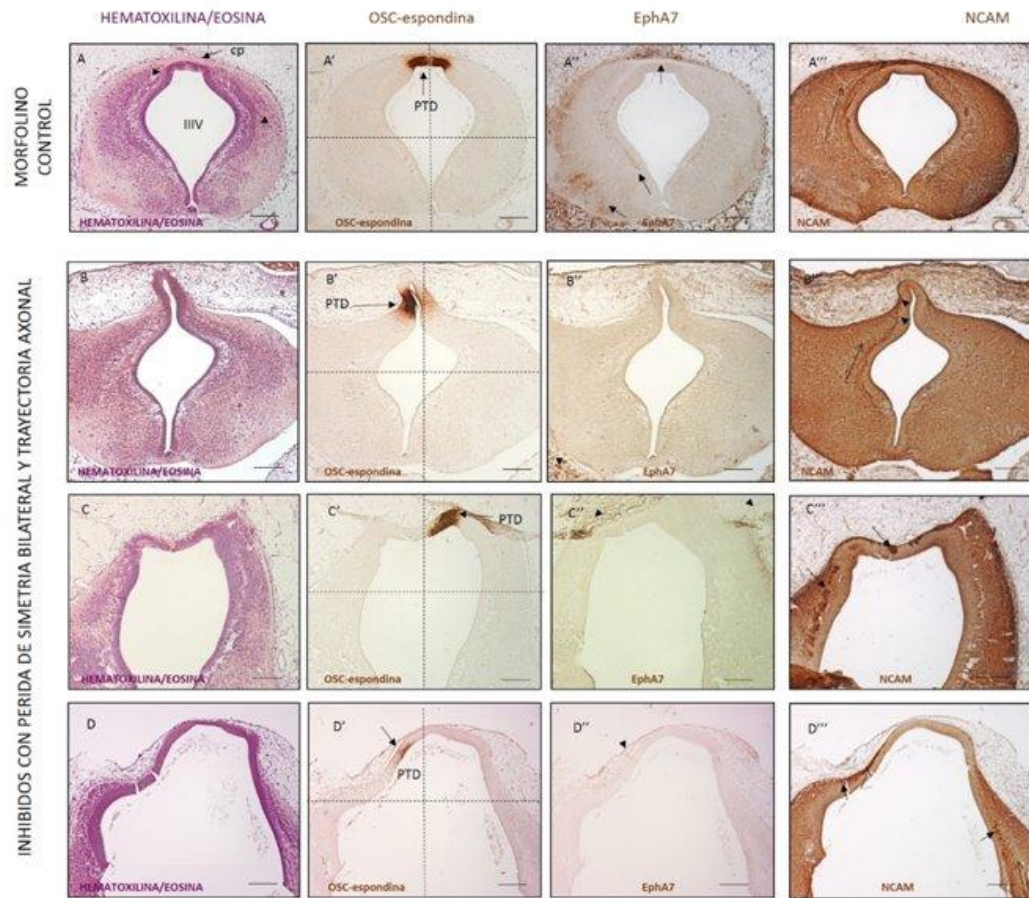


Figura 9. Inhibición in vivo de EphA7 con morfolino y posterior análisis de estadio HH31, pérdida de la simetría bilateral y de la trayectoria axonal. Columna de A, Tinción con hematoxilina/eosina; columna de A', Marcaje de OSC-spondina; columna de A'', marcaje de EphA7 y columna de A''', marcaje de guía axonal con NCAM.

1.8. Secuenciación transcriptómica de tejido proveniente de la placa del techo diencefálico.

La tecnología de secuenciación de nueva generación (NGS) ha revolucionado la investigación en genética y genómica, dando lugar a datos masivos de NGS y abriendo más frentes para responder a cuestiones no resueltas en genética y

expresión génica. Los datos de NGS suelen almacenarse en tres niveles: archivos de imagen, etiquetas de secuencia y lecturas de alineación. El tamaño de estos tipos de datos suele oscilar entre varios terabytes. Los bioestadísticos y bioinformáticos suelen trabajar con los datos de recuento de lecturas alineadas, el modelado y la interpretación de los datos para responder dudas sobre genómica y transcriptómica, entre otros (Rubio et al, 2020).

La NGS es un grupo de tecnologías diseñadas para secuenciar gran cantidad de segmentos de ADN o ARN de forma masiva en menor cantidad de tiempo y a un menor costo que la secuenciación de Sanger. Todas las técnicas NGS comparten la capacidad de secuenciar una gran cantidad de fragmentos de ADN o ARN de forma paralela en un corto lapso. Para lograr este objetivo, siguen un abordaje metodológico semejante que se puede resumir en cinco pasos: 1) segmentación del ARN en varios fragmentos, 2) marcaje del ARN por medio de partidores o adaptadores que indican el punto de partida para la replicación, 3) amplificación de los fragmentos de ARN marcados con adaptadores por métodos basados en PCR 4) secuenciación o lectura de los fragmentos de ARN y 5) reconstrucción de la secuencia completa por medio de secuencias de referencia y exportación a ficheros de almacenamiento de datos (Rubio et al., 2020). La NGS abarca la secuenciación de segunda y tercera generación, en donde la primera se caracteriza principalmente por generar lecturas más cortas o “short reads” que la secuenciación de Sanger, en cambio en la segunda se obtienen

lecturas más largas, otras diferencias abarcan la preparación de la librería y el método de amplificación.

En nuestro trabajo, en el año 2022 Farkas y colaboradores realizaron un estudio transcriptómico de la zona del OSC con el fin de identificar aquellos genes que serían expresados en esta zona tanto en estadio HH23 como en estadio HH30 del desarrollo embrionario de *G. gallus* (Farkas et al. 2022 en publicación). Para esto se realizó una secuenciación de segunda generación, escogiendo la secuenciación por síntesis brindada por tecnologías Illumina®, al mismo tiempo una segunda muestra es secuenciada por secuenciación de tercera generación o de tiempo real por industrias PacBio®. Se realizaron ambas secuenciaciones ya que la primera al entregar como resultado lecturas cortas resuelven por sí misma transcriptomas de forma limitada debido a las limitaciones técnicas del ensamblaje (Alkan et al., 2011). Por otro lado, la secuenciación en tiempo real al ser una secuenciación de lectura larga entrega resultados suficientes, pero se ha demostrado que su calidad puede ser aumentada al combinarla con secuenciaciones de lectura corta tal como la secuenciación por síntesis de Illumina® resultando en una mejora de la contigüidad de los ensamblajes (Jiao, WB et al., 2017). De este modo, la secuenciación híbrida supone superar los métodos convencionales produciendo mejores ensamblajes de transcriptoma. El análisis de esta secuenciación es finalmente analizado por una pipeline desarrollada para data de secuenciación híbrida que permite diferenciar entre ARN codificante y no codificante con lo cual al analizar la secuenciación del

transcriptoma de OSC de *G. gallus* permite identificar nuevas isoformas de OSC-espondina, nuevos genes clave y ARN no codificante (lncRNAs) que varía dependiendo de la etapa de desarrollo y puede ser crucial para el desarrollo del OSC y el diencéfalo (Farkas et al. 2022 en publicación). Por otro lado, este análisis bioinformático nos entrega resultados con los cuales podemos realizar estudios de enriquecimiento de ontología génica y de expresión diferencial al analizar la data obtenida en softwares tales como edge-R y gProfiler.

2. HIPOTESIS Y OBJETIVOS

2.1. Hipótesis.

EphA7 participa en la guía axonal de axones comisurales que forman la comisura posterior y en el correcto desarrollo del techo diencefálico. La participación de EphA's y efrinas-A en guía axonal y morfogénesis involucra habitualmente a varios miembros de la misma familia. Esto permite hipotetizar:

“Durante formación del techo diencefálico, incluyendo la comisura posterior, durante el desarrollo embrionario en *G. gallus* se expresan proteínas pertenecientes a la familia Eph/efrinas del tipo A”.

2.2. Objetivo general.

Analizar la expresión de moléculas pertenecientes a la familia de Eph/ efrinas del tipo A durante el proceso de formación del techo diencefálico en embriones de *G. gallus*.

2.3. Objetivos específicos.

1. Analizar la expresión de ARNm en el techo diencefálico de moléculas pertenecientes a la familia de Eph/efrinas del tipo A durante el desarrollo temprano de *G. gallus*.

2. Analizar la expresión proteica en el techo diencefálico de moléculas pertenecientes a la familia de Eph/ efrinas tipo A durante el desarrollo temprano de *G. gallus*.

3. MATERIALES Y METODOS

3.1. Modelo animal de estudio

Para la realización de este proyecto se utilizaron embriones de *Gallus gallus* como modelo de investigación, los cuales fueron obtenidos de huevos de campo local incubados a 38°C (incubadora Lab Tech, Modelo Lib – 080M, Korea) hasta alcanzar los estadios según la clasificación de Hamburger & Hamilton (1952), HH23 y HH30, que corresponden a 4 y 7 días respectivamente. Los estadios fueron escogidos ya que en HH23 el techo diencefálico está comenzando su formación y en HH30 este ya está en avanzado estado de desarrollo. Los procedimientos se realizaron acorde al comité de Ética de la Universidad de Concepción.

3.2. Análisis de datos obtenidos de la secuenciación transcriptómica de muestras de OSC.

Para cumplir con el primer objetivo específico se realizó un estudio de los datos obtenidos de la secuenciación de ARN (ARNseq) realizado de muestras provenientes de OSC en dos estadios distintos, HH23 y HH30. Las lecturas obtenidas del ARNseq fueron ensambladas y anotadas comparando contra un genoma de referencia y haciendo uso del pipeline “annotate_my_genome” (Farkas et al. 2022 en publicación). El conteo de genes se obtuvo utilizando el script de Python htseq-count. Haciendo uso de un análisis de ontología génica

(GO) se seleccionaron aquellos genes que estuvieran relacionados con el GO:0007411 "axon guidance". Para esto, se utilizaron tablas de la base de datos <http://www.informatics.jax.org/> y se comparó con las tablas de conteos obtenidas anteriormente. Los genes seleccionados fueron sometidos a nuevas clasificaciones GO relacionadas con las moléculas clásicas de guía axonal, GO:0016055 WNT signaling pathway; GO:0071526 semaphorin-plexin signaling; GO:0035385 Roundabout signaling pathway; GO:0038007 netrin-activated signaling pathway; GO: 0005003 Ephrin receptor activity / GO: 0048013 Ephrin receptor signaling pathway. De los genes relacionados con la actividad de efrina se tomaron los conteos de cada uno de ellos y se compararon entre sí para tener un acercamiento sobre la diferencia de expresión que podría existir entre las moléculas de cada estadio. La cuantificación de los transcritos se realizó normalizando los conteos de cada gen respecto a los conteos del gen constitutivo GAPDH. Se realizó un estudio no paramétrico "T-student" de las medidas duplicadas de cada estadio con el fin de estudiar la significancia estadística de las mediciones. Para el análisis de expresión diferencial entre los estadios HH23 y HH30, se usó el paquete Edge-R ejecutado en R versión 4.2 resultando en los datos de FDR y Log2FC con los que se realizó un Heat-map en RStudio. Se utilizaron los valores de *Fold-change* (FC) el cual corresponde a una tasa de cambio la cual nos indicaría cual condición predomina al comparar una condición A y B, en este caso las condiciones corresponden a los dos estadios en los que se realizó la secuenciación (condición A, estadio HH23; condición B, estadio

HH30), en base a este valor podemos clasificar a los genes si se expresan mayoritariamente en un estadio temprano o tardío tomando como referencia un valor *Threshold* arbitrario. Por otro lado, haciendo uso de FDR se obtuvo el valor ajustado de *p-value* para cada gen n analizado dentro de la muestra N total de genes, lo cual nos permite reducir el error inducido por el estudio de cada gen por separado.

3.3. Extracción de ARN y obtención de producto RT-PCR para moléculas de estudio.

Para validar los datos obtenidos se realizó un análisis de la expresión génica en estadios HH23 y HH30 de embriones de *G. gallus* de algunas de las moléculas identificadas y seleccionadas según el grado de expresión observados en el estudio bioinformático previo (EphA4; EphA3 y EFNA5), mediante la generación de ADNc a partir de ARN obtenido por disección del techo diencefálico caudal (Figura 10). Luego de disecar el tejido se realizó la purificación del ARN utilizando el kit “RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen)” para luego realizar la síntesis de ADNc haciendo uso del protocolo estandarizado representado en la tabla 1. Este ADNc resultante se utilizó como molde para realizar un qPCR, con el fin de cuantificar el ARN proveniente de la muestra de OSC. Para la obtención del producto de qPCR se diseñaron partidores específicos para las moléculas EphA7 y EFNA5

SÍNTESIS ADNc	SÍNTESIS CONTROL NEGATIVO
Agua grado Biología molecular (GBM) hasta completar 13 uL Volumen Final	Agua grado Biología molecular (GBM) hasta completar 6,5 uL Volumen Final
1.0 µg de ARN total	0.5 µg de ARN total
1.6 uL Oligo (dt)18	---
5 minutos 70° C	5 minutos 70° C
15 minutos 4° C	15 minutos 4° C
2 uL dNTS	1 uL dNTPS
4 uL buffer 5X M-MuLV Reverse Transcriptase	2 uL buffer 5X M-MuLV Reverse Transcriptase
4 uL Enzima M-MuLV Reverse Transcriptase	---
60 minutos 42° C	60 minutos 42° C
15 minutos 65° C	15 minutos 65° C

Tabla 1. Protocolo de obtención de ADNc efectuando dos reacciones, una de ellas haciendo uso de la enzima transcriptasa reversa y la otra no, con el fin de obtener un control negativo.

Partidor	Secuencia
EFNA5-Rv	5'-ACCCCATTCACAGCTTCAAC-3'
EFNA5-Fw	5'-GCAGGGTGAATGTGTTCCTT-3'
EphA7-Rv	5'-TTGGCAACAACATTTGCATT-3'
EphA7-Fw	5'- TTGTCAGTTTGGCACATGGT-3'

Tabla 2. Secuencia de partidores Forward (Fw) y Reverse (Rv) para EFNA5 y EphA7 utilizados en la qPCR.

(tabla 2) de *G. gallus* utilizando como herramienta bioinformática el software Primer3Plus® cumpliendo con los parámetros de tamaño de producto PCR, %GC y Tm de los primers (Tamay de Dios et al., 2013; Bustin, S. A., Mueller, R., & Nolan, T., 2020) calculados con la Herramienta “OligoAnalyzer™ Tool” disponible en Integrated DNA Technologies, IDT®. Como control interno de la técnica se utilizaron partidores dirigidos contra el gen (housekeeping) GAPDH de *G. gallus* y como control negativo se realizó la técnica sin la muestra con ADNc. La

reacción (tabla 3) se realizó en el termociclador Agilent AriaMX y el programa de la misma se puede observar en la tabla 4. Los resultados fueron analizados con el software “Agilent AriaMx” recomendado por Agilent Technologies, industria a la que pertenece el termociclador utilizado.

REACTIVO	VOLUMEN (μL)
Sybr green	5.0
Partidor Forward	0.4
Partidor Reverse	0.4
Agua GBM	3,2
ADNc	1.0
Total	10

Tabla 3. Reactivos y volúmenes utilizados para la reacción de qPCR.

ETAPA	TEMPERATURA	TIEMPO
1	70° C	5 minutos
	4° C	15 minutos
2	42° C	60 minutos
	65° C	15 minutos
	4° C	Indefinido

Tabla 4. Programa utilizado para la reacción de qPCR.

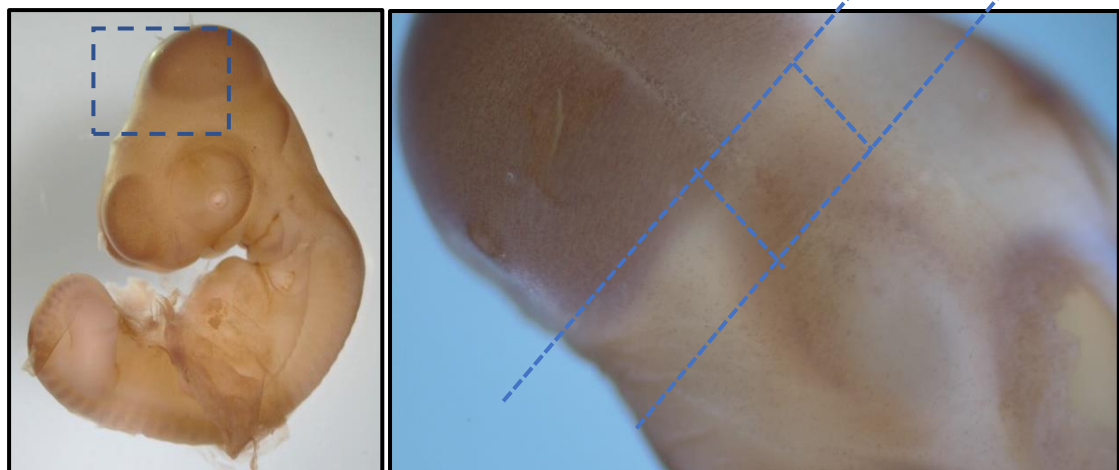


Figura 10. Cortes de disección realizados al embrión para realizar el extracto de ARN

3.4. Western-blot de extractos provenientes de OSC.

La expresión proteica de las moléculas de Eph/efrinas tipo A seleccionadas se analizó por Western Blot de extracto proteico obtenido de la lisis del tejido del techo diencefálico disecado de un pool de embriones en estadíos de desarrollo HH23 y HH30. Los cortes obtenidos son recuperados en Bicarbonato de amonio adicionando inhibidor de proteasa al 1X, posteriormente es sometido a una lisis mecánica haciendo uso de un sonicador “Sonics Vibra Cell” dando 4 ciclos de 15 segundos (60% amplitud) con 10 segundos de descanso (a 4°C) evitando la formación de burbujas y luego centrifugado a 12 000 RPM por 15 minutos a 4° C para obtener el extracto de proteínas. Por otro lado, se realizó extracto de ojos provenientes de embriones HH30 para utilizar como control positivo. Los extractos fueron cuantificados en el espectrofotómetro “Nanodrop lite” de thermo scientific. Las proteínas presentes en el extracto fueron fraccionadas a través de electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% por 3,5 horas a 70 V para luego ser electrotransferidas a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF) a 30 mA. Posteriormente se realizó un inmunoblotting a la membrana utilizando anticuerpos específicos contra las moléculas de Eph/efrinas tipo A seleccionadas anteriormente (tabla 5) o marcadores axonales (Tuj), neuronales (NCAM), OSC-espondina (AFRU). Para corroborar que las proteínas fueron transferidas a la membrana, previo a la incubación con el anticuerpo se realizaron tinciones con rojo Ponceau. Previo a la incubación con el anticuerpo primario se bloqueó la membrana con 5% leche en TBS. Las incubaciones con el anticuerpo primario se

realizaron toda la noche (16 h) a 4° C en TBS-Tween 0,5X y 3% leche. La incubación con el anticuerpo secundario se realizó con anticuerpos anti-IgG contra la especie específica que además estará acoplado a una enzima HRP. Finalmente se realizó el revelado agregando el sustrato de la enzima (peróxido de hidrogeno) y luminol a la membrana de PVDF identificando las proteínas que estarían presentes en la zona estudiada por quimioluminiscencia (Figura 11) utilizando el equipo I-Bright de Thermofisher®. Se utilizó como control de carga un anticuerpo comercial contra α -actina de pollo.

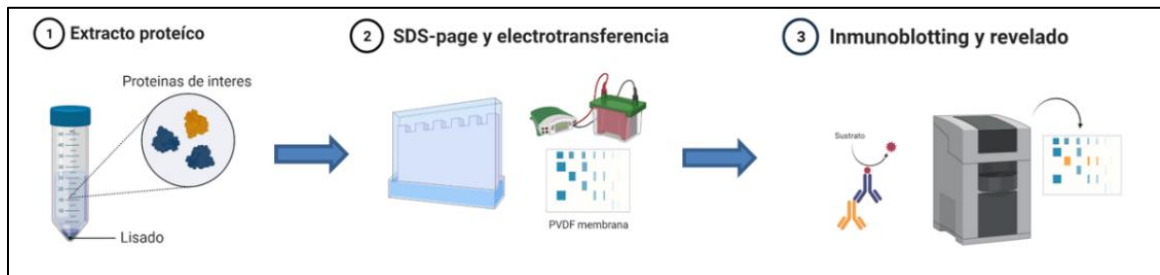


Figura 11. Representación gráfica del flujo de trabajo para la técnica Western-blot. 1) Obtención del extracto proteico mediante la disecación de la zona de la cp. 2) Fraccionamiento de la muestra en gel de poliacrilamida seguido de electrotransferencia en membrana de PVDF. 3) Inmunoblotting con anticuerpos específicos y detección por quimioluminiscencia.

3.5. Inmunofluorescencia de cortes provenientes de OSC.

Con el fin de estudiar la expresión y la localización de las proteínas pertenecientes a la familia de Eph/efrinas en la placa del techo diencefálico se realizaron ensayos de inmunofluorescencia de cortes sagitales y frontales (Figura 12) provenientes de embriones de *G. gallus* en estadíos HH23 y HH30 incluidos en parafina (figura 13). Primero se realizó el procesamiento histológico de la

muestra, para lo cual los embriones extraídos de los huevos incubados fueron fijados por completo mediante la utilización de Carnoy (60% alcohol absoluto + 30% Cloroformo + 10% Ácido acético glacial) por 24h. La inclusión en parafina se realizó mediante la deshidratación del espécimen con alcohol 100% y el tratamiento con HistoClear I, II y III por 15, 30 y 180 min respectivamente. Posteriormente, al realizar los tacos de los especímenes, los embriones fueron orientados de manera de obtener cortes frontales o sagitales de 7-8 μ m con el microtomo MICROM HM 325, Thermo Scientific. El seriado se realizó mediante la desparafinación e hidratación de los cortes (1 cada 10 cortes) en HistoClear y alcoholes en concentraciones decrecientes. Luego se realizaron tinciones de hematoxilina-eosina para ubicar y seleccionar los cortes pertenecientes a la zona de interés, los que fueron montados en portaobjetos previamente tratados con poli-L-lisina.

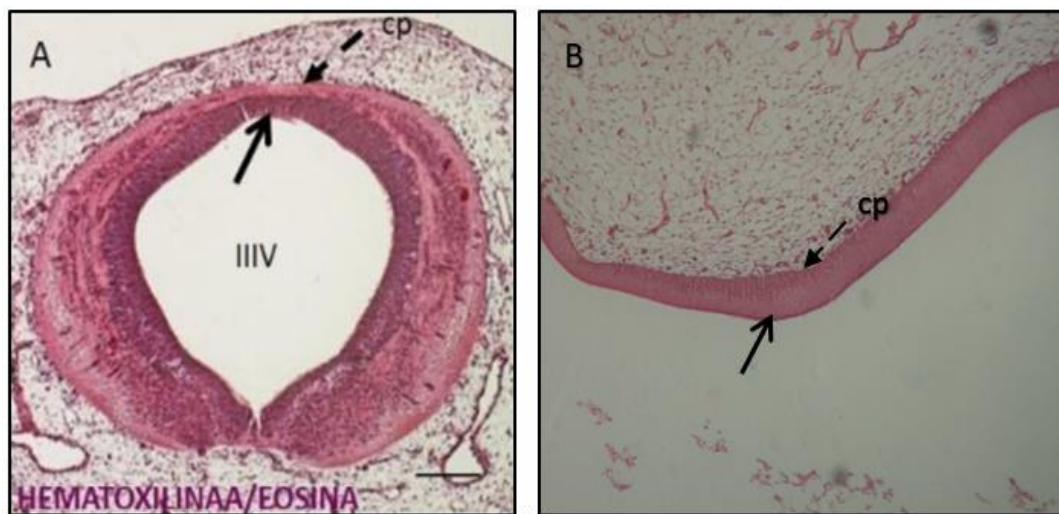


Figura 12. Tinción con hematoxilina y eosina de (A) Corte frontal y (B) corte sagital de órgano subcomisural (OSC) de embriones *G. gallus* HH30. Con flecha solida se indica el OSC, Con flecha discontinua se indica la comisura posterior (cp).

Luego de desparafinar e hidratar los cortes seleccionados y montados en portaobjetos, estos fueron tratados con borohidruro de sodio 10 mg/mL para inhibir la fluorescencia endógena. Posteriormente se realizaron 3 lavados de 10 min con buffer fosfato (PBS) pH 7,8 1X (Na_2HPO_4 8,4 mM, KH_2PO_4 3,5 mM, NaCl 120 mM, Tris 10 mM). Seguido de los lavados se realizaron las incubaciones de los anticuerpos primarios diluidos en PBS con Tris-BSA 1% más Tritón 0,05% en cámara húmeda durante toda la noche. Los anticuerpos utilizados y sus concentraciones correspondientes se pueden observar en la tabla 5. Tras la incubación con los anticuerpos primarios nuevamente se realizaron lavados con PBS 1X y luego se incubaron las muestras con los anticuerpos secundarios acoplados a fluoróforo descritos en la tabla 5 por 2h en oscuridad, además se adicionó como tinción nuclear TOPRO-3 en dilución 1:500 en Tris-BSA 1%. Posterior a la incubación con los anticuerpos secundarios se realizaron tres lavados con PBS para luego ser montados en medio para fluorescencia

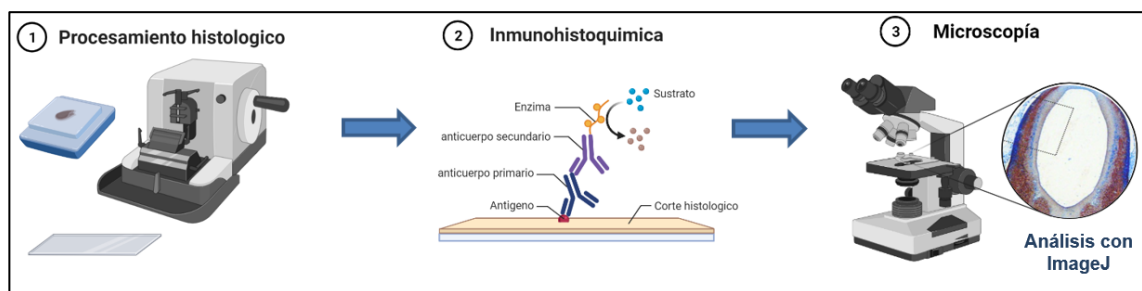


Figura 13. Representación del flujo de trabajo para la inmunofluorescencia. 1) Procesamiento histológico de las muestras con uso de Carnoy como fijador previo a la inclusión en parafina. 2) inmunohistoquímica en corte. 3) Visualización de los cortes por microscopía confocal.

DAKO. Como control negativo del anticuerpo se realizó la técnica sin anticuerpo primario, como control positivo para el anticuerpo se realizó inmunohistoquímica de cortes de retina de pollo, zona donde se ha descrito la expresión de moléculas de efrina (Ortalli, A.L. et al., 2012), como control positivo de la técnica se realizó una inmunohistoquímica con AFRU, anticuerpo dirigido contra la fibra de Reissner de conejo que reconoce OSC-espondina (Caprile et al., 2009). Finalmente, los cortes fueron visualizados y analizados mediante microscopía de fluorescencia confocal (CMA BIO-BIO). Los datos obtenidos fueron analizados con el software ImageJ 1.45.

ANTICUERPO (Antígeno)	TIPO	DILUCIÓN	PROCEDENCIA
ANTICUERPOS PRIMARIOS			
Afru 11 (OSC-espondina)	Policlonal de conejo	IF: 1:250	Merck Millipore
NCAM	Monoclonal Ratón	IF: 1:2	DSHB
Tuj1 (Neuron-specific Tubulin β III)	Monoclonal Ratón	IF: 1:200	R&D Systems, Inc.
Anti-EphA7	Policlonal Conejo	WB: 1:250 IF: 1:50	MyBiosource
Anti-EphA4	Monoclonal Ratón	WB: 1:500 IF: 1:250	MyBiosource
Anti-EFNA5	Policlonal Conejo	WB: 1:500 IF: 1:100	MyBiosource
Anti- α Actina	Policlonal Conejo	WB: 1:10000	Invitrogen
ANTICUERPOS SECUNDARIOS			
Anti-IgG Conejo Alexa fluor® 488	Anticuerpo de Cabra	IF: 1:300	Invitrogen
Anti-IgG Ratón Alexa fluor® 555	Anticuerpo de Cabra	IF: 1:300	Invitrogen
Anti-IgG Conejo marcado con peroxidasa	Anticuerpo de Burro	WB: 1:10000	Jackson ImmunoResearch
Anti-IgG Ratón marcado con peroxidasa	Anticuerpo de Burro	WB: 1:10000	Jackson ImmunoResearch
OTROS MARCADORES			
TOPRO-3 (marcaje nuclear)	661nm emisión 642nm excitación	IF: 1:500	Invitrogen

Tabla 5. Anticuerpos primarios, secundarios y otros marcadores utilizados en la elaboración de este trabajo.

4. RESULTADOS

4.1. Análisis de la expresión de ARNm en el OSC de moléculas pertenecientes a la familia de Eph/efrinas del tipo A durante el desarrollo temprano.

4.1.1. Análisis de datos obtenidos de la secuenciación transcriptómica de muestras de OSC.

Al realizar el análisis de los conteos promediados de transcritos anotados y el estudio de enriquecimiento ontogénico se observó que en el estadio HH23 para un conteo total de 52.674.904 un 2% de estos conteos corresponderían a transcritos relacionados con la guía axonal (“axon guidance”) (Figura 14.A). Con respecto al estadio HH30 se pudo observar que de un total de 48.752.551 conteos un 3% correspondería a transcritos relacionados con guía axonal (Figura 14.B). Al clasificarlos según su relación con las moléculas clásicas de guía axonal se observó que para HH23 del 2% de conteos un 14% corresponderían a

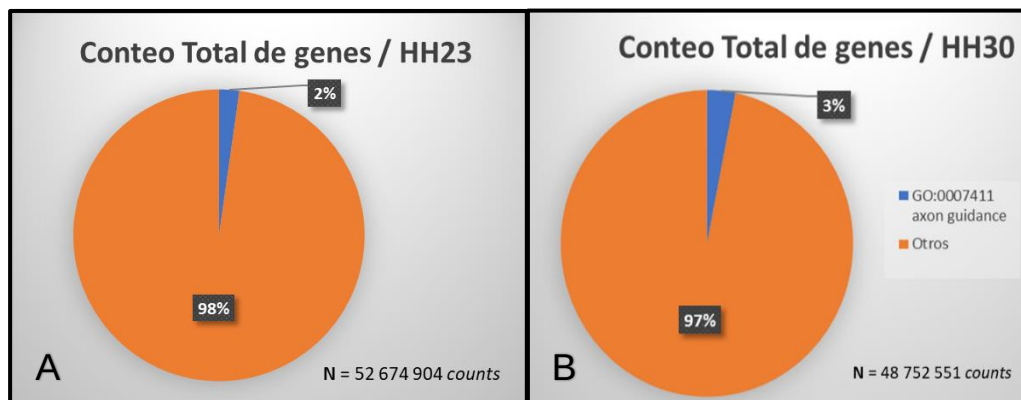


Figura 14. Porcentaje de genes relacionados con “GO:0007411 axon guidance” del conteo total de genes anotados. (A) HH23 (B) HH30.

transcritos relacionados con el GO:0016055 WNT signaling pathway; un 16% para GO:0071526 semaphorin-plexin signaling; un 1% para GO:0035385 Roundabout signaling pathway; un 2% para GO:0038007 netrin-activated signaling pathway y un 11% para GO:0005003 + GO:0048013 ephrin receptor signaling pathway/ephrin receptor activity. El 56% restante corresponde a la población de transcritos de guía axonal no clasificados en vías de señalización específicas (Figura 15 A). Respecto al estadio HH30 del 3% de conteos correspondientes a genes relacionados con la guía axonal, un 13% corresponderían a transcritos relacionados con el GO:0016055 WNT signaling pathway; un 16% para GO:0071526 semaphorin-plexin signaling; un 1% para GO:0035385 Roundabout signaling pathway; un 1% para GO:0038007 netrin-activated signaling pathway y un 8% para GO:0005003 + GO:0048013 ephrin receptor signaling pathway/ephrin receptor activity. El 61% restante corresponde a la población de transcritos de guía axonal no clasificados como parte de las vías de señalización (Figura 15.B). El análisis de transcritos relacionados con el

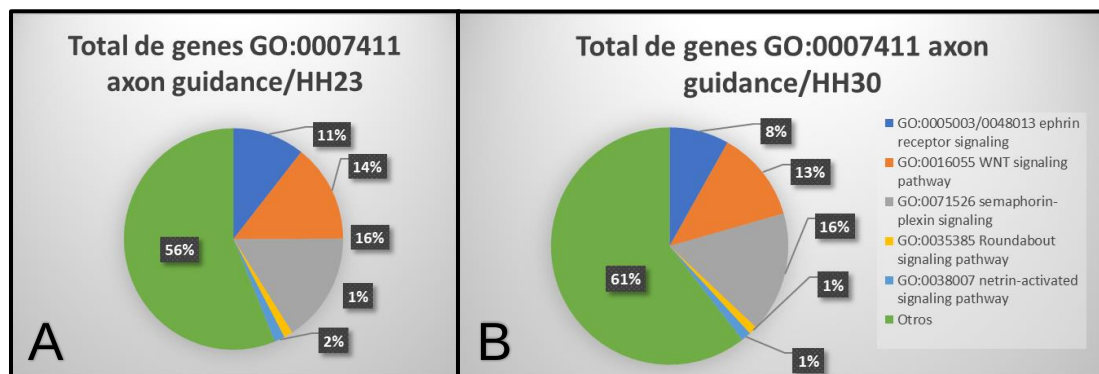


Figura 15. Clasificación por GO de moléculas clásicas de guía axonal de la población total de counts relacionados con guía axonal. (A) HH23 (B) HH30

GO:0005003 + GO:0048013 involucrados en la actividad del receptor de efrina y su clasificación según el tipo, ya sea receptor, ligando o correceptor se indican en la tabla 6. La comparación de los conteos entre las moléculas Eph/efrinas se muestra en la figura 16 donde se observó un alto nivel para el receptor de efrina B2 (EphB2) y el ligando EFNB1, y a lo que respecta a moléculas de Eph/efrinas de tipo A destacan EphA3; EphA4, EphA7 y EFNA5 para ambos estadíos estudiados. El análisis del nivel de expresión de los transcritos se puede observar en la Figura 17, para las Eph/efrinas de tipo A, y en la figura 18, para las Eph/efrinas de tipo B encontradas, donde se marca con asteriscos el grado de significancia estadística en el nivel de expresión para ambos estadíos de cada molécula. Se analizó la expresión diferencial de GAPDH con el fin de utilizarlo como gen *housekeeping* observándose una diferencia no significativa entre ambos estadíos tal como se esperaba. Se observó una mayor diferencia de expresión entre estadíos en los receptores EphA1, EphA2 y EphA8, con una mayor expresión en HH23; y en EFNA5, con una mayor expresión en HH23, en cambio para EphA4, EphA7 y EphA10 se observó un cambio estadísticamente no significativo. Por otro lado, también se observaron Eph/efrinas de tipo B como se muestra en la figura 18 observándose una mayor diferencia en la expresión entre estadíos en EphB1, con un mayor nivel de expresión en HH30, además destacan los receptores EphB3 y EphB6, y el ligando EFNB1 con un mayor nivel de expresión en HH23. Para una visualización en conjunto del análisis de expresión diferencial se usaron los datos entregados por Edge-R mostrados en

la tabla 7 para elaborar un heatmap (figura 19) el cual indica en que estadio predomina la expresión de cada transcrito y facilita su visualización en conjunto.

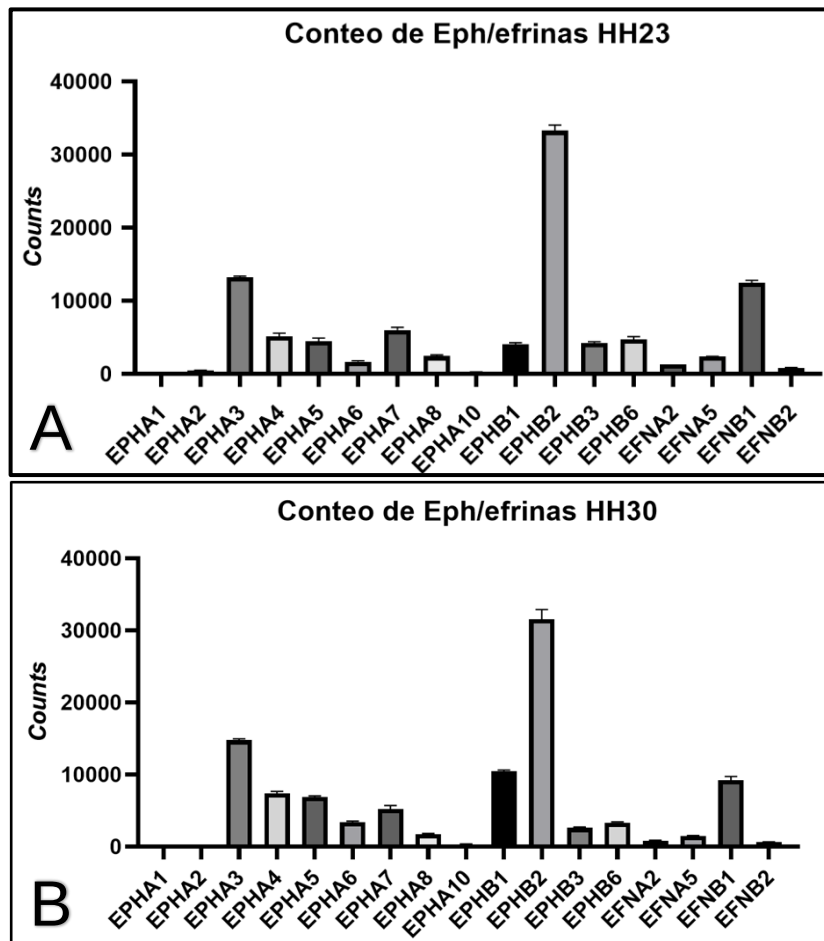


Figura 16. Gráfico de barras para los conteos de moléculas de Eph/efrinas detectados por secuenciación transcriptómica en la zona del OSC. (A) HH23 (B) HH30

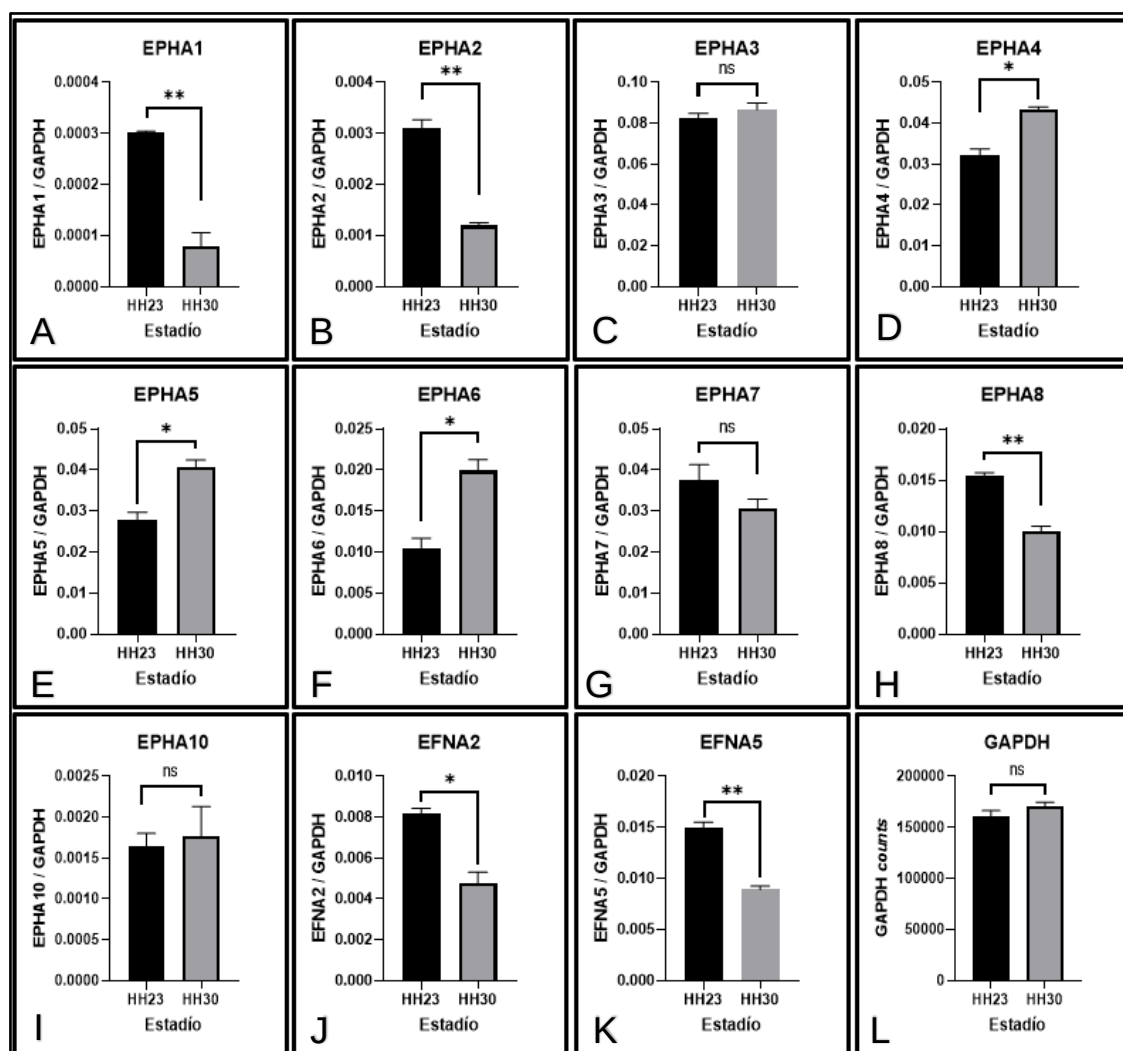


Figura 17. Cuantificación de transcritos por ARNseq y normalizado respecto a GAPDH. (A) EphA1 (B) EphA2 (C) EphA3 (D) EphA4 (E) EphA5 (F) EphA6 (G) EphA7 (H) EphA8 (I) EphA10 (J) EFNA2 (K) EFNA5 (L) GAPDH. Significancia estadística, * (P-value ≤ 0.05); ** (P-value ≤ 0.01); *** (P-value ≤ 0.001); ns, no existe significancia (P-value > 0.05). Se realizó estudio no paramétrico t-Student.

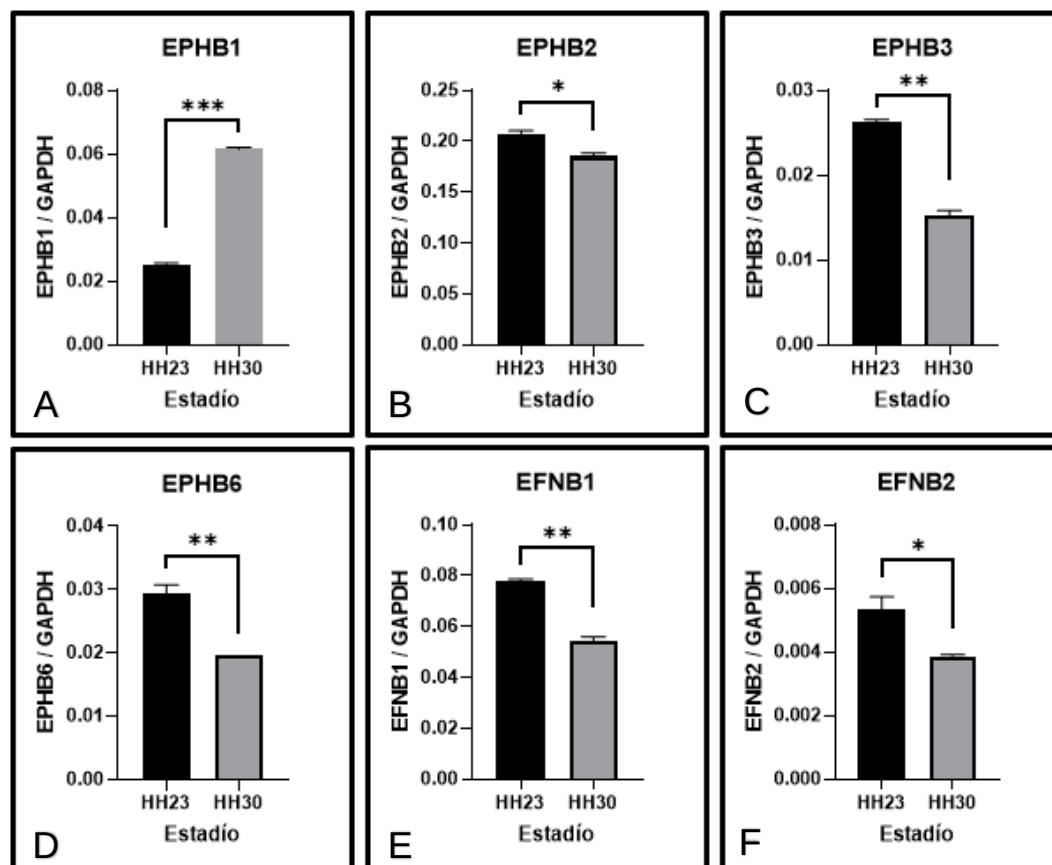


Figura 18. Cuantificación de transcritos por ARNseq y normalizado respecto a GAPDH. (A) EphB1 (B) EphB2 (C) Ephb3 (D) Ephb6 (E) EFNB1 (F) EFNB2. Significancia estadística, * (P-value ≤ 0.05); ** (P-value ≤ 0.01); *** (P-value ≤ 0.001); ns, no existe significancia (P-value > 0.05). Se realizó estudio no paramétrico t-Student.

	Gene	HH23_1	HH23_2	HH30_1	HH30_2
Receptores Tipo A	EPHA1	47	50	17	10
	EPHA2	504	494	200	207
	EPHA3	13152	13343	14614	14927
	EPHA4	4833	5468	7592	7162
	EPHA5	4151	4799	6826	7025
	EPHA6	1770	1587	3290	3496
	EPHA7	6282	5770	5578	4841
	EPHA8	2358	2571	1798	1611
	EPHA10	274	250	351	253
Ligandos Tipo A	EFNA2	1308	1324	893	740
	EFNA5	2399	2402	1502	1535
Receptores Tipo B	EPHB1	3914	4211	10601	10385
	EPHB2	32730	33825	32520	30619
	EPHB3	4095	4361	2716	2499
	EPHB6	4441	4996	3415	3301
Ligandos Tipo B	EFNB1	12246	12721	9596	8836
	EFNB2	877	832	676	642
Correceptores	CDK5R1	2289	2467	6534	5601
	CHN1	6357	6662	9397	8952
	NOTCH1	19911	20480	9648	9177
	NTRK1	5	5	2	2

Tabla 6. Clasificación según Receptor, Ligando y Correceptor de los transcritos presentes en ambas réplicas de los estadios HH23 y HH30.

	Gene	Log2FC	Log2CPM	PValue	FDR
Receptores Tipo A	EPHA2	-1,34395	11,76078	4,47E-21	8,45E-21
	EPHA3	0,081786	17,0289	0,00018	0,000191
	EPHA4	0,520298	15,86374	3,73E-43	1,59E-42
	EPHA5	0,738934	15,70704	4,19E-69	3,56E-68
	EPHA6	1,011349	14,64081	3,2E-30	1,09E-29
	EPHA7	-0,41504	15,54981	6,83E-20	1,16E-19
	EPHA8	-0,57179	14,37416	1,89E-08	2,47E-08
	EPHA10	0,138608	11,43031	0,270748	0,270748
Ligandos Tipo A	EFNA2	-0,66467	13,37233	1,73E-08	2,46E-08
	EFNA5	-0,95792	14,08625	1,1E-21	2,34E-21
Receptores Tipo B	EPHB1	1,42365	16,18786	0	0
	EPHB2	-0,09848	18,32945	3,47E-12	5,36E-12
	EPHB3	-0,71217	15,11936	1,56E-25	3,79E-25
	EPHB6	-0,57819	15,1892	4,98E-27	1,41E-26
Ligandos Tipo B	EFNB1	-0,4532	16,7885	5,9E-68	3,34E-67
	EFNB2	-0,56988	12,75562	1,54E-07	1,74E-07

Tabla 7. Tabulación de datos entregados por edge-R para moléculas de Eph/efrinas clasificadas según receptor o ligando de tipo A y B. Se muestra nombre de transcrito (Gene); Tasa de Cambio entre condición A y condición B en escala logarítmica en base 2 (Log2FC); Promedio de conteos por millón entre Condición A y condición B en log base 2 (Log2CPM); Valor p-Value por cada gen (P-Value); P-value ajustado a las múltiples comparaciones (FDR). FDR = 0.05.

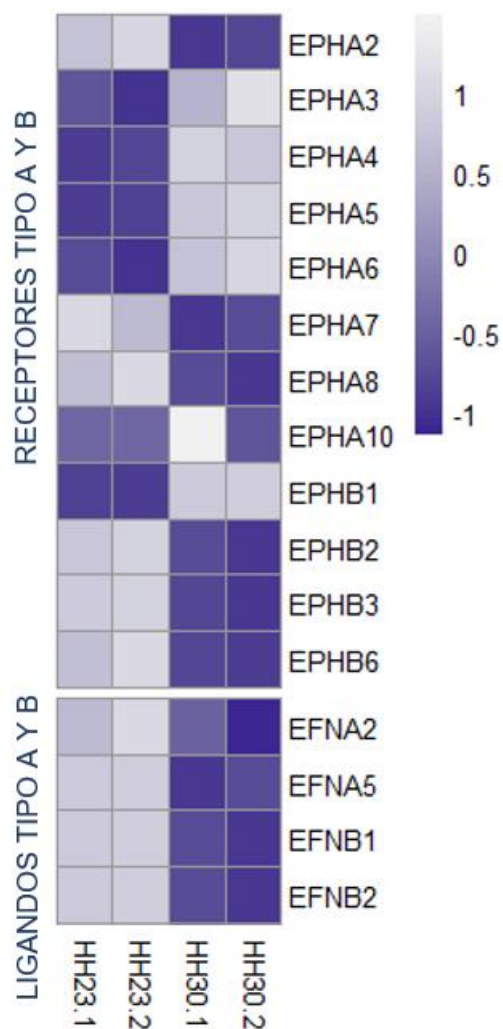


Figura 19. Estudio de expresión diferencial mediante pHeatmap de Eph/efrinas tipo A y B obtenido con RStudio® para estadios HH23 y HH30. Recuadros de color Azul indican zonas frías que se traduce en un menor nivel de expresión, los recuadros de un color más claro indican zonas de mayor calor que se traduce en un mayor nivel de expresión del transcrito.

4.1.2. Validación de los resultados obtenidos del análisis de la secuenciación transcriptómica por RT-qPCR

Los resultados obtenidos anteriormente en el análisis de la secuenciación transcriptómica nos permitieron tener un acercamiento de lo que podría estar expresándose diferencialmente en los dos estadios analizados. Algunos de estos resultados fueron validados mediante RT-qPCR con el fin de corroborar los datos obtenidos mediante ARNseq. Para la qPCR se realizaron 8 reacciones por molécula a identificar, triplicados con ADNc de cada estadio estudiado y dos reacciones *no template control* o “NTC” en las cuales no se incluye el ADNc obtenido previamente por transcripción reversa. En resultados concluyentes para EFNA5 (figura 20.A) se observó que este transcrito se estaría expresando en la placa del techo del prosómero 1, zona de donde se extrajo el tejido para el extracto. Al cuantificar los datos entregados por el termociclador calculando la tasa de cambio respecto a GAPDH, como gen constitutivo, se observó que EFNA5 se estaría expresando el doble en HH23 que en HH30 (Figura 20.C). En la Figura 20.B se muestra la curva de *Melting* lograda en la reacción para cada amplificación.

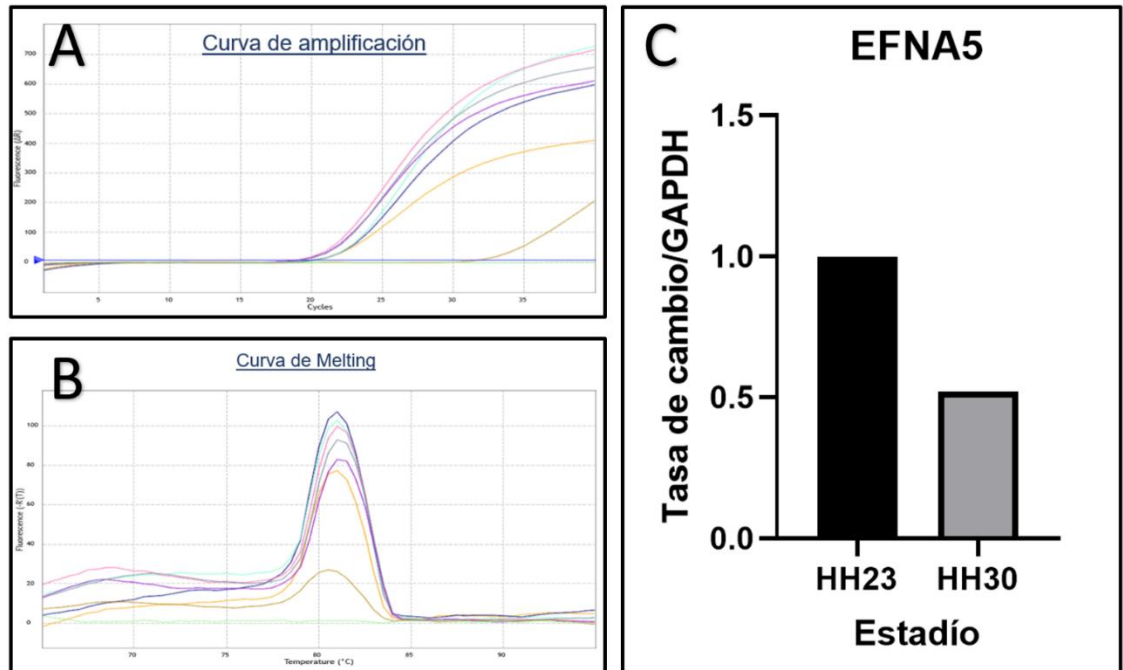


Figura 20. (A) Curva de amplificación y (B) curva de Melting para reacción de qPCR contra EFNA5 (C) Cuantificación por RT-qPCR de transcritos de EFNA5 en OSC de embriones de *G. gallus*. Se observa el doble de expresión de ARNm en estadios HH23 que en HH30.

4.2. Análisis de la expresión proteica en el techo diencefálico de moléculas pertenecientes a la familia de Eph/ efrinas tipo A durante su desarrollo temprano.

4.2.1. Western-blot de extracto proveniente del OSC de embriones de *G. gallus*.

4.2.1.1. Estandarización de la técnica de Western Blot

Con el fin de estudiar la expresión proteica de moléculas pertenecientes a la familia de Eph/efrinas de tipo A es que se realizaron ensayos de Western Blot de extractos proteicos obtenidos de la disección del techo del prosómero I, área donde se encuentra el OSC y la CP. Para el estudio de la expresión proteica de

EphA4 utilizando anticuerpos específicos dirigidos contra esta molécula y luego de revelar por quimioluminiscencia se observó un total de 4 bandas a la altura de 100-120 kDa; 37 – 50 kDa; 20 kDa y 10-15 kDa (figura 21.A). Bases de datos como uniprot y ncbi registran un peso molecular para esta proteína de unos 110 kDa aproximadamente. El resto de las bandas en los pesos moleculares ya descritos se cree que pueden ser posibles clivajes de la molécula, ya que al revisar las bases de datos del genoma de *G. gallus* solo se reporta la proteína completa (*Full-Lenght* (FL)). Al realizar el ensayo de *immunoblotting* para EFNA5 se observó señal a altos pesos moleculares, por sobre 120 kDa (resultado no mostrado), lo cual era poco probable teniendo en cuenta que su peso molecular está cercano a los 20 kDa. Por este motivo se procedió a estandarizar el ensayo de Western Blot esta vez orientado a detectar nuestras moléculas de Eph/efrinas, cambiando todas aquellas variables que pudieron interferir en nuestros resultados.

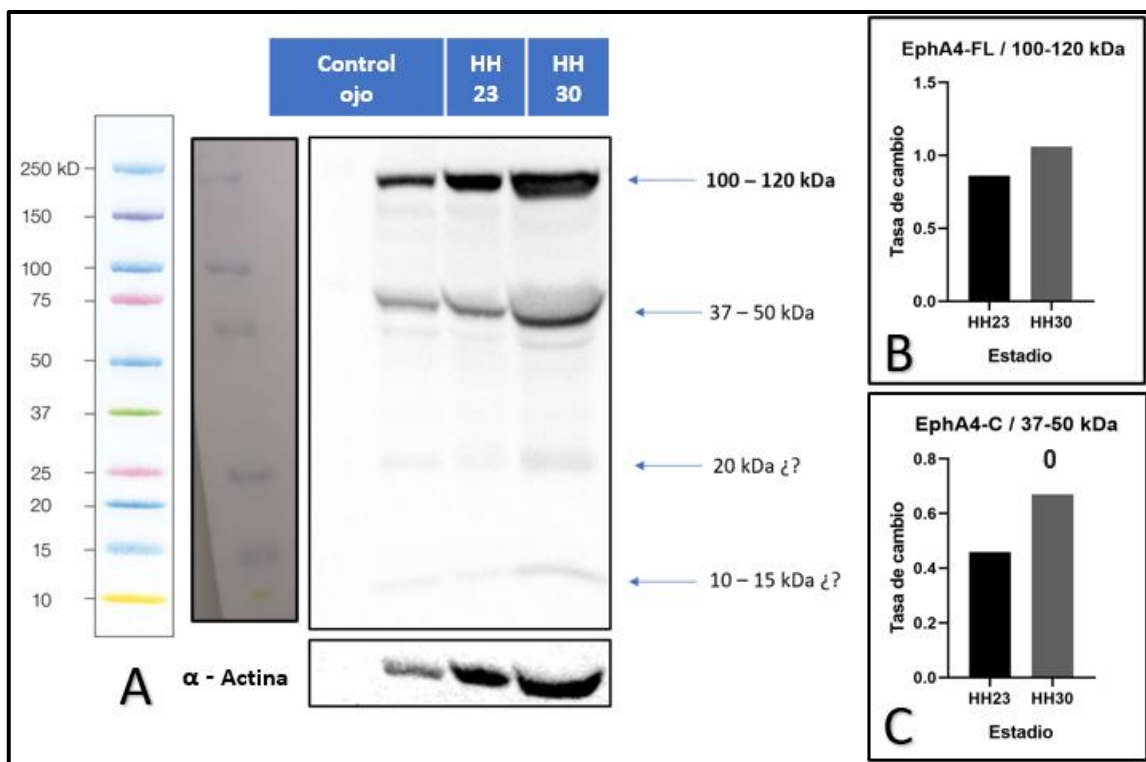


Figura 21. Western Blot para EphA4 previo a la estandarización del ensayo. (A) Membrana de PVDF marcada con bandas a 100 -120 kDa; 37 – 50 kDa; 20 kDa y 10 – 15 kDa (B) Cuantificación de banda 100 – 120 kDa (C) Cuantificación de banda 37 – 50 kDa.

4.2.1.2. Expresión de moléculas Eph/efrinas en el OSC.

Los resultados del nuevo ensayo se observan en la figura 22.A para la proteína EphA4 en donde se observaron nuevamente las bandas a un peso molecular de 100-120 kDa y 37 – 50 kDa, sin embargo, ya no se observó bandas en los pesos de 20 y/o 10-15 kDa. Al cuantificar las bandas utilizando el software imageJ 1.53 y haciendo uso de α -Actina como control de carga (figura 22.A) se observó que existe el doble de expresión de EphA4 de peso molecular 100-120 kDa en

estadios HH30 que en estadios HH23 (Figura 22.B). Por otro lado, EphA4 de 37-50 kDa no presentó un cambio estadísticamente significativo en la expresión diferencial al calcular la tasa de cambio entre ambos estadios (Figura 22.C). El anticuerpo utilizado en el ensayo está dirigido contra el dominio C-terminal de la proteína, por lo tanto, la banda que se observó podría corresponder a la zona C-terminal de una posible isoforma truncada de la proteína original (Gatto et al., 2014), por lo que las bandas de 100-120 kDa y de 37-50 kDa fueron descritas como EphA4-FL y EphA4-C respectivamente.

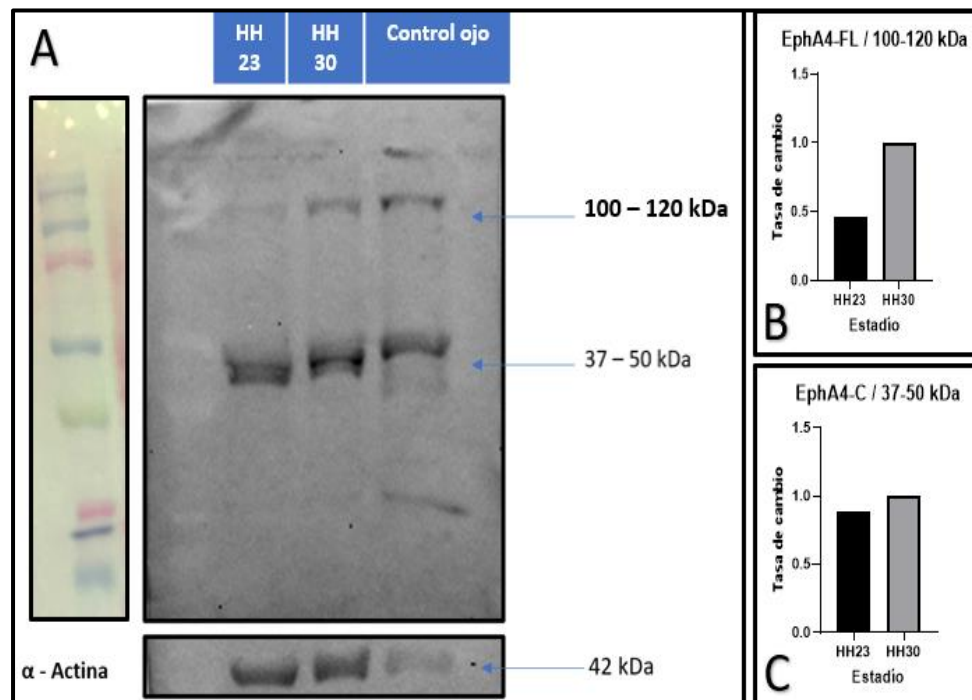


Figura 22. Western Blot para EphA4 post estandarización del ensayo. (A) mostrando el estándar de pesos moleculares (izda) y el resultado de Western Blot usando extracto de OSC de *G. gallus* en estadio HH23, HH30 y control positivo (ojo) y anticuerpo contra EphA4. Se observan bandas a 100 -120 kDa; 37 – 50 kDa y el control de carga a-actina a 42 kDa (B) Cuantificación de banda 100 – 120 kDa o EphA4-FL (C) Cuantificación de banda 37 – 50 kDa o EphA4-C.

El ensayo de Western Blot realizado para estudiar la expresión de la proteína EFNA5 se muestra en figura 23.A. Las bases de datos ensembl y ncbi describen un peso molecular cercano a los 25 kDa para el ligando EFNA5. Se observó que la banda resultante del revelado para la tinción inmunológica de la membrana se detectó a un peso molecular entre 20 y 25 kDa (Figura 23.A). Al cuantificar la banda haciendo uso del software imageJ 1.53 y como control de carga la proteína α -Actina, se logra evidenciar que la proteína estaría expresándose 4 veces más en estadio HH23 que en HH30 (Figura 23.B).

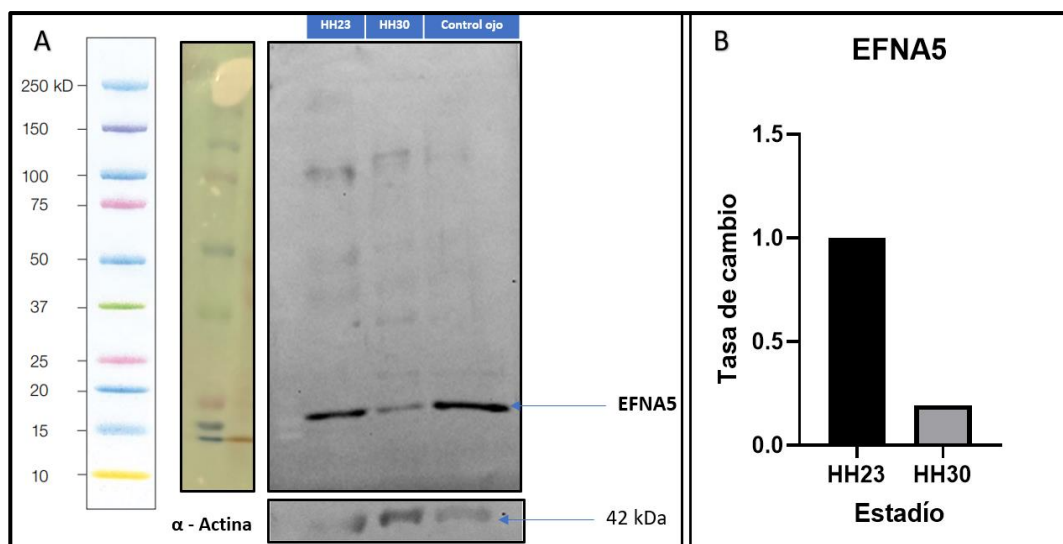


Figura 23. Western Blot para EFNA5 (A) mostrando el estándar de pesos moleculares (izda) y el resultado de Western Blot usando extracto de OSC de *G. gallus* en estadio HH23, HH30 y control positivo (ojo) y anticuerpo contra EFNA5. Se observa una banda de 20 kDa correspondiente al ligando EFNA5 (B) Cuantificación de EFNA5 respecto al bandeo de α -Actina a 42 kDa.

Para el estudio de la expresión proteica de EphA7 se realizaron ensayos de Western Blot, los resultados se presentan en la figura 24, donde se observó un total de 3 bandas a los 25 – 37; 37 – 50 y 100 kDa. Según la base de datos ncbi, EphA7 tiene un peso molecular de 110 kDa (EphA7-FL). Sin embargo, se ha caracterizado EphA7 de 67 kDa producto del posible truncamiento de EphA7 de 110 kDa (Leonard et al., 2020), además se ha descrito una isoforma de EphA7 de 48 – 58 kDa producto de una variación de empalme. De este modo, las bandas fueron denotadas como EphA7-T1 para la banda de 37-50 kDa, EphA7-T2 para

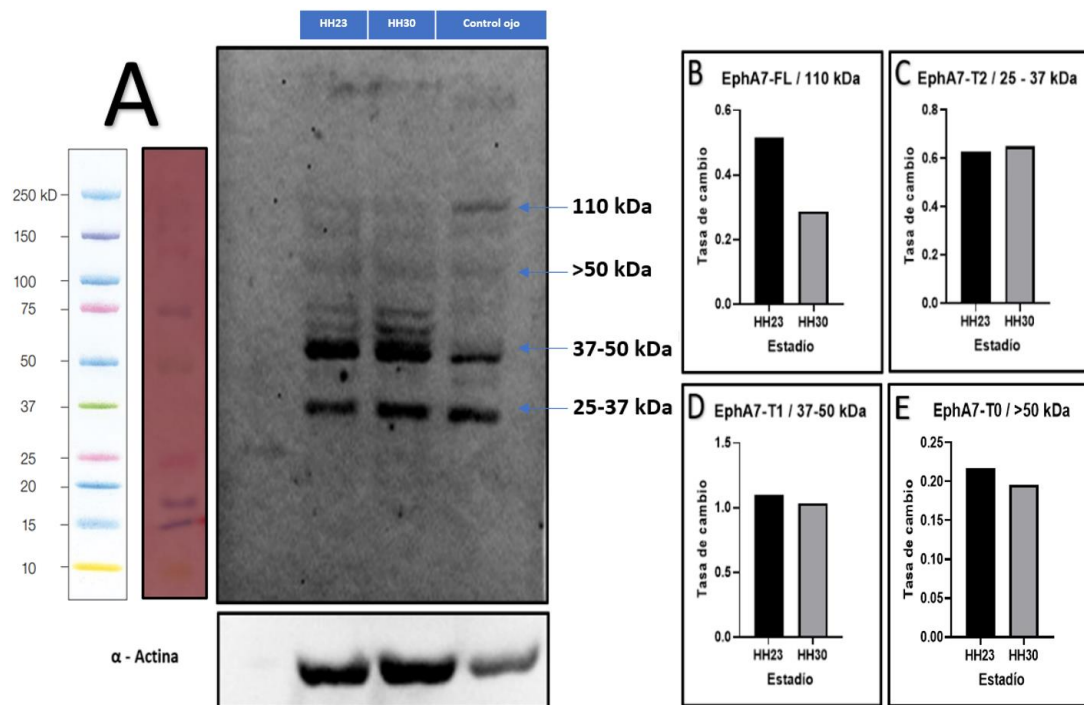


Figura 24. Western Blot para EphA7 (A) mostrando el estándar de pesos moleculares (izda) y el resultado de Western Blot usando extracto de OSC de *G. gallus* en estadio HH23, HH30 y control positivo (ojo) y anticuerpo contra EphA7. Se observan bandas a 100 kDa; 37 – 50 kDa y 25 – 37 kDa. Banda para α-Actina (42 kDa). (B) Cuantificación EphA7-FL 100 kDa (C) Cuantificación EphA7-T2 25-37 kDa (D) Cuantificación EphA7-T1 37-50 kDa. (E) Cuantificación EphA7-T0 >50kDa.

la banda de 25-37 kDa y EphA7-T0 para la banda con un peso >50 kDa. Al cuantificar la intensidad de las bandas con el software imageJ se observó que no existe una expresión diferencial entre los estadios HH23 y HH30. Se puede observar que la banda de 37-50 kDa predomina en todas las condiciones.

4.1.3. Inmunofluorescencia en corte proveniente del techo diencefálico de embriones de *G. gallus*.

Se realizaron cortes seriados de embriones fijados en Carnoy e incluidos en parafina en estadios HH23 y HH30. Los cortes fueron teñidos con Hematoxilina y Eosina (H-E) (figura 12), con el fin de localizar la zona de la CP, evidenciada por el cruce de los axones entre las dos vesículas cerebrales diencefalo y mesencefalo. Se realizó el estudio de inmunofluorescencia con el fin de conocer la ubicación de la proteína expresada. El estudio de EFNA5 utilizando anticuerpos contra la molécula seguido de anticuerpos secundarios conjugado con fluoróforo en cortes sagitales y frontales de embriones HH30 (figura 25) y HH23 (figura 26) evidenció la expresión de este ligando en la zona observándose un marcaje de color verde para la proteína. En cortes frontales de embriones en estadio HH30 se observó que EFNA5 se expresa principalmente en la zona superior del techo diencefálico (Figura 25.A) por debajo de los axones marcados con tuj1 (Figura 25.B) que cruzan el eje medial y que estarían formando la CP. También se puede observar expresión de la proteína hacia la zona apical del OSC. En los cortes sagitales se observó el patrón característico de los axones

que forman la CP teñidos con NCAM de forma circular debido al corte transversal de los mismos (Figura 25.E). La expresión de EFNA5 en cortes sagitales (Figura 25.D) se observó en la misma zona que en cortes frontales por debajo de la CP en las células superiores de la PTD, pero además se observó un gradiente de expresión hacia el mesencéfalo. Por otro lado, se observaron células que se estarían proyectando a través de la CP, que posiblemente serían neuronas en

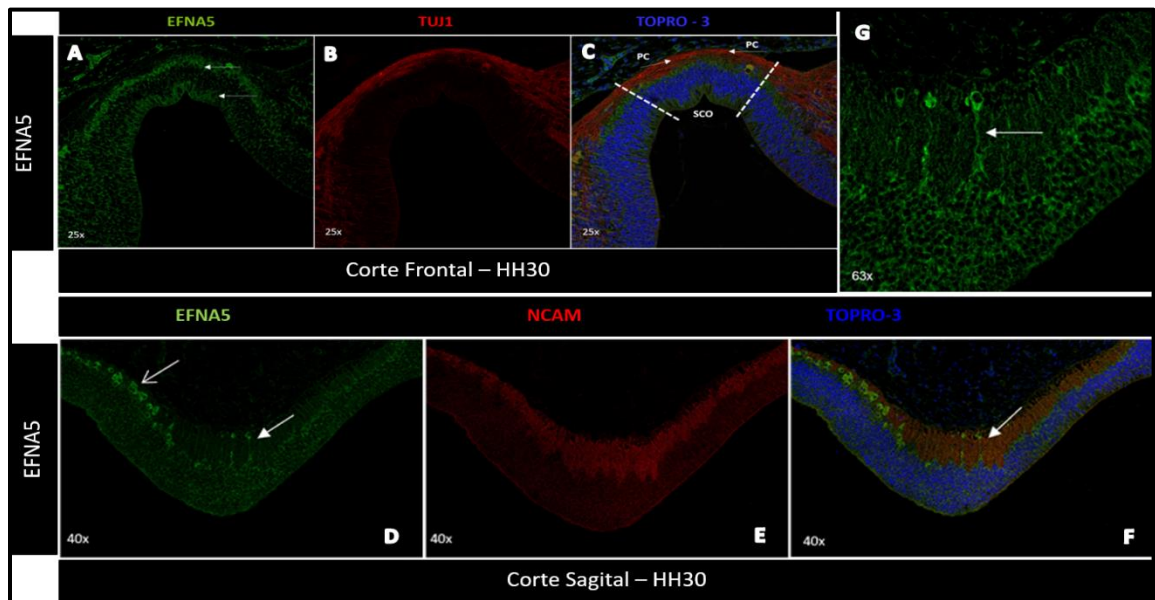


Figura 25. Imunofluorescencia en corte de embriones de *G. gallus* HH30 para estudio de expresión y localización de EFNA5 en prosómero 1. A, B y C: cortes frontales a 25X. D, E, F y G: cortes sagitales a 40X y 63X. (A) Expresión de EFNA5 (verde) en OSC. Flechas indican zonas de mayor expresión, en las prolongaciones de las células del OSC y en la región apical. (B) Expresión de tubulina BIII (Rojo, tuj) en los axones que cruzan el eje medial formando la CP (C) *Merge* de A y B más TOPRO-3 (azul) para marcaje del núcleo celular (D) Expresión de EFNA5 (verde). Flecha punta rellena indica expresión de EFNA5 en las prolongaciones de las células del OSC, las cuales atraviesan la CP. Flecha con punta sin rellenar indica la expresión de EFNA5 en células proyectadas hacia el mesencéfalo. (E) Expresión de NCAM (rojo) de proyecciones axonales que conforman la CP. (F) *Merge* de D y F más marcaje de núcleos celulares con TOPRO-3. Azul: TOPRO-3. (G) Aumento 63X de D. Flecha indica proceso celular marcado con EFNA5 que cruza la CP desde el OSC. La marca se encuentra en el cuerpo celular en contacto con la glía limitante externa. Dichos cuerpos celulares parecen migrar desde el OSC hacia la zona mesencefálica.

diferenciación y que luego migrarían hacia el mesencéfalo siendo las mismas que se marcan hacia esta zona (figura 25.G).

Respecto al estudio de la expresión y localización de EphA7, en cortes frontales HH30 se observó que esta proteína se estaría expresando con un patrón similar al observado con efrina A5, con una mayor expresión hacia región basal de las células del OSC (Figura 26.A) y por debajo de la CP (Figura 26.B). Por otro lado, se observa una menor expresión de EphA7 hacia la zona apical del OSC (Figura 26.A). En los cortes sagitales de embriones HH27, se observó marcaje positivo para EphA7 en la misma zona aproximadamente que en la observada en los cortes frontales, por debajo de la CP y en zona basal de las células conforman el OSC (Figura 26. D y E).

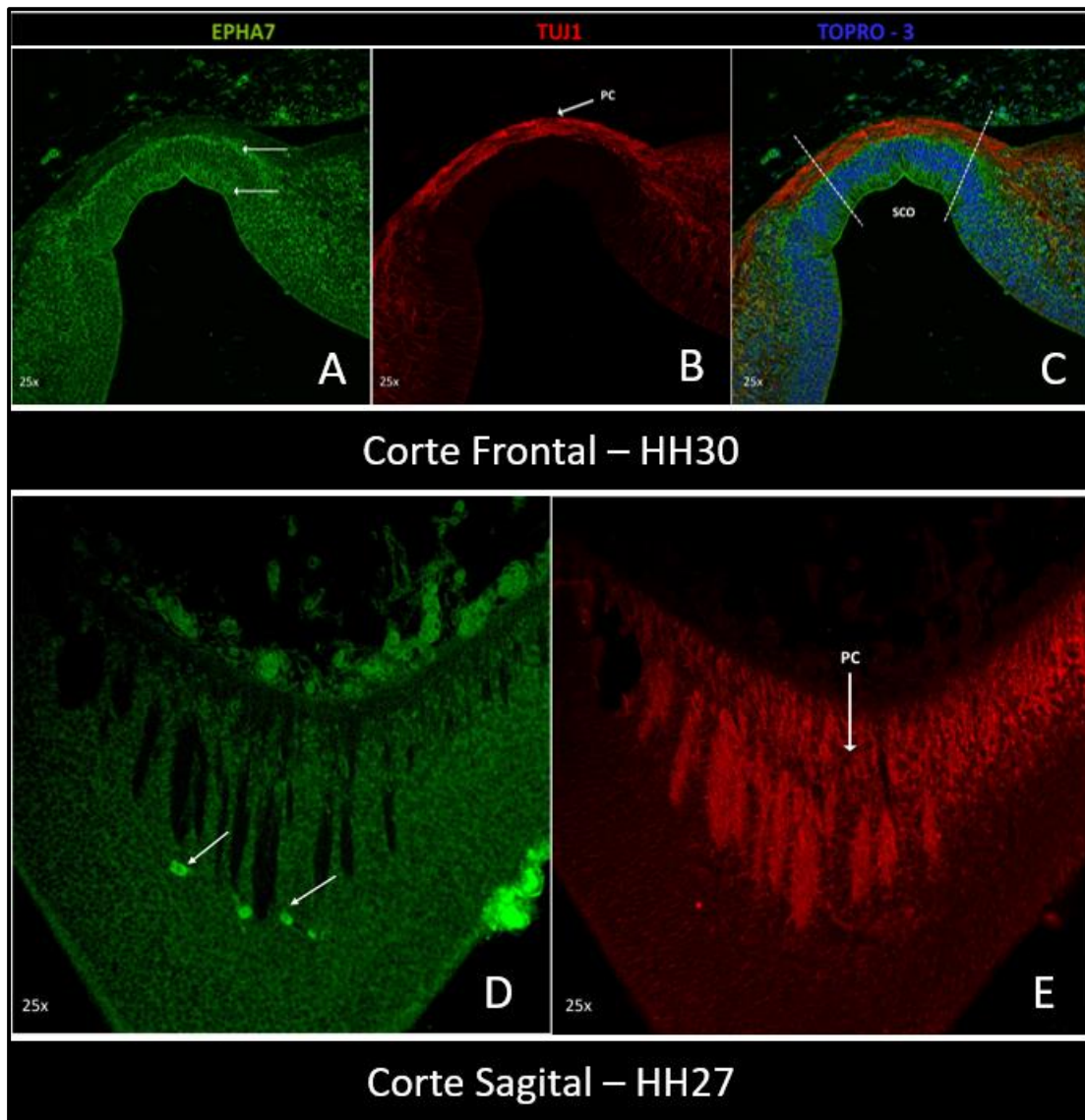


Figura 26. Inmunofluorescencia para EphA7 en cortes de prosómero 1 de embriones de *G. gallus*. A, B y C: cortes frontales HH30 a 25X. D y E: cortes sagitales HH27 a 25X. (A) Expresión de EphA7 en OSC. Flechas indican zonas de mayor expresión, en la zona superior de las células del OSC, en las células apicales. (B) Expresión de tubulina BIII en los axones que cruzan el eje medial formando la CP. Flecha indica la CP. (C) *Merge* de A y B más TOPRO-3 para marcaje del núcleo de las células. (D) Expresión de EphA7. Flechas indican expresión de EphA7 en células que se encuentran en la zona superior del OSC. (E) Expresión de tubulina BIII de proyecciones axonales que conforman la CP. La flecha indica la CP. Verde: EphA7. Rojo: Tuj1. Azul: TOPRO-3.

5. DISCUSION

Durante el desarrollo embrionario, las células neuroepiteliales están sometidas a procesos de proliferación, diferenciación y migración. En el caso de los embriones de *G. gallus* estos ocurren en estadíos tempranos, encontrando al tercer día de desarrollo axones de neuronas que comienzan a extenderse hacia su contraparte sináptica (Stanic et al., 2014). En este momento comienzan a identificarse las primeras comisuras, formadas por axones que son guiados por moléculas de guía capaces de dirigir el crecimiento axonal, y que se encontrarían distribuidas en forma de gradientes o en zonas específicas, permitiendo la combinación de información direccional y posicional para los axones en proyección (Puelles et al., 1993).

Dentro de las primeras comisuras encefálicas en formarse está la CP, ubicada en el límite dorsal entre el diencefalo-mesencéfalo y para la cual aún no se conocen con detalle las moléculas que estarían a cargo de guiar a los axones que forman dicha comisura. Los axones de la CP atraviesan la línea media a través de la placa del techo diencefálica (PTD). Evidencias obtenidas previamente por nuestro grupo de investigación (Stanic et al., 2014) indican una expresión complementaria entre OSC-espondina y los transcritos de EphA7, donde la primera se expresaría solo en la placa del techo diencefálica lateral (PTDL) y EphA7 exclusivamente en la placa del techo diencefálico medial (PTDM). Lo cual se vuelve interesante al observar que el comportamiento de los

axones en proyección también varía dependiendo de si están sobre la PTDL, donde se encuentran altamente fasciculados o si están sobre la PTDM, donde se desfasciculan algunos girando, tomando una proyección ipsilateral al eje medial (Stanic et al., 2010).

Por otro lado, EphA7 un receptor, es lógico pensar que en la zona podría estar expresándose su posible ligando o algún otro receptor que actúe como posible interactor, esto basado en la evidencia de sistemas estudiados donde se ha observado que cuando estas proteínas se expresan también lo hacen otros miembros de la familia. Esto se ha observado en sistemas tales como el retinotectal, como también durante la regeneración del nervio óptico, en el desarrollo de la inervación cutánea, en el control sensomotor y en el tronco cerebral auditivo (Symonds y cols., 2007; Yates y cols., 2014; Wijeratne y cols., 2014).

Con estos antecedentes, se propuso en primera instancia identificar y clasificar aquellas moléculas expresadas en la zona del prosómero 1 de embriones de *G. gallus* relacionadas con Eph/efrinas en estadio HH23 y HH30.

5.1. Expresión de Eph/efrinas en la PTD de embriones de *G. gallus*.

Los receptores Eph y sus ligandos efrinas, han sido identificadas formando gradientes entre la retina y el tectum óptico/ colículo superior en diversos modelos animales, siendo los impulsores de acuñar la definición de mapas topográficos

en el proceso de guía axonal (Dickson, 2002; McLaughlin et al., 2003). Sin embargo, la expresión de esta familia de proteínas ha sido descrita en otros procesos del desarrollo, como, por ejemplo, gastrulación, segmentación, fasciculación, guía axonal, crecimiento dendrítico y migración celular (Dickson et al., 2002; Cramer & Miko, 2016; Cecchini & Cornelison, 2021) los cuales además de ser expresados durante el desarrollo siguen siendo expresados durante la vida adulta, pudiendo estar implicados en otros procesos distintos al de guía axonal (Cecchini & Cornelison, 2021). Además de las funciones anteriormente descritas para el complejo receptor-ligando Eph/efrinas, se han propuesto muchas otras, entre las cuales resalta la participación de estas en la formación de comisuras. Nuestros resultados muestran que del total de transcritos expresados en la zona de la PTD lugar donde se ubica la CP, un 2% y 3% estarían relacionados con el proceso de guía axonal, en HH23 y HH30 respectivamente. Respecto a aquella población de moléculas clasificadas para la familia de Eph/efrinas se determinó por análisis bioinformático que correspondería a 11% y 8% de los conteos obtenidos (del 2 y 3% relacionado con guía axonal), para HH23 y HH30 respectivamente. El 11% de un 2% correspondería a un total de 130.792 *counts*. Para el estadio HH30 se observó que de un 3% de moléculas de guía axonal un 8% corresponderían o estarían relacionadas con la familia de Eph/efrinas. El 8% de un 3% del total de conteos corresponde a un total de 122.819 *counts*. La expresión de proteínas relacionadas con la familia de Eph/efrinas en las comisuras es algo ya descrito anteriormente, tal como en la formación de la

comisura anterior, en donde axones corticales migran hacia la línea media ventral de la placa del suelo, guiado por efrinas expresadas en la zona, donde decidirán si cruzar la línea media (Henkemeyer et al., 1996). Diversos estudios relacionados con mecanismos mediados por contacto demuestran que la pérdida de la expresión de EphA4 produce un significativo desplazamiento ventral y lateral de la zona anterior de la comisura anterior (Ho et al., 2009). Al comparar los conteos establecidos para cada molécula, logramos evidenciar que los transcritos con mayor expresión en la zona del prosómero 1 serían el ligando efrina A5 y los receptores EphA3, EphA4 y EphA7.

5.2. Expresión de EphA4 en la PTD de embriones de *G. gallus*

El análisis de los datos de secuenciación transcriptómica señalan la expresión diferencial de transcritos para EphA4 en zona del prosómero 1 siendo menor en HH23 que HH30. El análisis de expresión proteica por ensayos de Western Blot demostraron la expresión de dos isoformas de EphA4 en la zona donde se ubica la CP con dos bandas a la altura de 100-120 kDa y 37-50 kDa. Es conocido el proceso de truncamiento de las moléculas Eph donde se genera una isoforma que solo posee dominios extracelulares y que actuaría como inhibidor o atenuante de la señalización bidireccional del receptor al que se una en cis (Yamagishi et al., 2011; Bai et al., 2011; Coleman et al., 2010). Dentro de este contexto es que Gatto y colaboradores en el año 2014 estudian las isoformas

producto del clivaje de EphA4 demostrando como la isoforma EphA4 N-terminal correspondiente a la isoforma soluble se une a EphA4 de tamaño completo o EphA4-FL regulando sus niveles de expresión y consigo la proyección del axón motor espinal (Gatto et al., 2014). Por otro lado, Zhao y colaboradores en el año 2017 corroboran esta información identificando las isoformas de EphA4 y demostrando su expresión en ratones SOD1, isoformas que corresponderían a la isoformas EphA4-C y EphA4-N, donde la primera tendría una función principalmente de atenuación por la posible inhibición de la fosforilación del dominio tirosina quinasa, esto debido a que corresponde a la isoforma adherida a la membrana celular, y por otro lado, la segunda participaría en la regulación de la señalización bidireccional uniéndose a heterodímeros de Eph (Zhao J. et al., 2017).

Nuestro estudio demostró solo la expresión de las isoformas EphA4-FL y EphA4-C esto debido a la zona de la proteína contra la que estaba dirigida el anticuerpo utilizado (la zona c-terminal). La primera isoforma de 100-120 kDa se expresa mayoritariamente en estadios HH30, en cambio la isoforma de 37-50 kDa se expresa de manera indiferenciada, es decir, se observa un nivel de expresión similar en HH23 y HH30. Es interesante lo observado respecto a la expresión de estas isoformas donde se observa que en estadios tempranos se expresan principalmente las isoformas truncadas de la proteína en cambio en HH30 se observa que la expresión de EphA4 se debe a la expresión de EphA4-FL principalmente.

5.3. Expresión de EFNA5 y EphA7 en la placa de techo diencefálico de embriones de *G. gallus*.

Los estudios de ARNseq mostraron la expresión de transcritos de EFNA5 en la zona del prosómero 1 observándose el doble de expresión en estadíos HH23 comparados con HH30, lo cual fue validado por RT-qPCR. El análisis de expresión proteico mediante Western Blot dejó en evidencia la expresión de una proteína de 20 kDa aproximadamente que corresponderían al ligando EFNA5. La cuantificación de las bandas obtenidas mostró una marcada diferencia de expresión diferencial en la proteína, expresándose el triple en HH23 de lo que se expresa en HH30. Estos resultados se condicen con los vistos en la cuantificación de transcritos para EFNA5 estudiados en la zona. Los resultados de la inmunofluorescencia para este ligando en cortes de la zona estudiada muestran un patrón de expresión positivo en las células basales que conforman la PTD u OSC y, por otro lado, existe una expresión hacia las células de la zona apical. Se observa un patrón de expresión hacia la zona del mesencéfalo. Una observación con mayor aumento dejó en evidencia la expresión de EFNA5 en células en posible diferenciación que estarían cruzando la CP, y que muy probablemente, serían las mismas células que estarían migrando hacia el mesencéfalo.

Es conocida la relación entre EFNA5 como ligando de EphA7, receptor nombrado anteriormente y estudiado por nuestro grupo (Depaepe et al. 2005; Miller et al. 2006; Lee et al. 2013). La interacción de estos resulta en la fosforilación de la

tirosina presente en el dominio quinasa, resultando generalmente en la repulsión del cono axónico, así como también de las células en migración (Holmberg et al., 2000). Aunque el efecto principalmente ha sido descrito como repulsivo, existe evidencia que indica que también podría promover la adhesión celular, permitiendo que axones en crecimiento logren avanzar por lugares que generalmente generarían repulsión (Rashid et al., 2005; Lim et al., 2008; Chai et al., 2014; Tai & Kromer, 2014). Otros estudios, podrían dar explicación a este fenómeno, como los de Holmberg y colaboradores en el año 2000, donde describen una isoforma de EphA7 truncada, denominada EphA7-T1, la cual al interaccionar con EphA7 inhibe la fosforilación de la tirosina quinasa de la EphA7-FL resultando en una respuesta de adhesión al interaccionar con EFNA5 (Holmberg et al., 2000). En el año 2020, se describen dos isoformas EphA7-FL y EphA7-T1, donde la primera correspondería a la proteína de tamaño completo de 112 kDa y la segunda correspondería a la isoforma producto del truncamiento de la primera con un peso de 67 kDa. Se demostró que la interacción de ambas en ensayos de cultivo celular resultaría en la inhibición de la fosforilación de EphA7-FL modulando así la respuesta repulsiva del crecimiento dendrítico y la adhesión celular de las neuronas de la corteza cerebral (Holmberg et al., 2000; Leonard et al., 2020). Por otro lado, en el año 2015 Lee y colaboradores (Lee et al., 2015) describen una isoforma entre 49 – 59 kDa correspondiente a una variante de empalme, basados en el trabajo de Oricchio y colaboradores en el año 2011 (Oricchio et al., 2011).

Nuestros resultados muestran la expresión de ARNm de EphA7 en la zona estudiada por ARNseq. La cuantificación transcriptómica por secuenciación evidenció la expresión no diferencial para EphA7 entre estadios HH23 y HH30. Lo cual se condice con los resultados observados en el ensayo de Western-Blot para la expresión proteica, donde se observó la expresión de EphA7-FL y EphA7-T1, con una notoria mayor expresión de la isoforma truncada por sobre la isoforma de tamaño completo. Esta isoforma podría estar regulando la repulsión axónica en respuesta a la interacción de EphA7 y EFNA5 existente en la zona de la PTD.

Los resultados para la inmunofluorescencia mostraron que EphA7 se estaría expresando con el mismo patrón de EFNA5 en cortes frontales de embriones HH30 con una mayor expresión hacia las células basales de la PTD por debajo de la CP. Por otro lado, no se logra ver el patrón descrito por Stanic y colaboradores en 2014, con una expresión exclusiva para EphA7 en la PTDM (Stanic et al.,2014), esto podría ser debido a que el corte no hay sido completamente recto, otorgando alguna inclinación en el grado de corte, observando el patrón horizontal de los resultados, sin olvidar, que la inmunofluorescencia en corte nos restringe a un solo plano de estudio lo cual es una limitante en el estudio de mapas topográficos. Los cortes longitudinales de embriones HH27 muestran cuerpos celulares positivos para EphA7 por debajo de la CP. La colocalización de receptor y ligando estaría indicando una posible interacción en cis o trans entre las células de la zona que expresan la proteína.

Lo cual permitiría la migración de aquellas células en diferenciación marcadas con EFNA5. Otra zona cuyo correcto desarrollo está relacionado con la correcta expresión de EphA7 y EFNA5 como interactores es la corteza cerebral, en donde ambas proteínas por respuestas de tipo repulsiva delimitarían la zona (Iguchi et al., 2020).

Por otro lado, existe evidencia que relaciona la interacción entre EphA7 y EFNA5 directa o indirectamente con la regulación de la proliferación celular (Conover et al., 2000; Holmberg et al., 2005), mostrando que en progenitores corticales promueve la apoptosis resultando en la disminución en el tamaño de la corteza (Depaepe et al., 2005). Con estos antecedentes se sugiere que EphA7 y EFNA5 presentes en la PTD serían cruciales en el equilibrio entre la proliferación celular y la apoptosis necesaria para la correcta formación del prosómero 1.

Se propone que ambas proteínas están cumpliendo un papel de migración y adhesión celular en la zona, permitiendo la diferenciación y la migración de las células que se forman en la PTDM hacia el mesencéfalo. Por otro lado, los axones proyectados desde los núcleos de la placa alar en HH30 se encontrarían con estas proteínas expresando posiblemente EphA3 u otro receptor Eph en su membrana, condicionando así la guía del axón. Por este motivo al inhibir alguna de estas moléculas el resultado abarcará mucho más que solo la malformación de la CP, observando un efecto negativo en la totalidad de la estructura, confirmando el rol morfogénico de la proteína (Stanic et al., 2014).

5.4. Mapas topográficos de Eph/efrinas tipo A en embriones de *G. gallus*.

Nuestros resultados de inmunofluorescencia en corte dejan en evidencia un patrón de expresión para las moléculas de efrinas en estudio. Dentro de este contexto surge la pregunta de si lo que hemos observado realmente corresponde a la localización correcta de las proteínas o si solo estamos observando la expresión de estas en un solo plano sin observar en su totalidad el mapa topográfico en que se estarían expresando, pasando por alto otros planos de corte en el cual podríamos ver un cambio en la expresión, e incluso la probabilidad de que el corte haya sido realizado con algún grado de inclinación observando varios planos a la vez.

Existe evidencia que las efrinas y receptores Eph están involucradas en la formación de mapas topográficos en distintas regiones del encéfalo, tales como las observadas en las proyecciones hipocampo-septal, talamocortical, retinotectal y olfativa. En todos estos casos se requiere de la expresión complementaria, en forma de gradiente, de efrinas y Eph en las regiones de origen y diana de la proyección (Martinez & Soriano, 2005). Hansen y colaboradores en el año 2004 propusieron un modelo de acción de las Eph/efrinas en la formación del mapa topográfico retino-colicular, en donde Efrina A expresada en el colículo según un gradiente creciente anterior-posterior, actúa sobre axones retinales de forma antagónica dependiendo de su concentración: niveles bajos estimulan el crecimiento axonal, mientras que niveles altos lo inhiben. Además, la expresión

gradual decreciente de Eph a lo largo del eje nasal-temporal produciría la respuesta gradual de los axones retinales (Hansen et al., 2004). Dejando así en manifiesto la importancia de la expresión en gradiente de estas moléculas en proyección axónica y en la formación de nuevas conexiones.

El estudio de mapas topográficos es realizado mediante ensayos de inmunohistoquímica en bloque ya que como se ha mencionado, la inmunohistoquímica en corte histológico nos restringe al estudio de un solo plano de corte, en cambio al observar el embrión en su totalidad podemos tener un mejor acercamiento de como estas proteínas estarían dispuestas en el espacio sin tener que extrapolar desde la visualización de un solo plano.

5.5. Otras moléculas relevantes expresadas en la zona estudiada.

Con los estudios de nivel de expresión de los transcritos anotados por ARNseq se logró determinar la expresión diferencial existente al comparar ambos estadíos de cada una de las moléculas relacionadas con la actividad de las Eph/efrinas. Se determinaron dos grupos de moléculas tanto receptores como ligandos, correspondientes a los tipos A y B de la familia. Los resultados mostraron que uno de los transcritos mayores expresados pertenecientes a la familia de Eph/efrinas corresponde a EphB2, un receptor de efrina perteneciente a la tipificación B de estas proteínas. Respecto a los ligandos vemos que Efrina B1 se expresa por sobre Efrina B2 en ambos estadíos. Esto es interesante ya que

existe evidencia de que este receptor y ligando estarían relacionados entre sí en el establecimiento de las proyecciones cruzadas en el sistema nervioso central (Cramer & Miko, 2016). Se ha descrito que Efrina B1 actuaría como ligando de EphA4 y, por otro lado, EphB2 podría unir Efrina A5 en el correcto desarrollo del sistema nervioso (Gale et al., 1996; Himanen et al., 2004; Qin et al., 2010; Himanen, J. 2012).

En pollos, la rama contralateral de los axones del núcleo magnocelular (NM) en desarrollo alcanza y cruza la línea media alrededor de HH23. Casi al mismo tiempo, la efrina-B2 se expresa en los axones en crecimiento, mientras que EphB2 y EphB5 se expresan a un nivel bajo en las células de la línea media. Después de que los axones de NM han crecido a través de la línea media, la expresión de ambas moléculas de Eph comienza a aumentar y se extiende desde la línea media ventral hacia la línea media dorsal. La sobreexpresión de EphB2 o la expresión de EphB2 inactiva las quinasas en las células de la línea media cambiando el curso de los axones NM, con muchos axones desviados desde la línea media. Esto permite que los axones crezcan antes de cruzar cuando EphB2 se expresa a un nivel bajo, mientras que un aumento posterior en los niveles de EphB2 genera una señal repulsiva para evitar que los axones retrocedan después de haber cruzado la línea media (Krasewicz & Wei-Ming, 2022).

Se conocen los roles de los dominios estructurales de Eph y efrina y la identidad de sus intermediarios de señalización, pero lo que aún no está claro es la

naturaleza de las interacciones de orden superior, por ejemplo, aquellas entre grupos de Ephs y efrinas expresadas en las mismas neuronas o en neuronas separadas (Klein & Kania, 2014) e incluso su comunicación cruzada con receptores tirosina quinasa de otras familias como es el caso de los receptores FGF (Cecchini & Cornelison, 2021). Existe evidencia que relaciona la actividad de FGFR con la de Eph mediante la interacción con el sustrato de FGFR 2 α (FRS2 α) mediador necesario en la activación de la señalización de FGFR (Latko et al., 2019). La síntesis de tetrámeros formados por EphA4, FGFR y FRS2 α activado por ligandos estaría relacionada con la renovación y diferenciación de progenitores neurales en embriones de ratones (Sawada et al., 2015). De esta manera, las Eph/efrinas ya no solo estarían vinculadas con los procesos de neurogénesis o diferenciación neuronal atribuidos a la actividad en respuesta a la interacción receptor ligando, sino que también estaría involucrándose en vías de señalización de factores de crecimiento tal como se ha observado con FGFR. El presente trabajo hace un aporte en entender cómo se desarrolla el prosómero 1, aportando posibles mecanismos en la guía de los axones de la comisura posterior y abre interrogantes tales como que otras moléculas de guía axonal están involucradas en este proceso.

6. CONCLUSIONES

- Tanto efrina A5 como EphA4 y EphA7 se encuentran expresadas en el prosómero 1
- Efrina A5 se encuentra expresada en HH30 hacia la región basal de las células del OSC por debajo de CP y en el dominio apical del OSC similar a EphA7.
- Efrina A5 se encuentra expresada en células que cruzan la CP y migran hacia el mesencéfalo sugiriendo un posible rol en procesos de diferenciación y migración celular.
- Al no poder observar la expresión de efrina A5 y/o EphA7 en la totalidad del área, y sabiendo que la expresión de las efrinas forma verdaderos mapas topográficos se hace necesario la realización de ensayos de inmunohistoquímica en bloque.
- La alta expresión de moléculas de efrinas de tipo B y la evidencia disponible hace necesario el estudio de estas moléculas y su posible interacción con las Eph/efrinas de tipo A.

7. BIBLIOGRAFIA

1. Alkan, C., S. Sajjadian, and E.E. Eichler. (2011). Limitations of next-generation genome sequence assembly. *Nat Methods*. 8(1): p. 61-5.
2. Bak M., Fraser SE. (2003) Axon fasciculation and differences in midline kinetics between pioneer and follower axons within commissural fascicles. *Development* 130:4999-5008
3. Bai, G., Chivatakarn, O., Bonanomi, D., Lettieri, K., Franco, L., Xia, C., Stein, E., Ma, L., Lewcock, J. W., & Pfaff, S. L. (2011). Presenilin-dependent receptor processing is required for axon guidance. *Cell*, 144(1), 106–118. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.11.053>
4. Bonanomi D., Chivatakarn O., Bai G., Abdesslem H., Lettieri K., Marquardt T., Pierchala BA., y Pfaff SL. (2012) Ret is a multifunctional coreceptor that integrates diffusible- and contact-axon guidance signals. *Cell* 148, 568-582
5. Bustin, S. A., Mueller, R., & Nolan, T. (2020). Parameters for Successful PCR Primer Design. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), 2065, 5–22. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9833-3_2
6. Cecchini, A., & Cornelison, D. D. W. (2022). Eph/Ephrin-Based Protein Complexes: The Importance of cis Interactions in Guiding Cellular Processes. *Frontiers in molecular biosciences*, 8, 809364. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.809364>
7. Caprile T., Osorio G., Henriquez JP., and Montecinos H. (2009) Polarized Expression of Integrin beta 1 in Diencephalic Roof Plate During Chick Development, a Possible Receptor for SCO-spondin. *Developmental Dynamics* 238, 2494-2504
8. Chai, G., Zhou, L., Manto, M., Helmbacher, F., Clotman, F., Goffinet, A. M., & Tissir, F. (2014). Celsr3 is required in motor neurons to steer their axons

- in the hindlimb. *Nature neuroscience*, 17(9), 1171–1179. <https://doi.org/10.1038/nn.3784>
9. Coleman, H. A., Labrador, J. P., Chance, R. K., & Bashaw, G. J. (2010). The Adam family metalloprotease Kuzbanian regulates the cleavage of the roundabout receptor to control axon repulsion at the midline. *Development* (Cambridge, England), 137(14), 2417–2426. <https://doi.org/10.1242/dev.047993>
 10. Conover, J. C., Doetsch, F., Garcia-Verdugo, J. M., Gale, N. W., Yancopoulos, G. D., & Alvarez-Buylla, A. (2000). Disruption of Eph/ephrin signaling affects migration and proliferation in the adult subventricular zone. *Nature neuroscience*, 3(11), 1091–1097. <https://doi.org/10.1038/80606>
 11. Cramer, K. S., & Miko, I. J. (2016). Eph-ephrin signaling in nervous system development. *F1000Research*, 5, F1000 Faculty Rev-413.
 12. Dent E., Gupton S., Gertler B. (2011) The growth cone cytoskeleton in axon outgrowth and guidance. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 3: a001800
 13. Depaepe, V., Suarez-Gonzalez, N., Dufour, A., Passante, L., Gorski, J. A., Jones, K. R., Ledent, C., & Vanderhaeghen, P. (2005). Ephrin signalling controls brain size by regulating apoptosis of neural progenitors. *Nature*, 435(7046), 1244–1250. <https://doi.org/10.1038/nature03651>
 14. Dickson, B.J. (2002). Molecular mechanisms of axon guidance. *Science* 298, 1959-1964.
 15. Evans T., Bashaw G. (2010) Axon guidance at the midline: of mice and flies. *Current Opinion in Neurobiology* 20:79-85
 16. Gale, N. W., Holland, S. J., Valenzuela, D. M., Flenniken, A., Pan, L., Ryan, T. E., Henkemeyer, M., Strebhardt, K., Hirai, H., Wilkinson, D. G., Pawson, T., Davis, S., & Yancopoulos, G. D. (1996). Eph receptors and ligands comprise two major specificity subclasses and are reciprocally

- compartmentalized during embryogenesis. *Neuron*, 17(1), 9–19.
[https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(00\)80276-7](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(00)80276-7)
17. Gatto, Graziana; Morales, Daniel; Kania, Artur; Klein, Rüdiger (2014). EphA4 Receptor Shedding Regulates Spinal Motor Axon Guidance. *Current Biology*, 24(20), 2355–2365. doi: 10.1016/j.cub.2014.08.028
 18. Goodman CS. (1996) Mechanisms and molecules that control growth cone guidance. *Annual Review of Neuroscience* 19:341-377
 19. Hansen, M., Dallal G., Flanagan J. (2004) Retinal axon response to ephrin-*as* shows a graded, concentration-dependent transition from growth promotion to inhibition. *Neuron*, 42, 717-30.
 20. Himanen, Juha-Pekka; Chumley, Michael J; Lackmann, Martin; Li, Chen; Barton, William A; Jeffrey, Phillip D; Vearing, Christopher; Geleick, Detlef; Feldheim, David A; Boyd, Andrew W; Henkemeyer, Mark; Nikolov, Dimitar B (2004). Repelling class discrimination: ephrin-A5 binds to and activates EphB2 receptor signaling. *Nature Neuroscience*, 7(5), 501–509.
 21. Himanen J. P. (2012). Ectodomain structures of Eph receptors. *Seminars in cell & developmental biology*, 23(1), 35–42.
<https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2011.10.025>
 22. Hirai H, Maru Y, Hagiwara K, Nishida J, Takaku F. A novel putative tyrosine kinase receptor encoded by the eph gene. *Science*. 1987; 238:1717–1720.
 23. Holmberg J., Clarke L., Frisén J. (2000) Regulation of repulsion versus adhesion by different splice forms of an Eph receptor. *Nature* 408:203-206.
 24. Holmberg, J., Armulik, A., Senti, K. A., Edoff, K., Spalding, K., Momma, S., Cassidy, R., Flanagan, J. G., & Frisén, J. (2005). Ephrin-A2 reverse signaling negatively regulates neural progenitor proliferation and neurogenesis. *Genes & development*, 19(4), 462–471.
<https://doi.org/10.1101/gad.326905>
 25. Hong, K., Hinck, L., Nishiyama, M., Poo, M. M., Tessier-Lavigne, M., & Stein, E. (1999). A ligand-gated association between cytoplasmic domains

- of UNC5 and DCC family receptors converts netrin-induced growth cone attraction to repulsion. *Cell*, 97(7), 927–941. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80804-1](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80804-1)
26. Ho, S. K., Kovacević, N., Henkelman, R. M., Boyd, A., Pawson, T., & Henderson, J. T. (2009). EphB2 and EphA4 receptors regulate formation of the principal inter-hemispheric tracts of the mammalian forebrain. *Neuroscience*, 160(4), 784–795. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2009.03.013>
 27. Iguchi, T., Oka, Y., Yasumura, M., Omi, M., Kuroda, K., Yagi, H., Xie, M. J., Taniguchi, M., Bastmeyer, M., & Sato, M. (2021). Mutually Repulsive EphA7-EfnA5 Organize Region-to-Region Corticopontine Projection by Inhibiting Collateral Extension. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 41(22), 4795–4808. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0367-20.2021>
 28. Jiao, W. B., Accinelli, G. G., Hartwig, B., Kiefer, C., Baker, D., Severing, E., Willing, E. M., Piednoel, M., Woetzel, S., Madrid-Herrero, E., Huettel, B., Hümann, U., Reinhard, R., Koch, M. A., Swan, D., Clavijo, B., Coupland, G., & Schneeberger, K. (2017). Improving and correcting the contiguity of long-read genome assemblies of three plant species using optical mapping and chromosome conformation capture data. *Genome research*, 27(5), 778–786.
 29. Kennedy TE., Serafini T., Delatorre JR., Tessier-lavigne M. (1994) Netrins Are Diffusible Chemotropic Factors for Commissural Axons in the Embryonic Spinal-Cord. *Cell* 78, 425-435
 30. Kim, S. W., & Kim, K. T. (2020). Expression of Genes Involved in Axon Guidance: How Much Have We Learned? *International journal of molecular sciences*, 21(10), 3566.
 31. Klein, R. (2004). Eph/ephrin signaling in morphogenesis, neural development and plasticity. *Current Opinion in Cell Biology* 16, 580-589.

32. Klein, R., Kania, A. (2014) Ephrin signalling in the developing nervous system, *Curr. Opin. Neurobiol.* 27 16–24
33. Knöll, B., Weinl, C., Nordheim, A. et al. Stripe assay to examine axonal guidance and cell migration. *Nat Protoc* 2, 1216–1224 (2007). <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.157>
34. Krasewicz, J, Yu, W-M. (2022) Eph and ephrin signaling in the development of the central auditory system. *Developmental Dynamics*. 1-17. doi:10.1002/dvdy.506
35. Kullander, K. and Klein, R. (2002). Mechanisms and functions of Eph and ephrin signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3, 475-486
36. Latko, M., Czyrek, A., Porębska, N., Kucińska, M., Otlewski, J., Zakrzewska, M., & Opaliński, Ł. (2019). Cross-Talk between Fibroblast Growth Factor Receptors and Other Cell Surface Proteins. *Cells*, 8(5), 455. <https://doi.org/10.3390/cells8050455>
- Lee, H., Park, E., Kim, Y., & Park, S. (2013). EphrinA5-EphA7 complex induces apoptotic cell death via TNFR1. *Molecules and cells*, 35(5), 450–455. <https://doi.org/10.1007/s10059-013-0072-3>
37. Lee, H., Park, E., Kim, Y., & Park, S. (2013). EphrinA5-EphA7 complex induces apoptotic cell death via TNFR1. *Molecules and cells*, 35(5), 450–455. <https://doi.org/10.1007/s10059-013-0072-3>
38. Lee, J., Nakajima-Koyama, M., Sone, M., Koga, M., Ebisuya, M., Yamamoto, T., & Nishida, E. (2015). Secreted Ephrin Receptor A7 Promotes Somatic Cell Reprogramming by Inducing ERK Activity Reduction. *Stem cell reports*, 5(4), 480–489. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2015.09.001>
39. Leonard, C. E., Baydyuk, M., Stepler, M. A., Burton, D. A., & Donoghue, M. J. (2020). EphA7 isoforms differentially regulate cortical dendrite development. *PloS one*, 15(12), e0231561. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0231561>

40. Lim, Y. S., McLaughlin, T., Sung, T. C., Santiago, A., Lee, K. F., & O'Leary, D. D. (2008). p75(NTR) mediates ephrin-A reverse signaling required for axon repulsion and mapping. *Neuron*, 59(5), 746–758. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.07.032>
41. Lowery LA., Van Vactor D. (2009) The trip of the trip: Understanding the growth cone machinery, *Natural Review Molecular Cell Biology* 10(5): 332-343.
42. Martinez, A., Soriano, E. (2005) Functions of ephrin/Eph interactions in the development of the nervous system: emphasis on the hippocampal system. *Brain Res Rev*, 49, 211,26.
43. McCormick, L. E., & Gupton, S. L. (2020). Mechanistic advances in axon pathfinding. *Current opinion in cell biology*, 63, 11–19.
44. McLaughlin, T., Hindges, R., & O'Leary, D. D. (2003). Regulation of axial patterning of the retina and its topographic mapping in the brain. *Current opinion in neurobiology*, 13(1), 57–69. [https://doi.org/10.1016/s0959-4388\(03\)00014-x](https://doi.org/10.1016/s0959-4388(03)00014-x)
45. Mellott, D. O., & Burke, R. D. (2008). The molecular phylogeny of eph receptors and ephrin ligands. *BMC cell biology*, 9, 27. <https://doi.org/10.1186/1471-2121-9-27>
46. Miller, K., Kolk, S. M., & Donoghue, M. J. (2006). EphA7-ephrin-A5 signaling in mouse somatosensory cortex: developmental restriction of molecular domains and postnatal maintenance of functional compartments. *The Journal of comparative neurology*, 496(5), 627–642. <https://doi.org/10.1002/cne.20926>
47. Mutalik, S. P., & Gupton, S. L. (2021). Glycosylation in Axonal Guidance. *International journal of molecular sciences*, 22(10), 5143.
48. Oricchio, E., Nanjangud, G., Wolfe, A. L., Schatz, J. H., Mavrakis, K. J., Jiang, M., Liu, X., Bruno, J., Heguy, A., Olshen, A. B., Socci, N. D., Teruya-Feldstein, J., Weis-Garcia, F., Tam, W., Shakhovich, R., Melnick, A.,

- Himanen, J. P., Chaganti, R. S., & Wendel, H. G. (2011). The Eph-receptor A7 is a soluble tumor suppressor for follicular lymphoma. *Cell*, 147(3), 554–564. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.09.035>
49. Ortalli, A.L., Fiore, L., Di Napoli, J., Rapacioli, M., Salierno, M., Etchenique, R., Flores, V., Scicolone, G. (2012). EphA3 expressed in the chicken tectum stimulates Nasal retinal ganglion cell axon growth and is required for retinotectal topographic map formation. *PLoS ONE*, 7(6).
 50. Pignata, A., Ducuing, H., & Castellani, V. (2016). Commissural axon navigation: Control of midline crossing in the vertebrate spinal cord by the semaphorin 3B signaling. *Cell adhesion & migration*, 10(6), 604–617.
 51. Poopalasundaram S., Marler K. J., Drescher U. (2011) EphrinA6 on chick retinal axons is a key component for p75(NTR)-dependent axon repulsion and TrkB-dependent axon branching. *Mol. Cell Neurosci.* 47 131–136
 52. Puelles L., Rubenstein JL. (1993) Expression patterns of homeobox and other putative regulatory genes in the embryonic mouse suggest a neuromeric organization. *Trends in Neuroscience* 16:472-479
 53. Rashid, T., Upton, A. L., Blentic, A., Ciossek, T., Knöll, B., Thompson, I. D., & Drescher, U. (2005). Opposing gradients of ephrin-As and EphA7 in the superior colliculus are essential for topographic mapping in the mammalian visual system. *Neuron*, 47(1), 57–69. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2005.05.030>
 54. Rodriguez E., Oksche A., HeinS., and Yulis C. (1992) Cell Biology of the Subcommissural Organ. *International Review of Cytology-A Survey of Cell Biology* 135, 39-121
 55. Rubio, S; Pacheco-Orozco, Rafael A; Gómez, A; Perdomo, S; García-Robles, R. (2020). Secuenciación de nueva generación (NGS) de ADN: presente y futuro en la práctica clínica. *Universitas Médica*, 61(2), –. [doi:10.11144/Javeriana.umed61-2.sngs](https://doi.org/10.11144/Javeriana.umed61-2.sngs)

56. Saldivia, N.E. (2015) "EXPRESIÓN DE EFRINA-A2 EN ESTADIOS TEMPRANOS DEL DESARROLLO DE LA COMISURA POSTERIOR". Universidad de Concepción, Facultad de Ciencias Biológicas. Recuperado de http://repositorio.udec.cl/jspui/bitstream/11594/2479/3/Tesis_Estudio_de_la_formacion_de_la_comisura.pdf
57. Short, C. A., Suarez-Zayas, E. A., and Gomez T. M. (2016) Cell adhesion and invasion mechanisms that guide developing axons. *Curr. Opin. Neurobiol.* 39, 77-85.
58. Stanic, K. N. (2016) "Estudio de la formación de la comisura posterior durante el desarrollo embrionario en *Gallus gallus*". Universidad de Concepción, Facultad de Ciencias Biológicas. Recuperado de <http://repositorio.udec.cl.ezpbibliotecas.udec.cl/jspui/handle/11594/2479>
59. Stanic, K., Saldivia, N., Förstera, B., Torrejón, M., Montecinos, H., & Caprile, T. (2016). Expression Patterns of Extracellular Matrix Proteins during Posterior Commissure Development. *Frontiers in Neuroanatomy*.
60. Stanic K., Vera A., González M., Recabal A., Astuya A., Torrejón M., Montecinos H., Caprile T. (2014) Complementary expression of EphA7 and SCO-spondin during posterior commissure development. *Frontiers in neuroanatomy* 8:49
61. Stanic, K., Montecinos, H., & Caprile, T. (2010). Subdivisions of chick diencephalic roof plate: Implication in the formation of the posterior commissure. *239(10)*, 2584–2593.
62. Sterba G., Kiessig C., Naumann W., Petter H., Kleim I. (1982) The secretion of the subcommissural organ a comparative immunocytochemical investigation. *Cell And Tissue Research*. 226:427-39
63. Stoeckli, Esther T. (2018). Understanding axon guidance: are we nearly there yet? *Development*, 145(10).

64. Symonds AC., King CE., Bartlett CA., Sauvé Y., Lund RD., Beazley LD., Dunlop SA, Rodger J. (2007) EphA5 and ephrin-A2 expression during optic nerve regeneration: a 'two-edged sword'. *European Journal of Neuroscience*. 25:744–752
65. Tai, A. X., & Kromer, L. F. (2014). Corticofugal projections from medial primary somatosensory cortex avoid EphA7-expressing neurons in striatum and thalamus. *Neuroscience*, 274, 409–418. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2014.05.039>
66. Tamay de Dios, L., Ibarra, C., & Velasquillo, C. (2013). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigación en discapacidad*, 2(2), 70-78.
67. Tessier-Lavigne M., Goodman CS. (1996) The molecular biology of axon guidance. *Science* 274:1123-1133
68. 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, 80. <https://doi.org/10.3389/fncel.2013.00080>
69. Wan, Y., Yang, J. S., Xu, L. C., Huang, X. J., Wang, W., & Xie, M. J. (2018). Roles of Eph/ephrin bidirectional signaling during injury and recovery of the central nervous system. *Neural regeneration research*, 13(8), 1313–1321. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.235217> (Retraction published *Neural Regen Res*. 2018 Dec;13(12):2140)
70. Wijeratne D., Rodger J., Wallace H., Maghami S., Sykes M., Wood F., Fear M. (2015). Ephrin-A2 and Ephrin-A5 are important for the functional development of cutaneous innervation in a mouse model. *Journal of Investigative Dermatology* 35:632-635.
71. Xu, N.J., Henkemeyer, M. (2012). Ephrin reverse signaling in axon guidance and synaptogenesis. *Semin. Cell Dev. Biol.* 23 (1), 58–64.

72. Yates NJ., Martin-Iverson MT., Rodger J. (2014) The role of ephrin-A2 and ephrin-A5 in sensorimotor control and gating. *Behavioural Brain Research* 275: 225–233
73. Yamagishi, S., Hampel, F., Hata, K., Del Toro, D., Schwark, M., Kvachnina, E., Bastmeyer, M., Yamashita, T., Tarabykin, V., Klein, R., & Egea, J. (2011). FLRT2 and FLRT3 act as repulsive guidance cues for Unc5-positive neurons. *The EMBO journal*, 30(14), 2920–2933. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.189>
74. Zhao, Jing; Boyd, Andrew W.; Bartlett, Perry F. (2017). The identification of a novel isoform of EphA4 and ITS expression in SOD1 G93A mice. *Neuroscience*, 347(), 11–21. doi: 10.1016/j.neuroscience.2017.01.038
75. Zhou R. (1998) The Eph Family receptors and ligands. *Pharmacol Ther.* 77(3):151-181