



Universidad de Concepción  
Facultad de Ciencias Biológicas  
Magister en Bioquímica y Bioinformática

# **Caracterización de la expresión de la familia de FGFs y FGFRs en la placa del techo diencefálica durante estadios embrionarios tempranos**

Tesis para optar al grado de Magister en Bioquímica y Bioinformática

Maryori Fernanda González Olivero

Concepción-Chile

2023

Profesores Guía: Dra. Teresa Caprile Elola-Olaso

Dr. Carlos Farkas Pool

Dpto. de Biología Celular, Facultad de Ciencias Biológicas

Universidad de Concepción

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

Profesora tutora:

---

Dra.  
Teresa Caprile Elola-Olaso  
Facultad de Ciencias Biológicas

Profesor Cotutor:

---

Dr.  
Carlos Farkas Pool  
Universidad Católica de la Santísima Concepción

Profesores integrantes Comisión Evaluadora:

---

Dra.  
María de Los Ángeles García Robles  
Facultad de Ciencias Biológicas

---

Dr.  
Sylvain Marcellini Liotaud  
Facultad de Ciencias Biológicas

---

Dr.  
Hernán Montecinos Palma  
Facultad de Ciencias Biológicas

---

Dra.  
Amparo Uribe Pérez  
Directora Programa Magíster en Bioquímica y Bioinformática

## **AGRADECIMIENTOS**

Hubiese sido impensado hacer una carrera científica sin el apoyo ininterrumpido de mi familia. Agradezco a mi mamá, papá y hermanos por no dejar nunca de creer en mí, incluso en los momentos que me vi derrotada. En especial agradecer a mi mamita que viajaba al menos una vez al mes a acompañarme y a mi papá que se hacía cargo del negocio cuando mi mamá viajaba. También quiero agradecer a Gustavo, mi hermano, con quien he compartido 27 años en este mundo, que me ha acompañado, querido y se ha hecho cargo de mi bebe el Tom (mi gato). No puedo dejar fuera a mi tia verito, que siempre me acompañó y apoyo incondicionalmente.

Agradecer a mi tutora la Dra. Teresa, que me acogió en su laboratorio y me enseñó más allá de lo esperado, gracias por su paciencia, por comprender y enrielar mis ideas un poco enredadas. También agradecer a mi cotutor el Dr. Carlos Farkas, por enseñarme todo lo que sé de bioinformática en tiempos récord, por su constante aporte de ideas y por entender mis dichos de campo.

Agradezco a todos los miembros iniciales del Laboratorio de Guía Axonal y a don José por sus bromas en las mañanas y por llevarme maní (que me encanta). En particular quiero agradecer a Felipe, en quien encontré refugio en los momentos difíciles de mi tratamiento, que me ayudo a contener mis penas y compartió mis alegrías, mi gurú del orden y la logística, una gran persona que sin lugar a duda hace del LAGA un mejor lugar. También agradecer a Jaime que es una persona leal, comprensiva y analítica, todo lo que un buen científico debe tener, aunque a veces muy callado pero un excelente amigo. A Vania, aunque ya no es miembro de LAGA, será un pollito más.

Quiero agradecer a Viviana una gran persona, científica y amiga que me entregó el magister y que ha sido un apoyo fundamental en mi vida y que espero lo siga siendo. Agradezco los momentos y grandes anécdotas compartidas, así como también los momentos de tristeza y confianza que compartimos.

No puedo dejar de agradecer a miembros del GDeP, como Ian, que se ha vuelto un compañero más de laboratorio, que, aunque me imita todo el día ese niño, se ha vuelto un gran amigo. También agradecer a miembros del LADE, don Héctor e Isi que son los vecinos de laboratorio que acompañan en todas. A panki, una amiga que, aunque no esté con nosotros en la UdeC, sigue guiándome con su experiencia.

Agradezco también a la Dra. Amparo, una persona que siempre tiene un buen consejo que compartir, por su apoyo desinteresado en todas mis dudas y por su labor incansable en el Magister de Bioquímica y Bioinformática.

Finalmente quiero agradecer a las personas que han llegado de forma inesperada y se han convertido en parte fundamental y especial de mi vida.

Por último, agradezco a la Universidad de Concepción, en especial a la beca interna del programa del Magíster en Bioquímica y Bioinformática y a la Dirección de Postgrado por su apoyo para la asistencia a congresos. También agradezco al proyecto FONDECYT regular N°1191860 adjudicado por la Dra. Teresa Caprile.

## TABLA DE CONTENIDO

<b>1</b>	<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>15</b>
1.1	DESARROLLO DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL Y LA FORMACIÓN DE LOS ORGANIZADORES SECUNDARIOS .....	15
1.2	FAMILIA DE FACTORES DE CRECIMIENTO DE FIBROBLASTOS Y SUS RECEPTORES .....	20
1.3	ORGANIZADORES SECUNDARIOS CEREBRALES .....	25
1.4	ROL DE FGFs Y FGFRs EN EL DESARROLLO DEL CEREBRO EN ESTADIOS TEMPRANOS .....	28
1.5	OSC COMO ORGANIZADOR CEREBRAL .....	30
<b>2</b>	<b>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS DEL TRABAJO</b> .....	<b>36</b>
2.1	HIPÓTESIS.....	36
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	36
<b>3</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>37</b>
3.1	MODELO DE INVESTIGACIÓN .....	37
3.2	EXTRACCIÓN DE ARN.....	37
3.3	SECUENCIACIÓN .....	37
3.4	ANÁLISIS DE LA DATA DE SECUENCIACIÓN DE ARN.....	38
3.4.1	<i>Alineamiento</i> .....	38
3.4.2	<i>Cuantificación de la expresión de ARNm</i> .....	39
3.4.3	<i>Análisis de enriquecimiento funcional</i> .....	39
3.5	SÍNTESIS DE CDNA .....	39
3.6	PCR CONVENCIONAL.....	40
3.7	PCR CUANTITATIVA EN TIEMPO REAL (qPCR) .....	41
3.8	MANEJO DE MUESTRAS HISTOLÓGICAS.....	42
3.8.1	<i>Procesamiento de muestras</i> .....	42
3.8.2	<i>Análisis de localización de FGFR mediante inmunofluorescencia</i> .....	43
3.9	WESTERN-BLOT DE EXTRACTOS PROVENIENTES DE OSCP. ....	44
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>48</b>
4.1	OBJETIVO I: CARACTERIZAR EL TRANSCRIPTOMA DE LA PLACA DEL TECHO DIENCEFÁLICA CAUDAL (OSCP) EN LOS ESTADIOS HH23 Y HH30. ....	48
4.1.1	<i>Evaluación de calidad de datos de RNA-Seq</i> .....	48
4.1.2	<i>Análisis de Expresión Diferencial</i> .....	54
4.1.3	<i>Análisis de Ontología Génica</i> .....	60
4.1.4	<i>Familia de Factores de crecimiento de Fibroblastos</i> .....	77
4.1.5	<i>Análisis de transcritos de FGFRs en el OSC</i> .....	82
4.2	OBJETIVO 2: IDENTIFICAR LA PRESENCIA DE FGFRs EN EL OSC DURANTE EL DESARROLLO EMBRIONARIO TEMPRANO. .	83
4.2.1	<i>Análisis de expresión de FGFR1 en el OSC</i> .....	83
4.2.2	<i>Análisis de expresión de FGFR3 en el OSC</i> .....	85
4.2.3	<i>Análisis de expresión de FGFR4 en el OSC</i> .....	87
4.3	OBJETIVO 3: DETERMINAR LA LOCALIZACIÓN DE LOS FGFRs EN LA OSC DURANTE EL DESARROLLO EMBRIONARIO TEMPRANO.....	89
4.3.1	<i>Análisis de expresión de FGFR1 en el OSC</i> .....	92
4.3.2	<i>Análisis de expresión de FGFR3 en el OSC</i> .....	94
4.3.3	<i>Análisis de expresión de FGFR4 en el OSC</i> .....	100
<b>5</b>	<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>103</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>128</b>

7 BIBLIOGRAFÍA..... 129

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>FIGURA 1.</b> REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DEL DESARROLLO EMBRIONARIO DEL CEREBRO EN VERTEBRADOS. -----	17
<b>FIGURA 2.</b> REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LA ESTRUCTURA DE LA FAMILIA DE FGFs. -----	22
<b>FIGURA 3.</b> REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE FGFR EN EL CONTEXTO CELULAR. -----	23
<b>FIGURA 4.</b> REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE ISOFORMAS DE FGFR GENERADAS POR SPLICING. -----	24
<b>FIGURA 5.</b> REPRESENTACIÓN DE LOS CENTROS ORGANIZADORES SECUNDARIOS Y LAS MOLÉCULAS DE SEÑALIZACIÓN SECRETADAS EN EL MODELO PROSOMÉRICO. -----	27
<b>FIGURA 6.</b> PATRONES DE EXPRESIÓN DE FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN EN PRIMORDIOS CEREBRALES. -----	32
<b>FIGURA 7.</b> REPRESENTACIÓN GRÁFICA DE EVENTOS CLAVE EN EL DESARROLLO CEREBRAL EMBRIONARIO DE G. GALLUS. -----	35
<b>FIGURA 8.</b> PIPELINE DE RNA-SEQ UTILIZADO. -----	49
<b>FIGURA 9.</b> ANÁLISIS DE CALIDAD DE RNA-SEQ PREVIO A LA NORMALIZACIÓN USANDO RUVSEQ. -----	52
<b>FIGURA 10.</b> ANÁLISIS DE CALIDAD DE RNA-SEQ LUEGO DE LA NORMALIZACIÓN USANDO RUVSEQ. -----	53
<b>FIGURA 11.</b> DIAGRAMA DE VEN DE GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESADOS EN EL OSC. -----	55
<b>FIGURA 12.</b> VOLCANO-PLOT DE GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESADOS EN EL OSC EN ESTADIOS HH23 Y HH30. -----	57
<b>FIGURA 13.</b> DIAGRAMA DE VEN DE GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESADOS EN EL OSC. -----	58
<b>FIGURA 14.</b> VOLCANO-PLOT DE GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESADOS EN EL OSC EN ESTADIO HH30 Y CEREBRO COMPLETO HH30. -----	59
<b>FIGURA 15.</b> ANÁLISIS DE ONTOLOGÍA GÉNICA. -----	60
<b>FIGURA 16.</b> ANÁLISIS DE ONTOLOGÍA GÉNICA DE PROCESOS BIOLÓGICOS DE OSC HH23. -----	62
<b>FIGURA 17.</b> ANÁLISIS DE ONTOLOGÍA GÉNICA DE COMPARTIMIENTO CELULAR DE OSC. HH23. -----	63
<b>FIGURA 18.</b> ANÁLISIS DE ONTOLOGÍA GÉNICA DE FUNCIÓN MOLECULAR DE OSC HH23. -----	64
<b>FIGURA 19.</b> ANÁLISIS DE ONTOLOGÍA GÉNICA DE PROCESOS BIOLÓGICOS DE OSC HH30. -----	67
<b>FIGURA 20.</b> ANÁLISIS DE ONTOLOGÍA GÉNICA DE FUNCIÓN MOLECULAR DE OSC HH30. -----	68
<b>FIGURA 21.</b> ANÁLISIS DE ONTOLOGÍA GÉNICA DE PROCESOS BIOLÓGICOS DE OSC HH30. -----	71
<b>FIGURA 22.</b> ANÁLISIS DE ONTOLOGÍA GÉNICA DE COMPARTIMIENTO CELULAR DE OSC HH30. -----	73
<b>FIGURA 23.</b> ANÁLISIS DE ONTOLOGÍA GÉNICA DE FUNCIÓN MOLECULAR DE OSC HH30. -----	74
<b>FIGURA 24.</b> HEATMAP OBTENIDO CON EL Z-SCORE DE LA EXPRESIÓN GÉNICA NORMALIZADA DE LA FAMILIA FGF Y RECEPTORES DE LAS MUESTRAS DE OSC Y CEREBRO COMPLETO. -----	78
<b>FIGURA 25.</b> CONTEO NORMALIZADO DE FGFRs. -----	80
<b>FIGURA 26.</b> CONTEO NORMALIZADO DE LIGANDOS DE FGFs. -----	81
<b>FIGURA 27.</b> CUANTIFICACIÓN DE FGFR EN EL OSC MEDIANTE RT-QPCR. -----	82
<b>FIGURA 28.</b> ENSAYO DE WESTERN BLOT DE FGFR1. -----	84
<b>FIGURA 29.</b> ENSAYO DE WESTERN BLOT DE FGFR3. -----	86
<b>FIGURA 30.</b> ENSAYO DE WESTERN BLOT DE FGFR4. -----	88
<b>FIGURA 31.</b> TINCIÓN DE HEMATOXILINA-EOSINA DE SECCIONES SAGITALES DE PRIMORDIO DE OSC EN ESTADIO HH25. -----	90
<b>FIGURA 32.</b> TINCIÓN DE HEMATOXILINA-EOSINA DE SECCIONES FRONTALES DE OSC EN ESTADIO HH30. --	91

<b>FIGURA 33.</b> INMUNOFLUORESCENCIA DE FGFR1 DE SECCIONES SAGITALES DE PRIMORDIO DE OSC EN ESTADIO HH30 MEDIANTE MICROSCOPIA CONFOCAL. -----	93
<b>FIGURA 34.</b> INMUNOFLUORESCENCIA DE FGFR3 DE SECCIONES SAGITALES DE PRIMORDIO DE OSC EN ESTADIO HH25 MEDIANTE MICROSCOPIA CONFOCAL. -----	95
<b>FIGURA 35.</b> Z-STACK DE INMUNOFLUORESCENCIA DE FGFR3 DE SECCIONES SAGITALES DE PRIMORDIO DE OSC EN ESTADIO HH25 MEDIANTE MICROSCOPIA CONFOCAL. -----	96
<b>FIGURA 36.</b> INMUNOFLUORESCENCIA DE FGFR3 DE SECCIONES FRONTALES DE PRIMORDIO DE OSC EN ESTADIO HH30 MEDIANTE MICROSCOPIA CONFOCAL. -----	98
<b>FIGURA 37.</b> INMUNOFLUORESCENCIA DE FGFR3 DE SECCIONES SAGITALES DE PRIMORDIO DE OSC EN ESTADIO HH30 MEDIANTE MICROSCOPIA CONFOCAL. -----	99
<b>FIGURA 38.</b> INMUNOFLUORESCENCIA DE FGFR4 DE SECCIONES SAGITALES DE PRIMORDIO DE OSC EN ESTADIO HH25 MEDIANTE MICROSCOPIA CONFOCAL. -----	101
<b>FIGURA 39.</b> INMUNOFLUORESCENCIA DE FGFR4 DE SECCIONES FRONTALES DE PRIMORDIO DE OSC EN ESTADIO HH30 MEDIANTE MICROSCOPIA CONFOCAL. -----	102
<b>FIGURA 40.</b> REPRESENTACIÓN DE LA POSIBLE LOCALIZACIÓN DE FGFR1 EN CÉLULAS DE LA GLÍA RADIAL DE OSC Y SUS POSIBLES VARIANTES. -----	116
<b>FIGURA 41.</b> REPRESENTACIÓN DE LA LOCALIZACIÓN DE FGFR3 EN CÉLULAS DE LA GLÍA RADIAL DE OSC. --	119
<b>FIGURA 42.</b> REPRESENTACIÓN DE LA LOCALIZACIÓN DE FGFR4 EN CÉLULAS DE LA GLÍA RADIAL DE OSC. --	122
<b>FIGURA 43.</b> EXPRESIÓN DE SUBFAMILIAS DE FGFs EN EL OSC. -----	125
<b>FIGURA 44.</b> MODELO PROPUESTO DE SEÑALIZACIÓN DE FGF EN EL OSC-----	126

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>TABLA 1.</b> SECUENCIA DE PARTIDORES PARA ISOFORMAS DE FGFR .....	41
<b>TABLA 2.</b> SECUENCIA DE PARTIDORES PARA VALIDACIÓN RNA-SEQ.....	42
<b>TABLA 3.</b> ANTICUERPOS PRIMARIOS, SECUNDARIOS Y OTROS MARCADORES.....	47

## **ABREVIATURAS**

**ADAMTS:** A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin type 1 repeats

**AFRU:** anti-fibra de Reissner/urea

**ANR:** región neural anterior

**AP:** anteroposterior

**APOA:** apolipoprotein A

**ARNm:** ARN mensajero

**ATP:** adenosín Trifosfato

**BDBF:** brain derived neurotrophic factor

**BDBF:** brain derived neurotrophic factor

**BMP:** bone morphogenic Protein

**BSA:** Albumina de suero bovino

**cDNA:** DNA de copia

**CER1:** cerberus

**CNTN6:** contactin 6

**CP:** comisura posterior

**DEG:** genes diferencialmente expresados

**DI:** diencéfalo

**DSCAM:** Down syndrome cell adhesion molecule

**DV:** dorsoventral

**EDTA:** ethylenediaminetetraacetic acid

**EPH:** ephrin receptor

**FBLN:** fibulin

**FDR:** false discovery rate

**FGF:** fibroblast growth factor

**FGFR:** fibroblast growth factor receptor

**GAPDH:** Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa

**GO:** gene ontology

**HH:** estadio de desarrollo embrionario de acuerdo con Hamburger y Hamilton

**IsO:** isthmus organizer

**KDa:** kilo daltons

**LCRe:** líquido cefalorraquídeo embrionario

**LOXL2:** lysyl Oxidase Like 2

**MES:** mesencéfalo

**NaCl:** cloruro de sodio

**NCBI:** National Center for Biotechnology Information

**NPSR1:** neuropeptide S receptor 1

**OSC:** órgano subcomisural

**Pb:** pares de bases

**PBS:** phosphate buffered saline

**PBS:** Phosphate buffered saline

**PDVF:** polyvinylidene difluoride

**PG:** glándula pineal

**RBP:** retinol binding Protein

**RIN:** RNA integrity number

**RT-qPCR:** quantitative reverse transcription PCR

**SDS:** Sodium Dodecyl Sulfate

**SFRP2:** Secreted Frizzled Related Protein 2

**TBS:** Tris Buffered Saline

**TEL:** telencéfalo

**TUJ1:** class III beta-tubulin

**TUJ1:** tubulina 1

**Uniprot:** universal protein resource

**VASN:** Vasorin

**VEGFD:** vascular endothelial growth factor

**VEGFR:** Vascular Endothelial Growth Factor Receptors

**Wnt:** Wingless-related integration site

**ZLI:** zona limitante intratalámica

**µM:** micro metros

## RESUMEN

Los centros organizadores cerebrales son agrupaciones celulares situadas en las fronteras morfológicas que tienen la capacidad de secretar moléculas señalizadoras como las proteínas morfogénicas óseas (BMPs, bone morphogenic proteins), wntless (Wnts) o factores de crecimiento de fibroblastos (FGF), las cuales influyen en la determinación de la identidad neuronal o glial en células neuroepiteliales adyacentes. Adicionalmente, los centros organizadores secundarios presentan un patrón diferencial de factores de transcripción, diferentes a las zonas aledañas. A la luz de este concepto, el órgano subcomisural (OSC) emerge como un candidato potencial para cumplir con las características de un centro organizador cerebral. Esto se sustenta en su ubicación estratégica en la interfaz entre el diencéfalo y el mesencéfalo, su diferenciación muy temprana como glándula cerebral, su expresión de diversos factores de transcripción, receptores (incluyendo leptina y FGF) y la secreción de OSC-espondina, una proteína vinculada con la proliferación y diferenciación del neuroepitelio y guía axonal. Basándonos en esta información, planteamos la hipótesis de que el OSC podría operar como un centro organizador cerebral secundario. Para dilucidar la función del OSC se realizaron análisis de RNA-seq en dos estadios, validación por RT-qPCR, identificación de proteínas mediante western blot y localización mediante inmunofluorescencia.

Nuestro análisis transcriptómico de OSC en estadios HH23 (4 días de desarrollo) y HH30 (7 días de desarrollo) en embriones de pollo revela que el OSC opera como una glándula altamente secretora, con productos que pueden ser clasificados en tres grupos principales, que no son excluyentes entre sí. En primer lugar,

identificamos moléculas implicadas en la guía axonal y la neurogénesis. En segundo lugar, encontramos una variedad de moléculas relacionadas con la secreción y la matriz extracelular. Por último, observamos la presencia de factores de crecimiento y hormonas en el OSC.

Dentro de los múltiples productos secretorios encontrados, se analizó en detalle la expresión de diversos receptores de FGF en el techo diencefálico. Nuestra evidencia sugiere que el OSC podría secretar FGF hacia el líquido cefalorraquídeo, lo que podría activar señalización paracrina en el neuroepitelio cercano. Además, la presencia de receptores de FGF en el propio OSC sugiere la posibilidad de una señalización autocrina en esta región.

Los resultados obtenidos sugieren fuertemente un rol morfogénico del OSC, y apoyan la hipótesis de que sería un nuevo centro organizador cerebral.

## SUMMARY

Secondary brain organizer centers are cellular clusters located at morphological boundaries that have the capacity to secrete signaling molecules such as BMP, Wnts or FGF, which influence the determination of neuronal or glial identity in the adjacent neuroepithelial cells. This establishes the SCO as a potential candidate for a brain organizing center during early brain development. This notion is supported by several aspects. Firstly, the SCO is strategically located between the diencephalon and midbrain. In its epithelium, it expresses a diversity of receptors, including leptin and FGF, and it secretes SCO-spondin, a protein mostly associated with axonal guidance. These factors collectively position the SCO as a focal point for signaling. Based on this information, we hypothesized that the SCO might operate as a secondary brain organizing center. To elucidate the function of the SCO an initial two-stage RNA-seq analysis was performed validating specific genes using RT-qPCR. Proteins of interest were identified and localized using western blot and immunofluorescence respectively.

Our transcriptomic analysis of the SCO at HH23 and HH30 stages in chick embryos reveals that the SCO functions as a highly secretory gland. Its products can be classified into three groups, which are not mutually exclusive. The first group is mostly formed by molecules related to axonal guidance and neurogenesis. While the second group comprises a diverse range of molecules related to secretion and the extracellular matrix. Lastly, we have observed the presence of growth factors and hormones within the SCO.

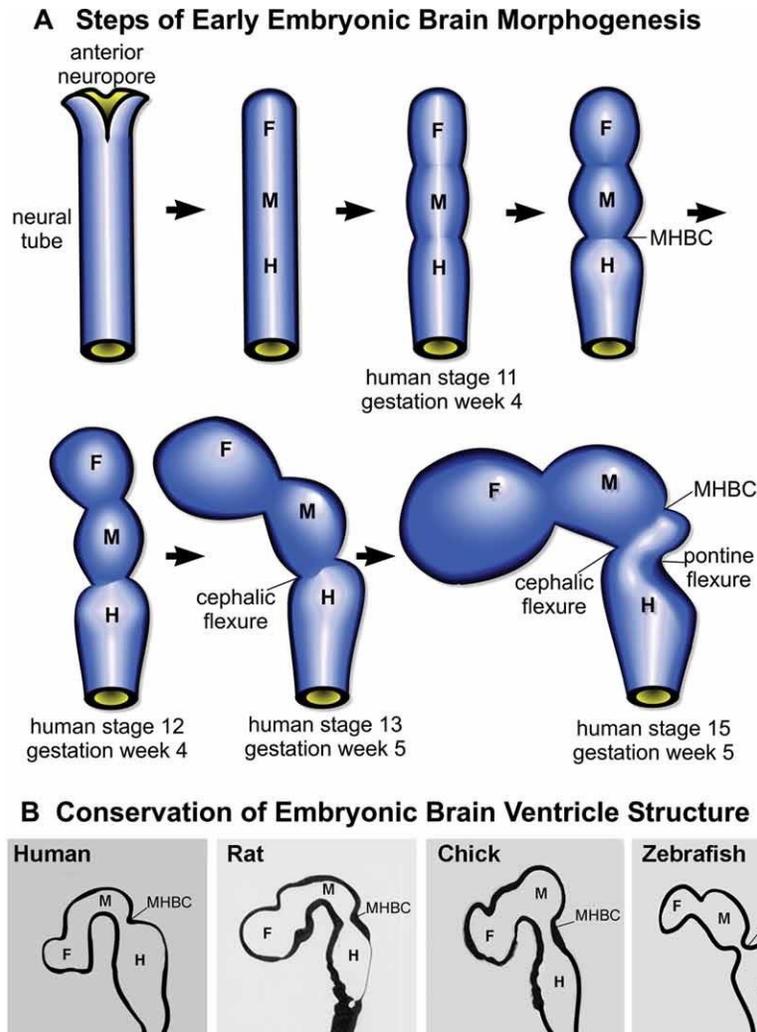
Specifically, we analyzed the expression of several FGFR in the diencephalic roof plate. Our evidence suggests that the SCO may secrete FGF into the cerebrospinal fluid, which could activate paracrine signaling in not only the nearby neuroepithelium but in the SCO itself suggesting the possibility of autocrine signaling.

# **1 INTRODUCCIÓN**

## **1.1 Desarrollo del sistema nervioso central y la formación de los organizadores secundarios**

El sistema nervioso central (SNC) tiene su origen en el ectodermo, el cual, durante la etapa de neurulación temprana, recibe señales inductivas desde la notocorda, una estructura cilíndrica formada por células mesodérmicas que se sitúa justo por debajo de éste, y que define la línea media embrionaria (Jacobson and Gordon 1976; Schoenwolf and Smith 1990; Smith and Schoenwolf 1997). Las señales inductivas o morfogenos emitidos desde la notocorda hacia el ectodermo suprayacente (o neuroectodermo) permiten que este se diferencie en células precursoras nerviosas, aumentando el grosor en la línea media y constituyéndose de esta forma la placa neural. A medida que la neurulación continúa, la placa neural comienza a plegarse, generando una elevación de sus extremos laterales hasta que convergen dorsalmente y se fusionan, dando lugar al tubo neural. El tubo neural es una estructura hueca formada por células progenitoras neuroepiteliales en contacto con el líquido cefalorraquídeo embrionario (LCRe) (Schoenwolf 2018; Zappaterra and Lehtinen 2012). Las células neuroepiteliales tienen características de células madre debido a su potencial de generar neuronas y células gliales de todo el SNC y tener la capacidad de autorrenovarse (Götz and Huttner 2005). Durante estos estadios tempranos del desarrollo neural las células se dividen rápidamente, sin embargo, la proliferación celular no es uniforme a lo largo del tubo neural, provocando que algunas regiones del epitelio neural se expandan y comiencen a formar las diversas regiones especializadas del SNC maduro (fig. 1).

La correcta morfogénesis del cerebro requiere que el neuroepitelio sufra dos grandes procesos restringidos en espacio y tiempo. Primero, corresponde la adquisición de los ejes anteroposterior (AP) y el dorsoventral (DV) en el tubo neural lo que permite la formación de las vesículas cerebrales primarias (Mongera et al. 2019). La adquisición del destino celular de acuerdo con los ejes DV y AP implica patrones de señalización a lo largo del tubo neural. La formación del eje DV es inducido por tejido especializado con capacidad de secretar moléculas de señalización que inducen la ventralización y dorsalización del neuroepitelio. Así



**Figura 1.** Representación esquemática del desarrollo embrionario del cerebro en vertebrados.

A: formación del tubo neural y desarrollo de las cavidades cerebrales primarias, en donde en la primera imagen se observa el cierre del tubo neural anterior y posterior crecimiento y formación de flexuras y constricciones del tubo que darán origen a las cavidades cerebrales. B: Conservación de la estructura del ventrículo cerebral embrionario en vertebrados en vista sagital. Las cavidades cerebrales representadas corresponden a embriones humanos, etapa 17 (aproximadamente 43 días después de la fertilización), cavidades cerebrales de embrión de rata, etapa E14 (14 días después de la fertilización), cavidades cerebrales de embrión de pollo, etapa 16 (aproximadamente 2,5 días después de la fertilización) cavidades del cerebro del embrión de pez cebra, 24 hpf. F, prosencéfalo (telencéfalo más diencéfalo); M, mesencéfalo (mesencéfalo); H, rombencéfalo (rombencéfalo); MHBC, constricción del límite entre el mesencéfalo y el rombencéfalo. Modificado de (Lowery and Sive 2009).

mismo, la regionalización AP es inducida por moléculas de señalización que determinarán la diferenciación y proliferación celular de la parte rostral del tubo neural que inducen inicialmente a la formación de tres vesículas cerebrales: el prosencéfalo primario, el mesencéfalo y el rombencéfalo (Schilling 2008; Simon and Hadjantonakis 2018). El avance de los procesos de crecimiento y especificación genética por parte del tubo neural conduce a la subdivisión de estas vesículas primarias, particularmente el prosencéfalo primario se desdobra en prosencéfalo secundario y diencefalo, mientras que el rombencéfalo se subdivide en metencéfalo y mielencéfalo (Ishikawa et al. 2012).

La regionalización del tubo neural surge producto de la expresión restringida de genes reguladores, inducidos por morfógenos, los cuales regulan el destino celular del neuroepitelio (Wilde, Petersen, and Niswander 2014).

Los morfógenos juegan un papel clave durante los primeros estadios de desarrollo regulando la organización posicional de las células, diferenciación y destino celular (Briscoe and Small 2015a; Wartlick, Kicheva, and González-Gaitán 2009). Para considerar una molécula de señalización como morfógeno debe cumplir con ciertos criterios como, ser expresada en una región específica y en el momento exacto del desarrollo, ser producida por una fuente localizada que le permita formar un gradiente de concentración (Briscoe and Small 2015a, 2015b). Además, debe producir una respuesta celular directa, es decir que la célula que se encuentra en el gradiente de concentración debe responder en forma dosis-dependiente. Una vez que el morfógeno se une a su receptor, éste media la respuesta celular de forma dependiente de la concentración, es decir que diferentes grupos celulares tienen un

umbral de concentración diferente y por lo tanto la respuesta génica disímil (Camacho-Aguilar and Warmflash 2020; Wartlick et al. 2009).

Por otro lado, la activación génica de los morfógenos está restringida por la expresión diferencial y específica de factores de expresión (FT) (Briscoe and Small 2015a). Por ejemplo, la especificación del tubo neural en mamíferos sigue gradientes opuestos de morfógenos: Shh, un morfógeno que emana del polo ventral de la notocorda, mientras que los morfógenos antagonistas Wnt y BMP se originan en la región dorsal (Ulloa and Martí 2010). La activación de los receptores de Shh, llevan a la transducción de señales aguas abajo que culminan con la activación de la familia de FT Gli, que a su vez activa la expresión de los TF ventrales como, Nkx6.1, Olig2, Nkx2.2 y reprimes los TF expresados dorsalmente como Pax3, Pax7, Pax6, Msx1, Irx3 (Briscoe and Small 2015; Ulloa and Martí 2010).

Estas señales morfogenéticas son producidas en los centros organizadores cerebrales cuya función es controlar el destino celular e identidad molecular de las células (Crespo-Enriquez et al. 2012; Echevarría et al. 2003; Thawani et al. 2018; Vieira et al. 2010). En este caso, los centros organizadores primarios son los responsables de la formación de los patrones AP y DV en el tubo neural (Meinhardt 1983; Rubenstein et al. 1994). La combinación de los patrones AP y DV genera áreas cerebrales con diferentes patrones de expresión de genes donde se forman los primordios cerebrales, donde se establecen los centros organizadores cerebrales secundarios (Echevarría et al. 2003; Pasini and Wilkinson 2002). Los centros secundarios establecen la identidad neuronal de las regiones cercanas a

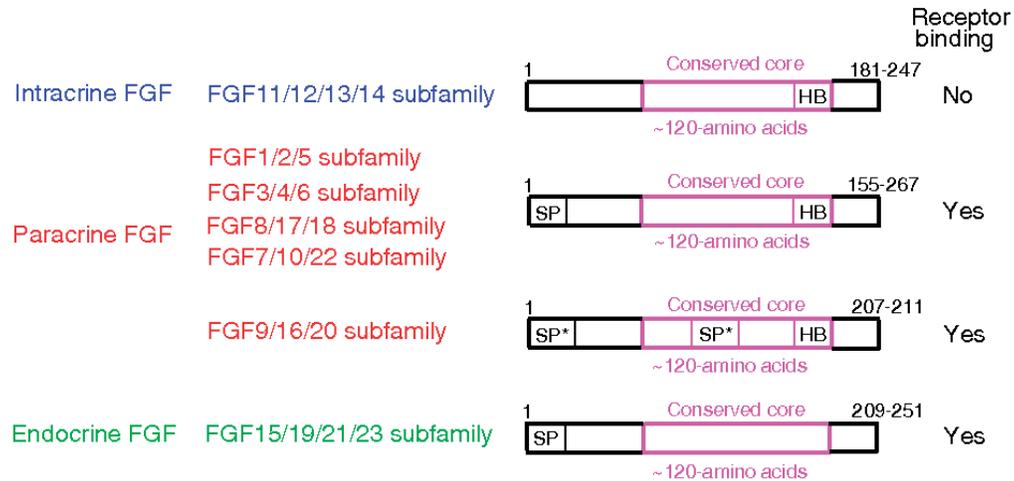
través de la regulación de programas específicos de proliferación y diferenciación para cada primordio cerebral. Estos centros establecen gradientes de difusión de morfogenos mediante el cual regulan la expresión diferencial de genes de forma dependiente de la concentración (Cavodeassi and Houart 2012).

Entre los diversos factores secretados por los centros organizadores, destacan los miembros de la familia de crecimientos de fibroblastos (FGF), y especialmente el ligando FGF8 (Eagleson and Dempewolf 2002; Pera et al. 2002).

## **1.2 Familia de factores de crecimiento de fibroblastos y sus receptores**

Los factores de crecimiento de fibroblastos son glicoproteínas solubles con una región central altamente conservada compuesta por 120 aminoácidos (fig. 2). Hasta la fecha se han identificado 22 miembros en vertebrados, los cuales son agrupados en siete familias de acuerdo con su similitud de secuencia y función (Itoh and Ornitz 2004; Mason 2007). Adicionalmente, los ligandos pueden ser clasificados en tres grandes grupos de acuerdo con el mecanismo de acción, FGFs canónicos (paracrinos), FGFs semejantes a hormonas (endocrinos) y FGFs intracelulares (intracrinos). Los dos primeros, conocidos como FGF secretados, señalizan a través de receptores de superficie celular tipo tirosina-quinasa (FGFR), mientras que los FGF intracrinos actúan como cofactores para canales de sodio dependiente de voltaje, de manera independiente de FGFR (Leerberg, Hopton, and Draper 2019; Mason 2007).

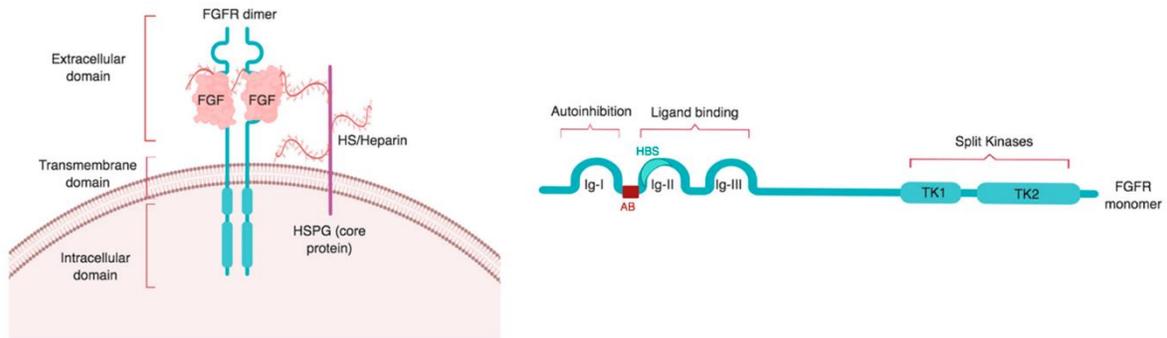
Los FGF secretados son rápidamente atrapados por moléculas de la matriz extracelular como los proteoglicanos de heparán sulfato (HSPG) (Chua et al. 2004; Matsuo and Kimura-Yoshida 2013; WJ, MA, and AD 2010). El HSPG es un tipo de glicosaminoglicano que consiste en una larga cadena lineal de carbohidrato formada por repeticiones de los disacáridos sulfatados ácido glucurónico unido a N-acetilglucosamina. Los HSPGs están compuestos de un núcleo proteico específico al cual se unen covalentemente cadenas de HS. Estos HSPGs, de acuerdo con la estructura de su núcleo proteico pueden estar en la superficie celular en condición de proteínas transmembrana (sindecanos), como proteínas de superficie celular ancladas a glicerofosfatidilinosítidos (glicoproteína) o como proteínas secretadas hacia la ECM (perlecán y agrina) (De Pasquale and Pavone 2019). Los HSPGs que se hallan asociados a la membrana pueden ocasionalmente transformarse en difusibles si son clivados por proteasas o heparitinasas (De Pasquale and Pavone 2019; WJ et al. 2010). Los HSPGs son responsables de la formación de gradientes de señalización, no solo de FGF, sino también de otros morfógenos como BMPs y proteínas Wnts (Matsuo and Kimura-Yoshida 2013). Adicionalmente, estas moléculas estabilizan la unión entre FGF-FGFR y previenen la degradación por proteasas de FGF (Hultman et al. 2019).



**Figura 2.** Representación de acuerdo con los mecanismos de acción, donde se muestran además las familias y su estructura de FGF.

Los genes de la familia de FGF pueden ser clasificadas en 7 subfamilias de acuerdo con la similitud de secuencia y función. Adicionalmente, pueden ser clasificadas de acuerdo con su mecanismo de acción en intracrininos, paracrino y endocrino. SP: péptido señal, SP\*: péptido señal secretado bipartito no escindido, HB: sitio de unión a heparina. Extraída de (Itoh and Ornitz 2011).

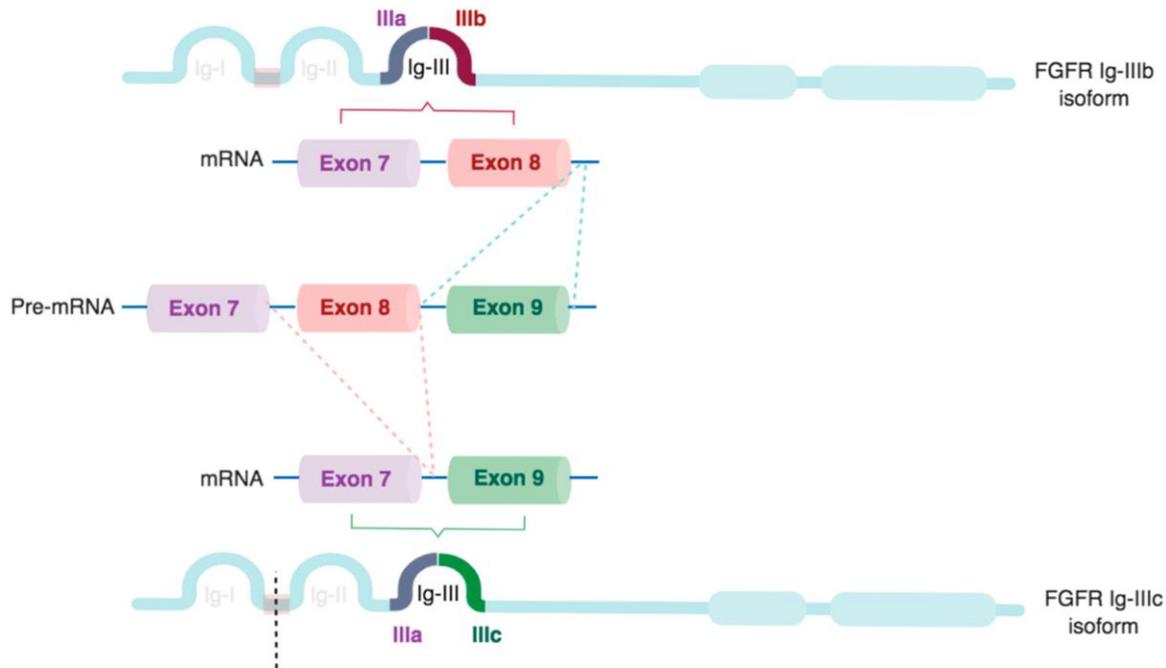
En relación con los receptores de FGF (FGFR), se han identificado cuatro genes independientes que codifican para cuatro receptores que comparten alta similitud de secuencia aminoacídica, que varía desde 56% a 71% (Itoh and Ornitz 2004). Los FGFR canónicos (figura 3) tienen tres regiones topológicas, una extracelular, formado por tres dominios tipo inmunoglobulina (Ig I, II, III), una región transmembrana que consiste en una única hélice  $\alpha$  y una región intracelular, compuesta por dos dominios de tirosina quinasa que le confieren la actividad catalítica del receptor (Itoh and Ornitz 2004; Mason 2007; Plotnikov et al. 2000; Schlessinger et al. 2000a, 2000b; Touat et al. 2015).



**Figura 3.** Representación esquemática de FGFR en el contexto celular.

El panel izquierdo muestra la organización del complejo receptor-ligando de FGF en unión con HS en conformación dimérica. El panel derecho corresponde a una representación esquemática de FGFR monomérico canónico conformado por los 3 dominios, extracelular, transmembrana e intracelular. La Ig-II contiene el sitio de unión heparina/HS (HBS) y está separada de la Ig-I por una caja ácida (AB). El dominio citoplasmático está formado por dos tirosinas quinasa: tirosina quinasa 1 (TK1) y tirosina quinasa 2 (TK2). Imagen extraída de (Jimenez-Pascual and Siebzehnrubl 2019).

Los dominios tipo Ig II y III son responsables de la unión del ligando, donde la región C-terminal del dominio III de inmunoglobulina puede sufrir splicing (figura 4), generando isoformas tejido-específicas y con diferente afinidad de unión al ligando (Yeh et al. 2003). La isoforma b de FGFR se forma por la retención en el ARNm de los exones 7 y 8, en cambio, si se retienen los exones 7 y 9, se originará la isoforma c del receptor. Esto solo ocurre en los receptores FGFR1-FGFR3, excluyendo al FGFR4 (Jimenez-Pascual and Siebzehnrubl 2019), permitiendo a los receptores aumentar la diversidad funcional, para responder a la gran cantidad de ligandos.



**Figura 4.** Representación esquemática de isoformas de FGFR generadas por splicing.

Las isoformas de los 3 receptores de FGF (FGFR1- FGFR3) IIIb o IIIc se forman por la inclusión/exclusión de los exones 8 o 9 de la mitad de la secuencia C-terminal del Ig-III, respectivamente. Imagen extraída de (Jimenez-Pascual and Siebzehnrubl 2019).

### **1.3 Organizadores secundarios cerebrales**

La adquisición de identidades neurales distintas emerge como consecuencia de la limitación gradual del potencial histogénético, un proceso influenciado por señales morfogénicas locales. Estas señales se originan en regiones específicas que se han denominado centros organizadores secundarios (Cavodeassi and Houart 2012), los cuales regulan la formación de patrones, proliferación, guía axonal y la polaridad regional de las regiones neuroepiteliales cercanas (Echevarría et al. 2003; Vieira et al. 2010).

Los centros organizadores se caracterizan por cuatro características principales: I) Su ubicación estratégica en el límite cefálico de las vesículas encefálicas, o bien, en las zonas de constricción (como el ZLI e IsO), II) Ocupan una posición clave en el límite de restricción del linaje celular, lo cual está mediado principalmente por miembros de la familia Eph y cadherina (Cavodeassi and Houart 2012; Kesavan et al. 2020; Storm et al. 2006), III) Expresan factores de transcripción que definen y delimitan el área circundante (Echevarría et al. 2003; Martínez et al. 2012), IV) Tienen la capacidad de expresar y secretar morfógenos o factores de crecimiento, como FGF, Shh y la familia de proteínas WNT, que regulan el ambiente local. En resumen, los centros organizadores desempeñan un papel esencial al dirigir la especificación y diferenciación del entorno local a través de señalización autocrina y paracrina.

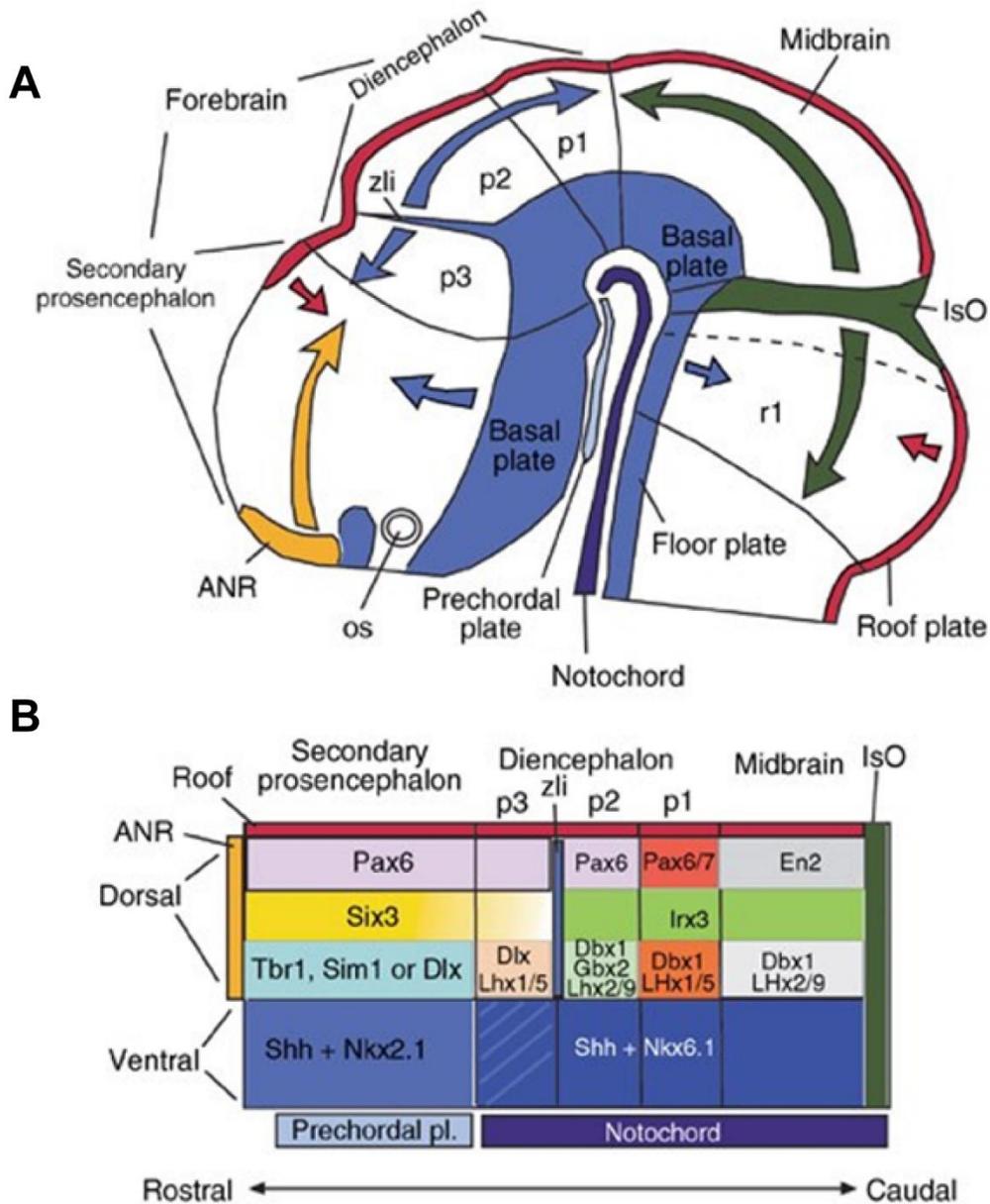
Hasta la fecha, en el tubo neural se han identificado tres regiones como organizadores secundarios (figura 5), la región neural anterior (ANR), la zona

limitante intratálamica (ZLI) y el organizador ístmico (ISO) (Kiecker and Lumsden 2012).

El organizador de la cresta neural anterior se ubica a nivel de los bordes del neuroporo anterior en el techo del prosencéfalo (Eagleson and Dempewolf 2002) y es responsable de la formación del telencéfalo a través de la regulación de la secreción de FGF8. Un estudio *in vitro* demuestra que FGF8 es suficiente para modificar los patrones de expresión de *Xbf-1*, un factor de transcripción específico del telencéfalo (Fletcher, Baker, and Harland 2006). Al respecto se encontró una doble función de *Xbf-1*, ya que a altas concentraciones actúa como represor transcripcional, mientras que a bajas concentraciones actúa como activador de la neurogénesis (Eagleson and Dempewolf 2002). La zona limitante intratálamica se encuentra entre la zona secundaria prosencéfalo (o telencéfalo) y diencéfalo y por la secreción FGF, Shh y los miembros de la familia Wnt participan en la diferenciación del tálamo y pretálamo (Crespo-Enriquez et al. 2012; Kiecker and Lumsden 2004).

Finalmente, el organizador Ístmico (ISO) es uno de los centros organizadores más estudiados, se ubica en el límite entre el mesencéfalo-rombencéfalo. Es responsable de la diferenciación del mesencéfalo (neuronas dopaminérgicas) y el rombencéfalo anterior (cerebelo y neuronas serotoninérgicas) (Nakamura et al. 2005). Estudios de injerto de ISO en el rombencéfalo posterior han demostrado la capacidad de producir tejido cerebeloso ectópico confirmando su rol como centro organizador (Echevarría et al. 2003). Estudios *in vitro*, mediante el uso de perlas empapadas de FGF8 producen efectos similares a los estudios de injertos,

demostrando que la señalización de FGF8 es requerida para regular el crecimiento y regionalización del área (Joyner, Liu, and Millet 2000; Pera et al. 2002).



**Figura 5.** Representación de los centros organizadores secundarios y las moléculas de señalización secretadas en el modelo prosomérico.

El modelo prosomérico divide la región anterior del tubo neural en secciones que darán origen a distintas estructuras del cerebro adulto. La representación lateral del tubo neural(A)

anterior destaca los centros organizadores secundarios desde donde se secretan moléculas que actúan a través de un gradiente de concentración para especificar el destino celular de las diferentes regiones. Los centros organizadores secundarios (B) están delimitados por la expresión diferencial de factores de transcripción. El prosomero 1 muestra una expresión diferencial de factores de transcripción, sin embargo, no hay ningún organizador secundario descrito en esta región. ANR, región neural anterior; Is, Istmo; IsO, organizador ístmico; P1–P6, prosómeros; r1–r2, rombómeros; SC, ZLI, zona limitante intratalámica. Extraída de (Medina 2009).

Diversos estudios afirman que la compleja señalización de FGF y FGFR es esencial en el desarrollo cerebral temprano. A pesar de esto, las funciones únicas de cada ligando y receptor, la vía de señalización intracelular activada y los reguladores no han sido del todo establecidos. Sumado a esto, tanto los ligandos como los receptores pueden expresar isoformas tejido-específicas lo que hace aún más compleja la caracterización, además estudios recientes han demostrado que la señalización es redundante y compensatoria e incluso es susceptible a la potenciación por otros receptores (Itoh and Ornitz 2004; Ivanova et al. 2016; Touat et al. 2015).

#### **1.4 Rol de FGFs y FGFRs en el desarrollo del cerebro en estadios tempranos**

Diversos estudios han revelado el rol crítico de la señalización de FGF y FGFRs en procesos celulares fundamentales como proliferación, diferenciación y neurogénesis durante el desarrollo embrionario en diferentes etapas y modelos animales (Fletcher et al. 2006; Mason 2007; Simon and Hadjantonakis 2018; Zhang et al. 2006). Por ejemplo, durante etapas tempranas del desarrollo esta familia regula eventos migratorios claves, actuando como quimioatrayente o repelente (Guillemot and Zimmer 2011; Shirasaki et al. 2006). Diversos estudios destacan el

rol de la señalización de FGF en la formación del endodermo, inducción del mesodermo y especificación del ectodermo (Alvarez, Araujo, and Nieto 1998; Dorey and Amaya 2010a, 2010b; Johnson and Williams 1992; Poulain et al. 2006; Storey et al. 1998; Streit et al. 2000; Yamanaka, Lanner, and Rossant 2010). Al respecto, estudios en embriones de pollos mostraron que la aplicación de perlas impregnadas con FGF2 o FGF4 en estadios temprano (HH4) tienen la capacidad de inducir estructuras neurales ectópicas con expresión de marcadores posicionales neurales (Martín et al. 2006).

Además, se ha descrito que la señalización de FGF es esencial durante la formación de la corteza cerebral. Estudios de pérdida y ganancia de función usando mutaciones hipomórficas han demostrado que FGF regula el tamaño del telencéfalo, donde la pérdida total de FGF8 muestra una disminución del volumen con respecto al control, indicando que FGF8 regula al alza la proliferación celular y reduce la apoptosis (Storm et al. 2006). Adicionalmente, la eliminación de FGF3 no muestra cambios aparentes, sin embargo, la eliminación en conjunto con FGF8 lleva a una disminución del tamaño del telencéfalo mayor que cuando se inhibe FGF8 solo, indicando que FGF3 tendría una función sinérgica con FGF8 en el telencéfalo (Theil, Dominguez-Frutos, and Schimmang 2008). Al respecto, se sugiere que FGF8 tiene un papel dominante durante el desarrollo del cerebro anterior en ratas, mientras que la expresión de otros ligandos de FGF (FGF3, FGF17, FGF15) es restringida en el tiempo y actúa de forma redundante.

También se han descrito funciones de FGF en la formación de pliegues corticales en las primeras etapas posnatales, mostrando que la inhibición de FGFR3 regula a

la baja el plegamiento cortical y la producción de células precursoras neurales en la zona subventricular, mientras que la sobreexpresión recupera la morfología cortical (Matsumoto et al. 2017).

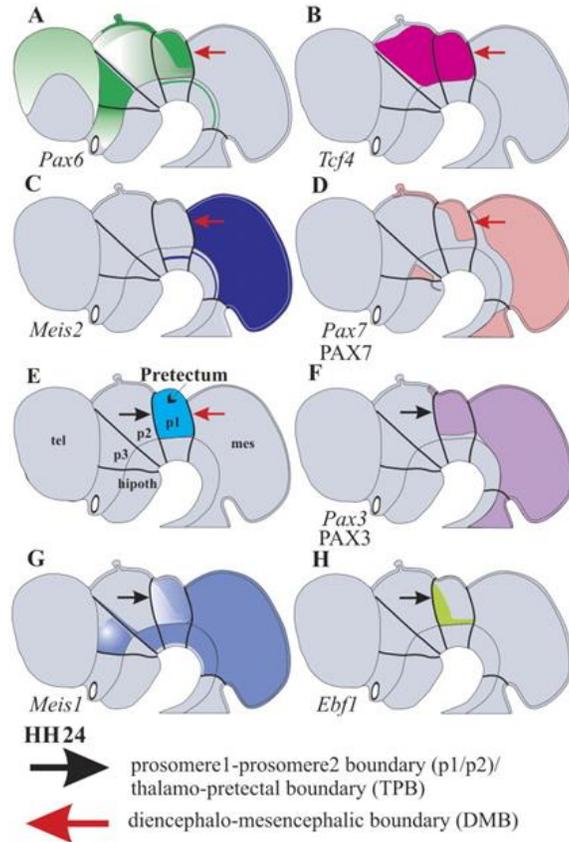
Por otro lado, se ha demostrado la presencia de FGF2 en el LCR<sub>e</sub> de pollo. Demostrando tanto *in vivo* como *in vitro* que la señalización de FGF regula el comportamiento de las células neuroepiteliales, en específico, la proliferación celular y neurogénesis (Martín et al. 2006).

Un estudio similar realizado en ratas demuestra la presencia de FGF2 en el LCR<sub>e</sub>, demostrando su origen neural mediante ensayos de inmunohistoquímica, donde se encontró que el neuroepitelio mesencefálico localizado en la zona apical del ventrículo en contacto con el LCR<sub>e</sub> contenía gránulos con FGF2 en su interior (Lamus et al. 2020).

### **1.5 OSC como organizador cerebral**

Los centros organizadores cerebrales descritos a la fecha se caracterizan por ubicarse en la zona dorsal de regiones donde se produce una constricción de las vesículas cerebrales. De esta forma, la ZLI se encuentra en el límite entre el telencéfalo y el diencéfalo, y el ISO entre el mesencéfalo y el rombencéfalo (Fig. 5). Un elemento por destacar es que hasta la fecha no se ha descrito un centro organizador entre el diencéfalo y el mesencéfalo, a pesar de que se ha descrito la expresión diferencial de diversos factores de transcripción relacionados con morfogénesis en dicha zona (figura 6).

La región dorsal que limita el diencéfalo posterior (prosómero 1) y el mesencéfalo se denomina órgano subcomisural (OSC) (Guerra et al. 2015; Sepúlveda et al. 2021), debido a que sus células neuroepiteliales se ubican por debajo de la comisura posterior. El OSC es la primera glándula cerebral en diferenciarse, y sus células tiene morfología de glía radial, con largos procesos que contactan a los capilares locales y al espacio subaracnoideo, mientras que el polo apical se comunica con el líquido cefalorraquídeo del tercer ventrículo, lo que permite a las células evaluar su composición. Al respecto, se han descrito un gran número de receptores presente en el OSC, por ejemplo, receptores para leptina, estrógeno (Cecilia et al. 2006) adenosina, imidazolina, glucocorticoides, mineralocorticoides (Nürnberg and Schöniger 2001). Adicionalmente, el OSC secreta moléculas como OSC-espondina (Vera et al. 2013) y transtiretina (Montecinos et al. 2005).



**Figura 6.** Patrones de expresión de factores de transcripción en primordios cerebrales.

Representación gráfica de los patrones de expresión de los factores de transcripción identificados en el prosomero 1 en diferentes estadios embrionarios. cabe destacar que el prosomero 1 (panel E) se encuentra definida desde el límite con el prosomero 2 por Pax3, mientras que por el mesencéfalo se halla limitado por Pax6 y Tcf4.

El OSC secreta OSC-espondina, una glicoproteína de gran tamaño que destaca por sus funciones en morfogénesis y guía axonal (Stanic et al. 2014; Vera et al. 2013, 2015). Estudios *in vitro*, demuestran que péptidos de OSC regulan la diferenciación del neuroepitelio y la supervivencia celular (Meiniel 2001; Monnerie, Dastugue, and Meiniel 1997). Análisis de inhibición de OSC-espondina en las etapas iniciales del desarrollo embrionario de pollo revelaron severas malformaciones encefálicas,

incluyendo ausencia del OSC, la glándula pineal, aberraciones en la guía de axones y ausencia de desarrollo neuronal en el mesencéfalo (Vera et al. 2013).

Por otro lado, el factor de transcripción *Pax6* (figura 6) es expresado en regiones específicas del diencefalo, en concreto las células gliales secretoras del OSC. La pérdida de *Pax6* lleva a aberraciones en la formación del OSC, la comisura posterior (CP) y la glándula pineal (Estivill-Torrús et al. 2001), lo que sugiere que la formación del OSC podría influir en el desarrollo de la CP. Como se ha demostrado en estudios previos, la OSC-espondina promueve el crecimiento de neuritas (Meinzel 2001; Sakka et al. 2014), regulación que se podría dar en la CP. En conjunto con *Pax6* en el límite entre el diencefalo y el mesencéfalo se expresa otro factor, *Msx1* (Estivill-torrús et al. 2001; Fernández-Llebrez et al. 2004). Los mutantes dobles de *Msx1* mostraron alteraciones similares a las observadas en los mutantes para *Pax6* y, además, presentaron colapso del acueducto generando animales con hidrocefalia (Fernández-Llebrez et al. 2004).

Además de las consideraciones anatómicas y la presencia de factores de transcripción, la función del OSC como centro organizador cerebral se ve apoyada por un análisis de hibridación *in situ*, en donde se observó la expresión de los FGFR1, FGFR2 y FGFR3 en todo el cerebro, mientras que la expresión de FGFR4 es restringida a la habénula medial y el órgano subcomisural (Hultman et al. 2019). Adicionalmente un estudio transcriptómico del OSC durante el desarrollo llevado a cabo en nuestro laboratorio (Farkas et al. 2022), reveló la presencia de diversos factores de crecimiento, factores neurogénicos y moléculas involucradas en la guía axonal. Como análisis preliminares a este estudio, se evaluó la presencia de la vía

de señalización de FGF en el OSC en *G. gallus*. En este se confirmó la expresión de los receptores de FGF, lo que permitió identificar los cuatro receptores y al menos 13 ligandos además de correceptores y proteínas implicadas en la regulación de la vía de señalización, generando alrededor de 18 pares ligandos-receptor, lo que sugiere una compleja señalización de FGF en OSC.

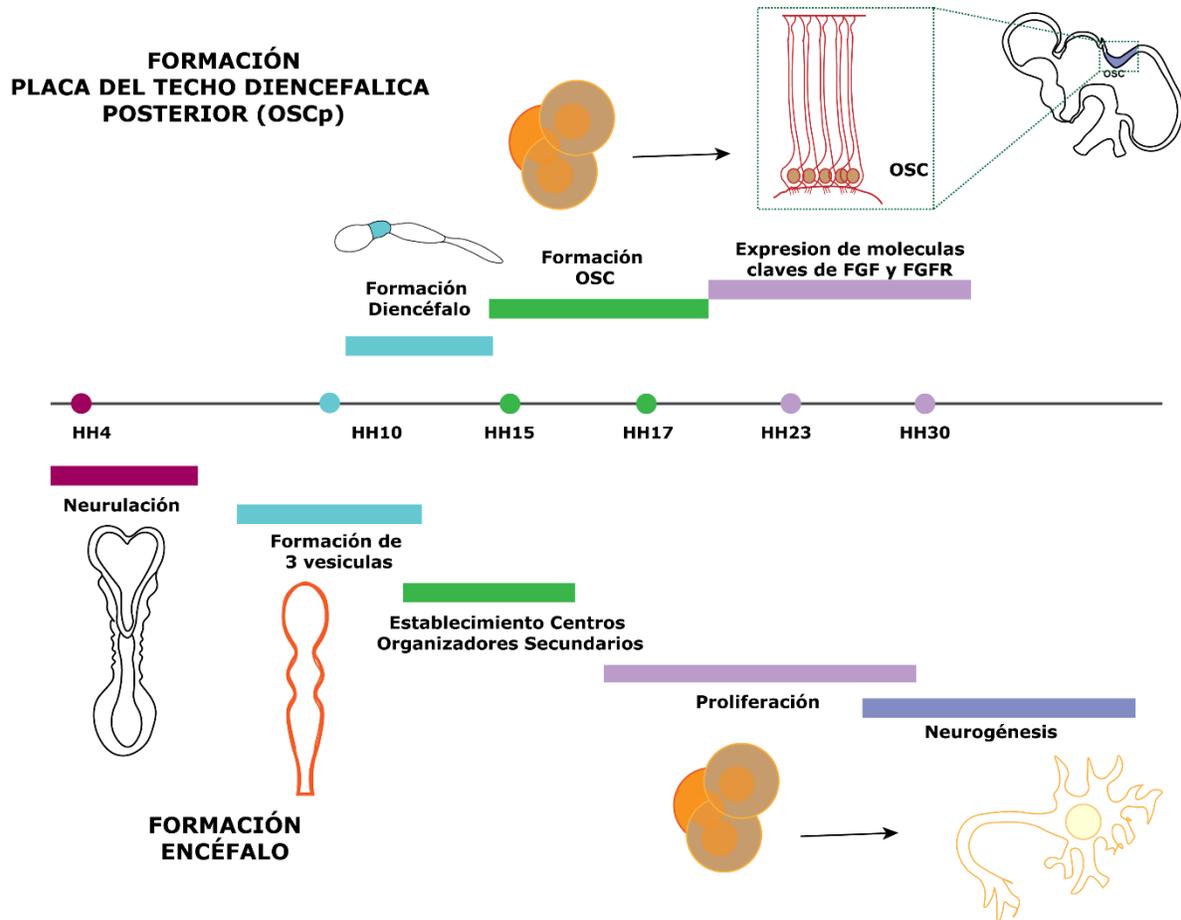
Estos antecedentes demuestran que el correcto desarrollo del OSC es crucial, lo que unido a su posición anatómica y la expresión diferencial de diversos factores de transcripción sugieren que se podría tratar de un centro de diferenciación cerebral encargado de la correcta formación del techo diencefálico (fig. 7).

Esta tesis consta de dos secciones, I) la caracterización del transcriptoma del OSC en dos momentos del desarrollo y II) la caracterización de la expresión de la familia de FGFs y FGFRs en el OSC en dichos estadios.

Los momentos del desarrollo elegidos para su análisis se basan en que constituyen momentos claves en donde el OSC incrementa su tamaño (HH23, 4d) y donde se da un proceso de diferenciación con una CP bien establecida (HH30, 7d). Para facilitar la comprensión del porqué se han elegido estos dos estadios, se construyó una línea de tiempo que muestra en paralelo el desarrollo del OSC y del cerebro (fig. 7).

Por otro lado, se utilizó una segunda aproximación para la caracterización del transcriptoma para lo que se utilizó data depositada en bases de datos públicas del NCBI de muestras de cerebro completo de *G. gallus* en estadio HH23 (7d). Estas muestras fueron utilizadas para comparar el OSC en el mismo estadio (7d), con el

fin de identificar procesos ontológicos enriquecidos exclusivamente en el OSC y no en el cerebro.



**Figura 7.** Representación gráfica de eventos clave en el desarrollo cerebral embrionario de *G. gallus*.

*G. gallus*, el modelo de estudio tiene un desarrollo cerebral altamente conservado (Gobron et al. 1999; Meiniel and Meiniel 2007) . Los hitos claves en el desarrollo cerebral son plasmados en esta línea de tiempo ordenada según los estadios de desarrollo de Hamburger & Hamilton. Nuestros análisis como laboratorio se centran en los estadios HH23 y HH30, donde predomina la proliferación y diferenciación celular, respectivamente.

## 2 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS DEL TRABAJO

### 2.1 Hipótesis

La placa del techo diencefálica caudal (primordio del OSC) expresa moléculas clásicas de los organizadores secundarios cerebrales (como BMP, WNT y FGF).

Objetivo general

Analizar la expresión de la vía de señalización de FGF y FGFR en el OSC durante el desarrollo embrionario temprano.

### 2.2 Objetivos específicos

**Objetivo 1: Caracterizar el transcriptoma del OSC en los estadios HH23 y HH30.**

- 1.1 Analizar, ensamblar y anotar la data de RNA-seq de OSC de *G. gallus* en los estadios HH23 y HH30
- 1.2 Identificar y analizar la expresión diferencial de moléculas clásicas relacionadas con organizadores secundarios cerebrales (como FGF, WNT y SHH) en el transcriptoma de OSC.
- 1.3 Validar data de RNA-seq.

**Objetivo 2: Identificar la presencia de FGFR en el OSC durante el desarrollo embrionario temprano.**

- 2.1 Analizar la expresión proteica de los miembros de la familia de FGFR en la OSC en los estadios HH23 y HH30.

**Objetivo 3: Determinar la localización de los FGFR en el OSC durante el desarrollo embrionario temprano.**

- 3.1 Caracterizar el patrón de expresión de FGFR en el OSC en los estadios HH23 y HH30.

### **3 MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1 Modelo de investigación**

Como modelo de estudio se utilizaron embriones de *Gallus gallus*, los cuales fueron obtenidos de huevos de campo local incubados a 37°C (incubadora Lab Tech, Modelo Lib – 080M, Korea) hasta alcanzar los estadios según la clasificación de Hamburger & Hamilton (Hamburger and Hamilton 1951). Los procedimientos se realizaron acorde al comité de Ética de la Universidad de Concepción.

#### **3.2 Extracción de ARN**

Se disecaron los OSC de embriones de *Gallus gallus* en solución salina tamponada con fosfato (PBS) fría, en las etapas de Hamburger-Hamilton (HH) requeridas. El ARN total fue aislado con el RNeasy Mini Kit (QIAGEN). La concentración y la calidad del ARN se midieron con el kit de ensayo HS de ARN Qubit™ (Número de catálogo: Q32852). Los valores RIN entre 8,8 y 9,5 por muestra. Las muestras fueron almacenadas a -80°C hasta su uso.

#### **3.3 Secuenciación**

Se realizó un análisis transcriptómico de OSC de *Gallus gallus* en los estadios HH23 y HH30 secuenciado mediante la tecnología Illumina (basado en lecturas cortas de ~150 pb) y PacBio (basado en lecturas largas entre 500 and  $\geq 10000$  pares de bases, long output y high output). Brevemente, se disecaron 25 OSC de pollos en estadios HH23 y HH25. El ARN total fue extraído utilizando RNeasy Mini Kit (QIAGEN). Las cuatro bibliotecas de isoformas PacBio RSII se construyeron usando 2  $\mu$ g de ARN total de HH23 (n = 2) y HH30 (n = 2) OSC (Cold Spring Laboratorio Harbor, Plataforma Genómica, EE. UU.). La secuenciación se realizó utilizando el

protocolo IsoSeq (Pacific Biosciences) con tamaños de enriquecimiento de biblioteca estándar y larga (>4 kb) para cada estadio. Las bibliotecas de Illumina TruSeq se prepararon (dos réplicas por muestra) y secuenciadas en una salida intermedia NextSeq Paired-End de 150 pb (Cold Spring Harbor Laboratory, Genomic Platform, USA). Los conjuntos de datos de secuenciación de ARN de PacBio e Illumina se encuentran disponibles en el Archivo Europeo de Nucleótidos (ENA) Número de acceso PRJEB36569 (PacBio) y PRJEB36584 (Illumina).

### **3.4 Análisis de la data de secuenciación de ARN**

#### **3.4.1 Alineamiento**

Las lecturas de PacBio se alinearon con el genoma de *Gallus gallus* (bGalGal1 maternal broiler GRCg7b, ensamblaje GenBank GCA\_016699485.1) usando el alineador minimap2 (Li 2018) obteniendo una cobertura de secuenciación de ~ 34x al transcriptoma. Los adaptadores TruSeq de Illumina desde dichas lecturas se recortaron automáticamente usando la herramienta FASTP (Chen et al. 2018) y se alinearon contra el transcriptoma de *Gallus gallus* utilizando el alineador splice-aware HISAT2 (Kim et al. 2019) obteniendo profundidades de ~ 10x.

Las lecturas Illumina de cerebro completo de embriones de pollo en estadio HH30 fueron descargadas desde Sequence Read Archive (SRA) del NCBI bajo los códigos SRR6396658 y SRR6396656 para la muestra uno y dos, respectivamente. El procesamiento de las muestras fue el mismo que se utilizó para las otras muestras Illumina.

Los archivos de salida BAM fueron ordenados e indexados utilizando SAMtools (Danecek et al. 2021) y posteriormente unidas mediante la función SAMtools merge.

### **3.4.2 Cuantificación de la expresión de ARNm**

Los archivos BAM indexados se utilizaron para cuantificar las lecturas mapeadas contra los exones usando programa FeatureCounts del paquete RSubread (Liao, Smyth, and Shi 2019). Para la construcción de la tabla de conteo, se utilizaron comandos de UNIX en la terminal con el fin de eliminar las filas asociadas a características del gen.

Para el análisis de expresión diferencial se utilizó el programa R con los paquetes de Deseq2 (Love, Huber, and Anders 2014), EnhancedVolcano (<https://github.com/kevinblighe/EnhancedVolcano>).

### **3.4.3 Análisis de enriquecimiento funcional**

Para el análisis de ontología génica (GO) se utilizó el paquete de R clusterprofile (Yu G et al., 2012), donde se realizó el análisis de enriquecimiento estadísticamente significativo sobre el tamaño muestral de genes representados por cada GO, considerando proceso biológico (BP), componente celular (CC) y función molecular (MF). Para ello, se seleccionaron los genes diferencialmente expresados en el estadio HH23 y HH30 de OSCp. Para la visualización se realizaron *sankey plots* donde agrupan los genes asociados a cierta característica GO mediante conectores gráficos, considerando el valor GeneRatio que entrega el recuento de genes asociados a una característica GO comparada con la lista completa de genes anotados en dicho GO (background), a modo de normalización.

## **3.5 Síntesis de cDNA**

La síntesis de cDNA se realizó con el kit comercial M-MLV Reverse Transcriptase (Promega). Se preparó la primera mezcla con 2 µg de ARN total; 1 µL de una

dilución 1:10 de oligo dT y agua grado biología molecular hasta completar 15  $\mu\text{L}$  de volumen final. El ARN se desnaturalizó durante 5 minutos a  $70^{\circ}\text{C}$  y se enfrió en hielo por 5 minutos. La segunda mezcla se preparó con 4  $\mu\text{L}$  de tampón 5X M-MLV buffer 5x, 1  $\mu\text{L}$  de enzima transcriptasa reversa M-MLV, mas 2  $\mu\text{L}$  de dNTPs (10 mM) hasta completar 10  $\mu\text{L}$  de volumen final. A esta segunda mezcla se le agregó la primera que contenía el ARN. Una vez unidas las dos mezclas, se realizó un ciclo de extensión en termociclador a  $42^{\circ}\text{C}$  por 60 minutos y  $65^{\circ}\text{C}$  por 15 minutos (inactivación de la transcriptasa inversa). Los ADN complementarios (ADNc) obtenidos desde la retrotranscripción se guardaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización.

### **3.6 PCR convencional**

Para la identificación de las isoformas de FGFR se realizó una PCR, para ello se alinearon las secuencias de FGFR, a partir de las cuales se diseñaron primarios específicos para las moléculas FGFR presentadas en la tabla 1. La mezcla para PCR se realizó utilizando 10  $\mu\text{L}$  KAPATaq 2x ReadyMix, 0,8  $\mu\text{L}$  de primarios en concentración de 10  $\mu\text{M}$  y 1 o 2  $\mu\text{L}$  del producto de transcripción reversa, en un volumen final de 20  $\mu\text{L}$ . Se realizó una desnaturalización inicial a  $95^{\circ}\text{C}$  por 5 minutos, y luego se realizaron 35 ciclos de  $95^{\circ}\text{C}$  por 30 segundos, el alineamiento se realizó a  $60^{\circ}\text{C}$  por 30 segundos, por último, una extensión de  $72^{\circ}\text{C}$  por 60 segundos. La extensión final se realizó  $72^{\circ}\text{C}$  por 5 minutos. Todos los cDNAs utilizados fueron probados con primarios específicos para  $\beta$ -Actina y GAPDH.

Partidor	Secuencia	Tamaño esperado
FGFR1B_FORWARD	5'- CATCGGCCCATCCTGCAGG-3'	170 pb
FGFR1B_REVERSE	5'-TGCACGTAGGGCAAGTTGTC-3'	
FGFR1C_FORWARD	5'-GATCCTGAAGACGGCTGGCG-3'	165 pb
FGFR1C_REVERSE	5'-TGCTCAGTAGCTTCGAGAACT-3'	
FGFR2B_FORWARD	5'- GCTGCCGGTGTTAACTACTAC-3'	473 pb
FGFR2B_REVERSE	5'-TTTGGGTCCTCTGGCAGTTC-3'	
FGFR2C_FORWARD	5'-GGTCTTCCTGATCGCTGCA-3'	388 pb
FGFR2C_REVERSE	5'-AGTCACTGCTTCTTTGGGCC-3'	
FGFR3B_FORWARD	5'-CAGAGGAGCTGATGGAAATG-3'	396 pb
FGFR3BC_REVERSE	5'-CTTCCGCCATCACCCTTGG-3'	
FGFR3C_FORWARD	5'-CAGGTCTCGTTGGAGTCCAA-3'	208 pb

**Tabla 1.** Secuencia de partidores para isoformas de FGFR

### 3.7 PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR)

Se realizó un qPCR con el fin de validar los datos de RNA-seq proveniente de la muestra de OSCp. Para la obtención del producto de qPCR se diseñaron partidores específicos para las moléculas FGFR presentadas en la tabla 2. Se realizaron reacciones de qPCR con el kit KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix 2X (Kapa Biociencias) con concentraciones de partidores de 0,4  $\mu$ M y 1 o 2  $\mu$ l del producto de transcripción reversa, en un volumen final de 20  $\mu$ L. Para todas las reacciones de qPCR, se realizó una desnaturalización inicial a 95°C por 3 min, luego 40 ciclos con

95°C por 5s para la desnaturalización y 60°C por 20s de hibridación/extensión. La curva de fusión indica que no hay amplificación de productos inespecíficos.

<b>Partidor</b>	<b>Secuencia</b>	<b>Tamaño esperado</b>
FGFR1_FORWARD	5'-CAGCAGATTCCAGCTCCTCC- 3'	112 pb
FGFR1_REVERSE	5'-GTCTCCGAGTCTGAGCTGCC- 3'	
FGFR3_FORWARD	5'- CAGCAGGTGTCGTTGGAGTC-3'	96 pb
FGFR3_REVERSE	5'-TTCCAGCTCAGAGACGTTGG- 3'	
GAPDH_FORWARD	5'-GGCACTGTCCCCATTTG-3'	144 pb
GAPDH_REVERSE	5'-CACCTGCATCTGCCCATG-3'	

**Tabla 2.** Secuencia de partidores para validación RNA-seq.

### **3.8 Manejo de muestras histológicas**

#### **3.8.1 Procesamiento de muestras**

Los embriones extraídos en el estadio deseado fueron fijados en Carnoy (60% alcohol absoluto + 30% Cloroformo + 10% Ácido acético glacial) por 24h. Las muestras fueron lavadas en alcohol 100% y seguidas con el tratamiento con HistoClear I, II y III por 15, 30 y 180 min respectivamente. Posteriormente, durante la inclusión los embriones fueron orientados de manera de obtener secciones del

OSCp frontales o sagitales de 7-8  $\mu\text{m}$  con el microtomo MICROM HM 325, Thermo Scientific. Se realizo el seriado y se continuo con la desparafinación e hidratación de los cortes en HistoClear y alcoholes en concentraciones decrecientes, respectivamente. Luego se realizaron tinciones de Hematoxilina-Eosina para identificar y seleccionar las secciones pertenecientes a la zona de interés, las que fueron montados en portaobjetos previamente tratados con poli-L-lisina.

### **3.8.2 Análisis de localización de FGFR mediante inmunofluorescencia**

Con el fin de estudiar la expresión y la localización de las proteínas pertenecientes a la familia de FGFR en el OSCp se realizaron ensayos de inmunofluorescencia de cortes sagitales y frontales provenientes de embriones de *G. gallus* incluidos en parafina en diferentes estadios. 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 mins con buffer fosfato (PBS) pH 7,8 ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  8,4 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  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-x100 0,05% en cámara húmeda durante toda la noche. Los anticuerpos utilizados y sus concentraciones correspondientes se pueden observar en la tabla 3. Tras la incubación con los anticuerpos primarios nuevamente se realizaron 3 lavados de 10 mins con PBS y luego se incubaron las muestras con los anticuerpos secundarios acoplados a fluoróforos descritos en la tabla 3 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 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 primordio de ala, zona donde se ha descrito la expresión de moléculas de FGFRs (Sheeba et al. 2010a), como control positivo de la técnica se realizó una inmunohistoquímica con AFRU, anticuerpo dirigido contra la fibra de Reissner de vaca que reconoce OSC-espondina (Caprile et al. 2009). Finalmente, los cortes fueron visualizados y analizados en el microscopio Confocal Espectral LSM780 NLO, Zeiss en el Centro de Microscopía Avanzada (CMA BIO-BIO). Los datos obtenidos fueron analizados con el software ImageJ 1.45.

### **3.9 Western-blot de extractos provenientes de OSCp.**

La expresión proteica de las moléculas FGFR se analizó por Western Blot de extracto proteico obtenido de la lisis del tejido del techo diencefálico disecado de un pool de embriones en estadios de desarrollo HH23 y HH30. Los extractos fueron preparados en buffer RIPA (HCl 50 mM, NaCl 150 mM, NP-40 al 1,0 % (v/v), desoxicolato de sodio al 0,5 % (p/v), EDTA 1,0 mM, SDS al 0,1 % (p/v) y 0,01 % (p/v) de azida sódica a un pH de 7,4.) adicionando inhibidor de proteasa al 2X, posteriormente se sometió 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 G por 15 minutos a 4° C para obtener el extracto de proteínas. Por otro lado, siguiendo el mismo protocolo, se realizó extracto de primordio de alas provenientes

de embriones HH30 para utilizar como control positivo. Los extractos fueron cuantificados por método de Bradford midiendo la absorbancia a 595nm en el espectrofotómetro Eppendor Biophotometer D30. Se utilizaron 13,0 12,5µg de proteínas, las cuales fueron fraccionadas a través de electroforesis en gel de poliacrialamida al 12% por 3,5 horas a 70 V para luego ser electrotransferidas a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF) a 30 mA durante 16 horas. Posteriormente se realizó un inmunoblotting a la membrana utilizando anticuerpos específicos contra las moléculas de FGFR u OSC-espondina (tabla 3). Para corroborar que las proteínas fueron transferidas a la membrana, previo a la incubación con el anticuerpo se realizaron tinciones con rojo Ponceau [5%]. 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 y 3% leche descremada. Tras 3 lavados de 15 minutos con TBS Tween, se incubo con el anticuerpo secundario asociado a Peroxidasa de Rábano (HRP) por dos horas. Pasado el tiempo de incubación, se realizaron 5 lavados de 5min con TBS-Tween 20 por 5min c/u. Se reveló con sustrato quimioluminiscente (Western Lightning® PlusECL, PerkinElmer) y las membranas se observaron en un fotodocumentador I-Bright de Thermofisher. Se utilizó como control de carga un anticuerpo comercial contra  $\alpha$ -actina de pollo.

<b>ANTICUERPO (Antígeno)</b>	<b>TIPO</b>	<b>DILUCIÓN</b>	<b>PROCEDENCIA</b>
----------------------------------	-------------	-----------------	--------------------

<b>ANTICUERPOS PRIMARIOS</b>				
NCAM	Monoclonal de ratón	de	IF: 1:2	DSHB
AFRU11 (OSC-espondina)	Policlonal de conejo	de	IF: 1:250	Donación Dr. Rodriguez
Tuj1 (Neuron-specific Tubulin $\beta$ III)	Monoclonal de ratón	de	IF: 1:200	R&D Systems, Inc.
$\alpha$ -FGFR1 (VBS-7)	Monoclonal de ratón	de	IF: 1:100 WB: 1:100	Invitrogen
$\alpha$ -FGFR2 (JM10-60)	Monoclonal de conejo	de	WB: 1:100	Invitrogen
$\alpha$ -FGFR3 (JM110-33)	Monoclonal de conejo	de	IF: 1:300 WB: 1:500	Invitrogen
$\alpha$ -FGFR4/CD334	Policlonal de conejo	de	IF: 1:300 WB: 1:500	Invitrogen
<b>ANTICUERPOS SECUNDARIOS</b>				
Anti-IgG Conejo Alexa fluor 488	Anticuerpo de Cabra	de	IF: 1:300	Invitrogen
Anti-IgG Ratón Alexa fluor 555	Anticuerpo de Cabra	de	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
<b>OTROS MARCADORES</b>			
DAPI	360 nm excitación 460 nm emisión	IF: 1:200	Invitrogen
TOPRO-3 (marcaje nuclear)	661nm emisión 642nm excitación	IF: 1:500	Invitrogen

**Tabla 3.**Anticuerpos primarios, secundarios y otros marcadores.

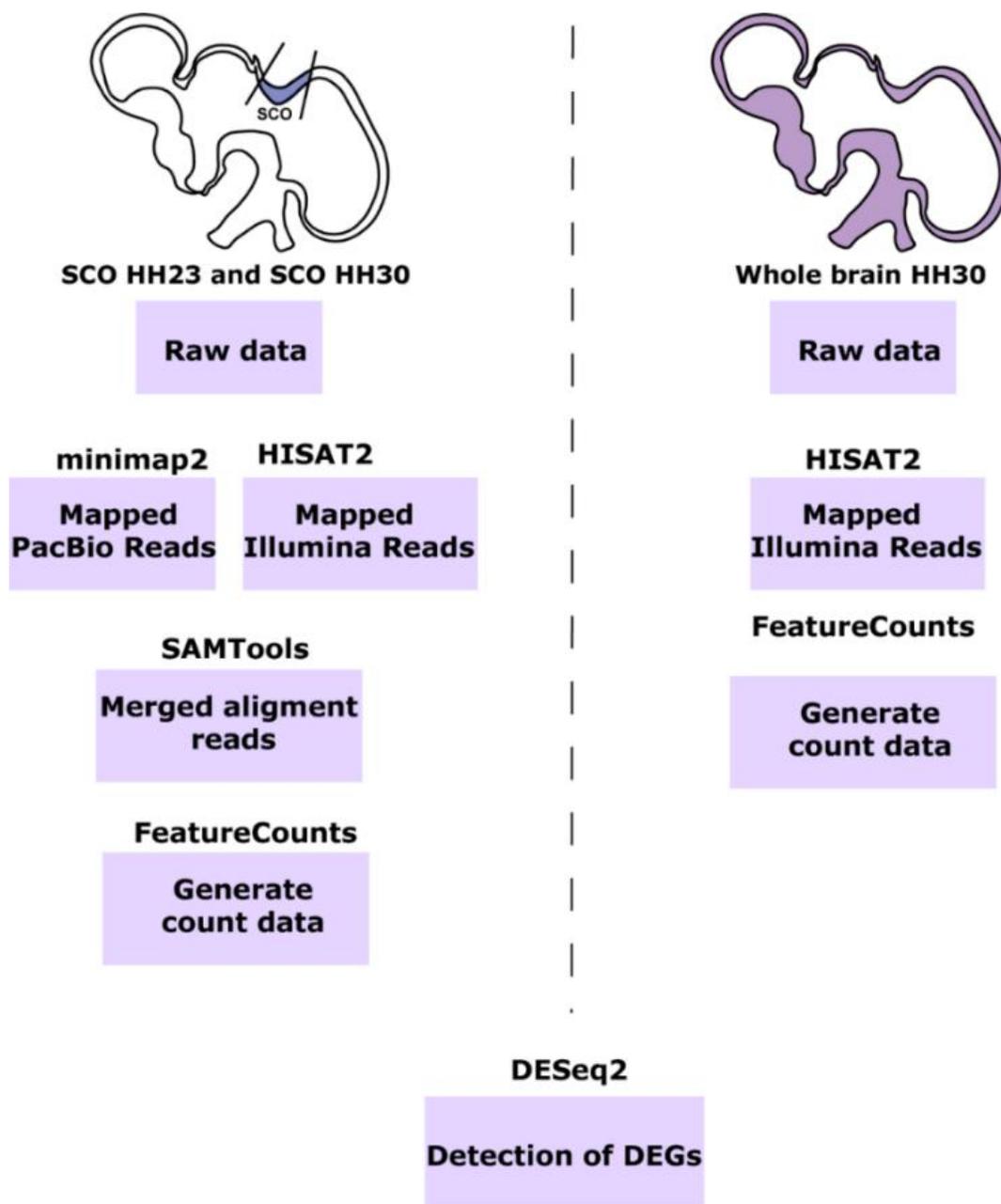
## **4 RESULTADOS**

### **4.1 Objetivo I: Caracterizar el transcriptoma de la placa del techo diencefálica caudal (OSCp) en los estadios HH23 y HH30.**

#### **4.1.1 Evaluación de calidad de datos de RNA-Seq**

Para analizar el transcriptoma del OSCp, se utilizaron los datos de RNA-seq obtenidos en nuestro laboratorio (Farkas et al., 2022) y los datos de RNA-seq de cerebro completo de embrión de pollo estadio HH30, los cuales fueron descargados desde la base de datos pública SRA de NCBI. El pipeline utilizado fue publicado por Farkas y cols, 2022 (figura 8). Las muestras fueron alineadas contra el genoma bGalgal1, publicado recientemente (09 de marzo de 2022 en assembly accession: GCF\_016699485.2) usando Hisat2, en el caso de las muestras Illumina y con minimap2 las muestras PacBio. Luego, los datos obtenidos de la secuenciación mediante PacBio e Illumina fueron mezcladas usando SAMTools, lo que nos permitió obtener una mayor cobertura y profundidad de secuenciación. Con el fin de realizar análisis de downstream, se realizó el conteo de los transcritos de las muestras por replica usando FeatureCounts. Finalmente se realizó la detección de genes diferencialmente expresados usando DESeq2.

Todos los análisis fueron llevados a cabo en el cluster del laboratorio de regulación transcripcional del edificio de Biología Molecular de la UdeC a cargo del Dr. Leonardo Gutiérrez.



**Figura 8.** Pipeline de RNA-seq utilizado.

Esquema de cerebro de embrión de pollo marcando en color violeta el OSCp (izq.) o cerebro completo (der.), región de donde se extrajo el RNA. El flujo de trabajo se basa en el descrito previamente por Farkas y colaboradores (2022) con modificaciones para incluir los datos públicos de RNA-seq. DEG: genes diferencialmente expresados, OSC: órgano subcomisural.

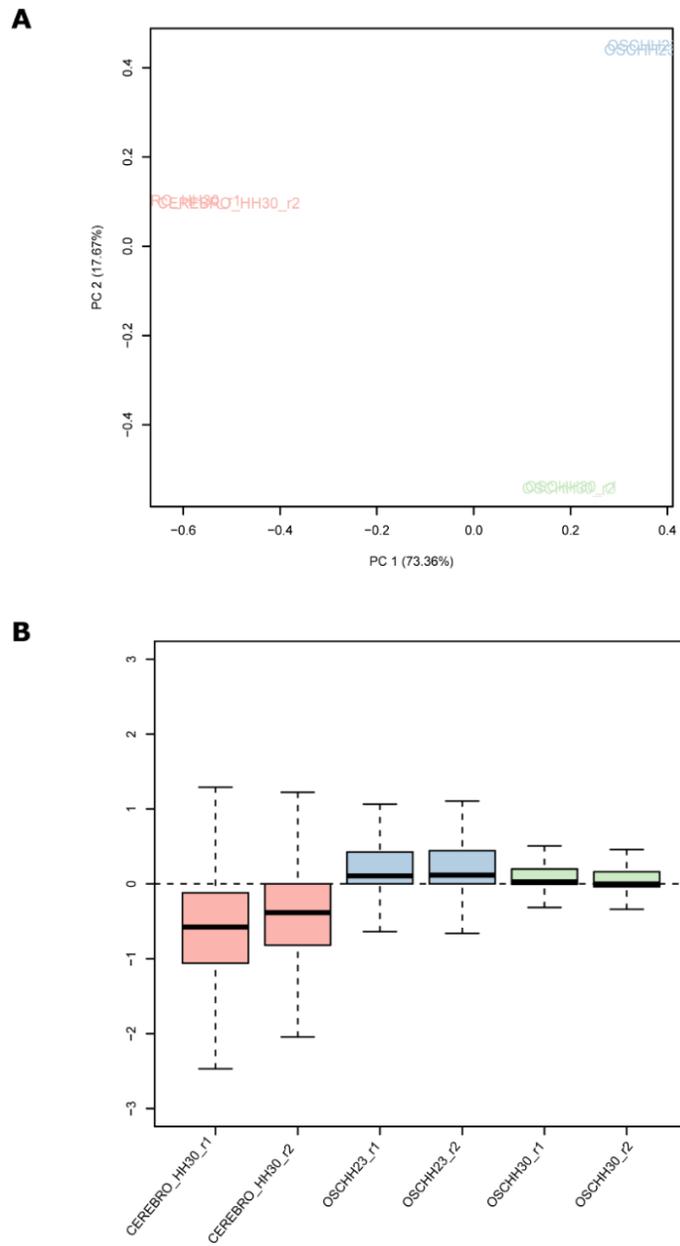
Con el fin de evaluar la calidad de las muestras, se analizó la dispersión y homogeneidad de las muestras de OSC HH23, OSC HH30 y cerebro HH30 mediante métodos de reducción de la dimensionalidad, el análisis de componentes principales (PCA) y el análisis de expresión logarítmica relativa de las lecturas alineadas (RLE). El paquete RUVSeq (Risso 2013) implementa un enfoque llamado *Remover of Unwanted Variation (RUV)*, que utiliza un conjunto de genes de control conocidos como genes de referencia para estimar y eliminar el sesgo técnico de los datos de expresión génica, en base a una heurística (método empírico, recogido de varios experimentos de RNA-seq). Esto ayuda a reducir la variación no biológica y mejorar la detección de genes diferencialmente expresados entre diferentes condiciones experimentales sin recurrir a normalización logarítmica. La figura 9 muestra el análisis de calidad de la secuenciación del ARN previo a la normalización y la figura 10, posterior a la normalización de las tres muestras utilizadas. En el gráfico de componentes principales (PCA) se observa que las muestras son heterogéneas entre ellas, es decir, las muestras OSC HH23, OSC HH30 y cerebro HH30 difieren entre ellas; mientras que las réplicas de las muestras se agrupan mostrando homogeneidad entre sus componentes, lo que demuestra un alto estándar de calidad (fig. 9 A). En este caso, no es necesario la normalización, sin embargo, se analizó la distribución de PCA que no difiere grandemente de la inicial (fig. 10 A).

Otro método de análisis es el de RLE que calcula la mediana de las diferencias logarítmicas de los conteos por gen entre las muestras y se compara con una línea de referencia, por lo general, una línea en cero. Esta línea de referencia representa

una expresión génica constante y simétrica entre las muestras. El RLE se calcula para cada gen individualmente y se representa en forma de gráfico. El gráfico de RLE para las tres muestras, OSC HH23, HH30 y cerebro HH30 (fig. 9 B), muestra en el eje X los genes agrupados por muestras y en el eje Y indica la desviación estándar por muestra. Se observa que los promedios de las réplicas de OSC se encuentran en la línea horizontal 0, con desviaciones estándar de ( $\pm 2$ ). Sin embargo, las muestras de cerebro completo se encuentran bajo la media de la expresión relativa total, por lo tanto, se hace necesaria la normalización. Luego de la normalización, tanto las muestras de cerebro como de OSC muestran una variación menor a 1 unidad (fig. 10 B).

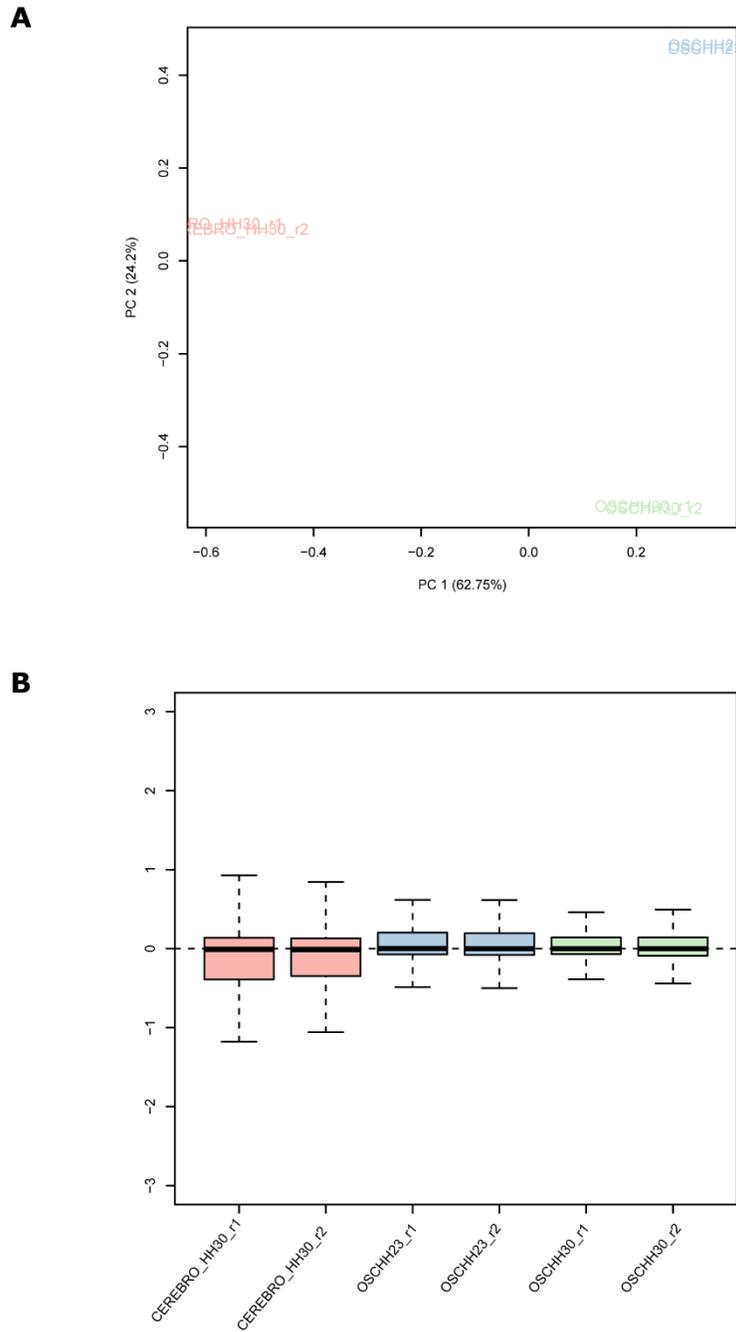
Luego de la normalización con RUVSeq (fig. 10) los datos de las 3 muestras muestran una distribución altamente heterogénea entre ellas y al mismo tiempo altamente homogéneas entre sus réplicas, indicando que el análisis de expresión diferencial no presentará sesgos.

Los indicadores de calidad de Q30 fueron mayores al 90 %, y los rangos de mapeos de las muestras fueron mayores al 91 % para todas las muestras, lo que indica en conjunto que la calidad de las muestras es óptima para el desarrollo de esta tesis.



**Figura 9.** Análisis de Calidad de RNA-seq previo a la normalización usando RUVseq.

El grafico A) corresponde análisis de componentes principales (PCA) donde las muestras de OSC HH23, OSC HH30 y cerebro HH30 se disponen en diferentes cuadrantes de acuerdo con sus componentes, mientras que las réplicas se agrupan según su muestra. El grafico B) corresponde al análisis de RLE para las tres muestras con sus réplicas. Se observa una desviación estándar mayor y dispersión de los datos mayor en las muestras de cerebro HH30, seguida por la muestra de OSC HH23.



**Figura 10.** Análisis de Calidad de RNA-seq luego de la normalización usando RUVseq.

El grafico A) corresponde análisis de PCA luego de la normalización, sin embargo, este parámetro no vario con respecto al no normalizado. El grafico B) corresponde al análisis de RLE post- normalización. La desviación estándar y dispersión de los datos se normaliza a valores de  $\pm 1$  en todas las muestras.

#### 4.1.2 Análisis de Expresión Diferencial

El análisis de expresión diferencial permite detectar aquellos genes que son diferencialmente expresados en una condición con respecto a otra. Para el análisis de expresión diferencial, se escogieron dos aproximaciones ya que no existe data pública disponible de *G. gallus* de cerebro en estadio HH23 que nos permita comparar con OSC HH23 y por otro lado, las muestras de OSC HH23 y cerebro completo HH30 no son comparables, por lo tanto, se analizaron las 3 muestras de dos formas. La primera es realizando un análisis de expresión diferencial de OSC HH23 y OSC HH30 con el objetivo de evaluar los cambios en la expresión génica en el mismo tejido (fig. 11). Como segunda aproximación y con el fin de conocer la expresión diferencial de genes en el OSC HH30, se comparó con tejido del cerebro en el mismo estadio (fig. 13). Siguiendo con estas dos aproximaciones se analizó la ontología génica de los genes diferencialmente expresados (fig. 15).

Para evaluar la expresión diferencial se realizó un conteo de lecturas identificadas para cada gen en cada una de las muestras, utilizando la librería FeatureCounts del paquete SubRead (Liao et al. 2019). Una vez obtenidos los conteos para cada muestra, se continuó con el análisis en R (<https://www.r-studio.com/es/>) donde se utilizó el paquete Deseq2 (Love et al. 2014) que normaliza usando el método FDR (Benjamini and Hochberg 1995).

### Conteo de Genes



**OSC HH23**

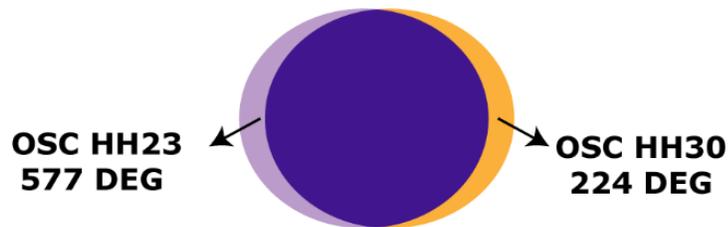


**OSC HH30**



**Cerebro HH30**

### Análisis de Expresión Diferencial



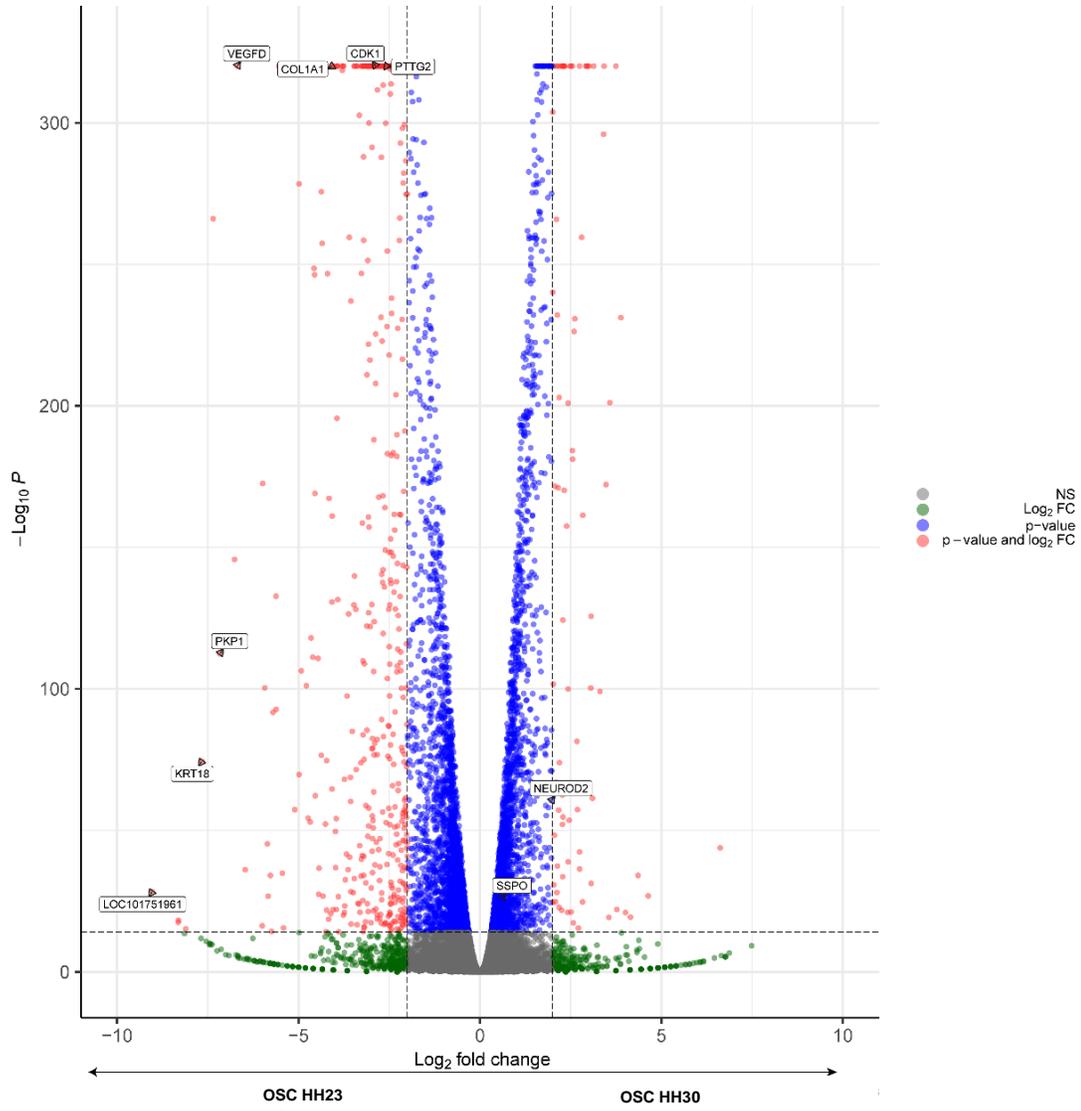
### **Figura 11.** Diagrama de Ven de genes diferencialmente expresados en el OSC.

Panel superior: círculos representan las listas de conteos por muestras obtenidos mediante FeatureCounts. Panel inferior: Análisis de expresión diferencial usando DESeq2, donde se muestra el número de genes diferencialmente expresados en el OSC HH23 en comparación con OSC HH30. Los parámetros excluyentes son que el logaritmo de la tasa de cambio sea mayor que 2 ( $\log_{2}FC > 2$ ), es decir que el cambio sea dos veces mayor con respecto a una condición y que el p-value ajustado ser menor que 0.05 (adjusted p-value < 0.05). DEG: genes diferencialmente expresados, OSC: órgano subcomisural. Número de genes por muestra: 19092.

Para la primera aproximación, se realizó el análisis de expresión diferencial para lo que se utilizaron los conteos de las muestras de OSC HH23 y OSC HH30 (Anexo 1- Tabla 1), donde se obtuvieron los genes diferencialmente expresados (DEG) en el OSC HH23 y OSC HH30 (fig. 11). Del total de 19092 genes de OSC alineados contra el genoma bGalgal1, se obtuvieron 577 genes diferencialmente expresados

al alza en el OSC HH23 y 224 regulados al alza en OSC HH30 (fig. 11, Anexo1-Tabla 2 y 3, respectivamente).

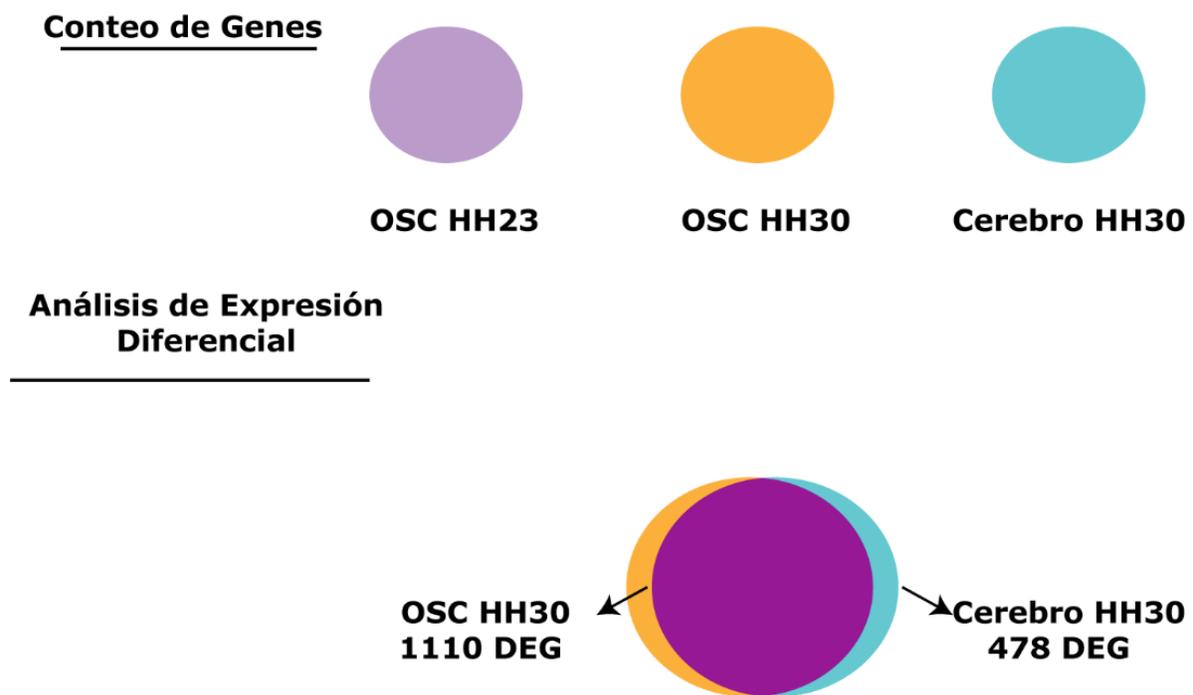
A partir de estos DEG, se realizó un volcano plot, el cual entrega información con respecto a parámetros como la tasa de cambio ( $\log_2FC$ ) y confiabilidad (FDR) del gen analizado. El volcano plot (fig. 12) se divide en seis cuadrantes, y en cuatro colores, donde cada punto representa la expresión de un gen en específico. Los cuadrantes ubicados en la zona superior izquierda y derecha en color rojo (valores de  $\log_2FC$  negativos y positivos), representan los DEG expresados en el estadio HH23 y en HH30, respectivamente. Los cuadrantes inferiores izquierdo y derecho, en color verde, representa aquellos genes que cumplen con la condición de que su tasa de cambio es mayor a dos, sin embargo, su significancia estadística es menor a la establecida. En la región derecha, en color rojo, se encuentran aquellos genes en que ambos parámetros ( $\log_2FC$  y FDR) son válidos. Esto mismo ocurre para los valores con tasa de cambio negativa. Los genes que se representan en color negro son aquellos en los que la tasa de cambio no varía entre las dos condiciones y el valor de significancia es menor a la establecida. Por último, los genes representados en azul son aquellos que cumplen con el valor de significancia, pero no con la variación entre los estadios. En ambos estadios se destacan DEG del OSC en los estadios HH23 y HH30 (Anexo1-Tabla 2 y 3, respectivamente).



**Figura 12.** Volcano-plot de genes diferencialmente expresados en el OSC en estadios HH23 y HH30.

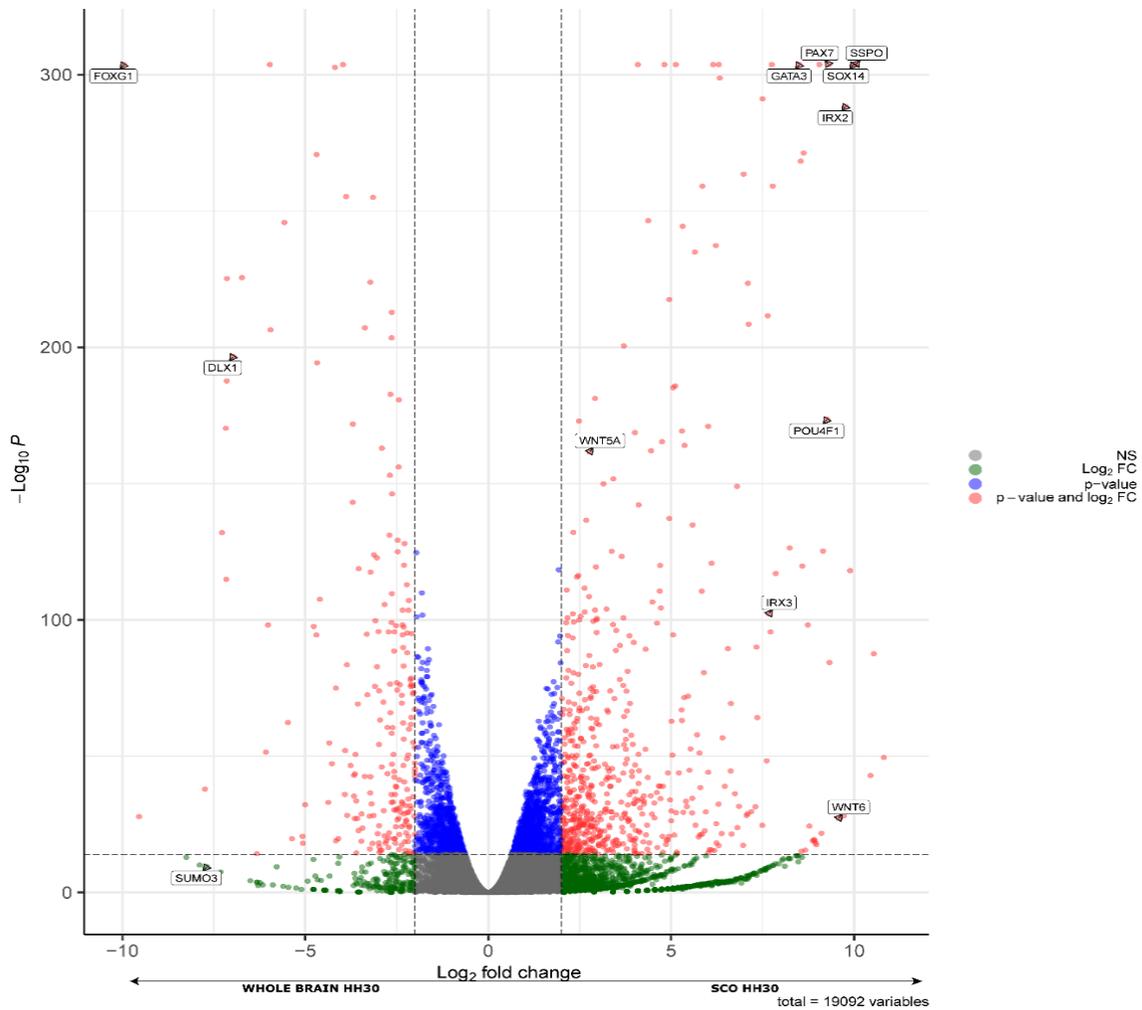
Gráfico generado con el paquete EnhancedVolcano de R, donde se observan los genes diferencialmente expresados en dos condiciones, OSC en estadio HH23 y HH30. Se escogieron al azar 8 genes diferencialmente expresados en OSC HH23 y 3 para OSC HH30 (flecha negra indica muestra). En el eje Y de la gráfica se muestra el p-value ajustado, mientras que en X el logaritmo de la tasa de cambio.

Para la segunda aproximación, se realizó un análisis de expresión diferencial entre las muestras de OSC en estadio HH30 y cerebro en estadio HH30 (fig. 13) obteniendo los DEG en el OSC HH30. Del total de 19092 genes alineados al genoma de *G. gallus*, se encontró 1110 diferencialmente expresados en OSC HH30 en comparación con las muestras de cerebro completo (Anexo1-Tabla 4 y 5, respectivamente), que se grafican en el volcano plot (fig. 14).



**Figura 13.** Diagrama de Ven de genes diferencialmente expresados en el OSC.

Panel superior: círculos representan las listas de conteos por muestras obtenidos mediante FeatureCounts. Panel inferior: Análisis de expresión diferencial usando DESeq2, donde se muestra el número de genes diferencialmente expresados en el OSC HH30 en comparación con cerebro HH30. Los parámetros excluyentes son que el logaritmo de la tasa de cambio sea mayor que 2 ( $\log_{2}FC > 2$ ), es decir que el cambio sea dos veces mayor con respecto a una condición y que el p-value ajustado sea menor que 0.05 (adjusted p-value < 0.05). DEG: genes diferencialmente expresados, OSC: órgano subcomisural. Número de genes por muestra: 19092.



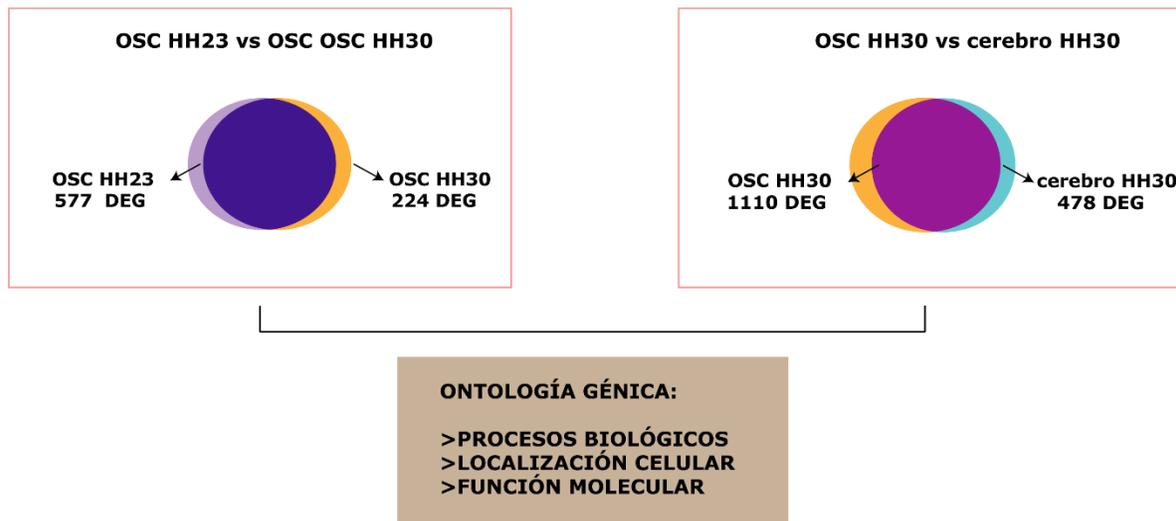
**Figura 14.** Volcano-plot de genes diferencialmente expresados en el OSC en estadio HH30 y cerebro completo HH30.

Gráfico muestra los genes diferencialmente expresados, representados en puntos rojos de las dos muestras (flechas). En el eje Y de la gráfica se muestra el p-value ajustado, mientras que en X el logaritmo de la tasa de cambio. SCO: órgano subcomisural, whole brain: cerebro completo.

### 4.1.3 Análisis de Ontología Génica

Luego de identificar los genes diferencialmente expresados se clasificaron de acuerdo con su ontología génica (GO, gene ontology) usando el programa ShinyGO (Ge et al. 2020) y ClusterProfiler(Wu et al. 2021).

Dentro de la clasificación de ontología génica, los genes diferencialmente expresados obtenidos por las dos aproximaciones (1.OSC HH23 vs OSC HH30 | 2. OSC HH30 vs cerebro HH30) se agruparon en tres categorías, I) procesos biológicos, II) componentes celulares y III) función molecular (figura 15).



**Figura 15.** Análisis de ontología génica.

Se presentan las dos aproximaciones, panel izq.: genes diferencialmente expresados en el OSC en estadio HH23 y HH30 panel der.: genes diferencialmente expresados en OSC con respecto al cerebro. Cada lista por separado de genes diferencialmente expresados fue analizada por separado para las 3 clasificaciones de ontologías génicas. Las listas se encuentran disponibles en Anexo1-Tabla 2-5. OSC: órgano subcomisural, DEG: genes diferencialmente expresados.

#### **4.1.3.1 OSC HH23 vs OSC HH30**

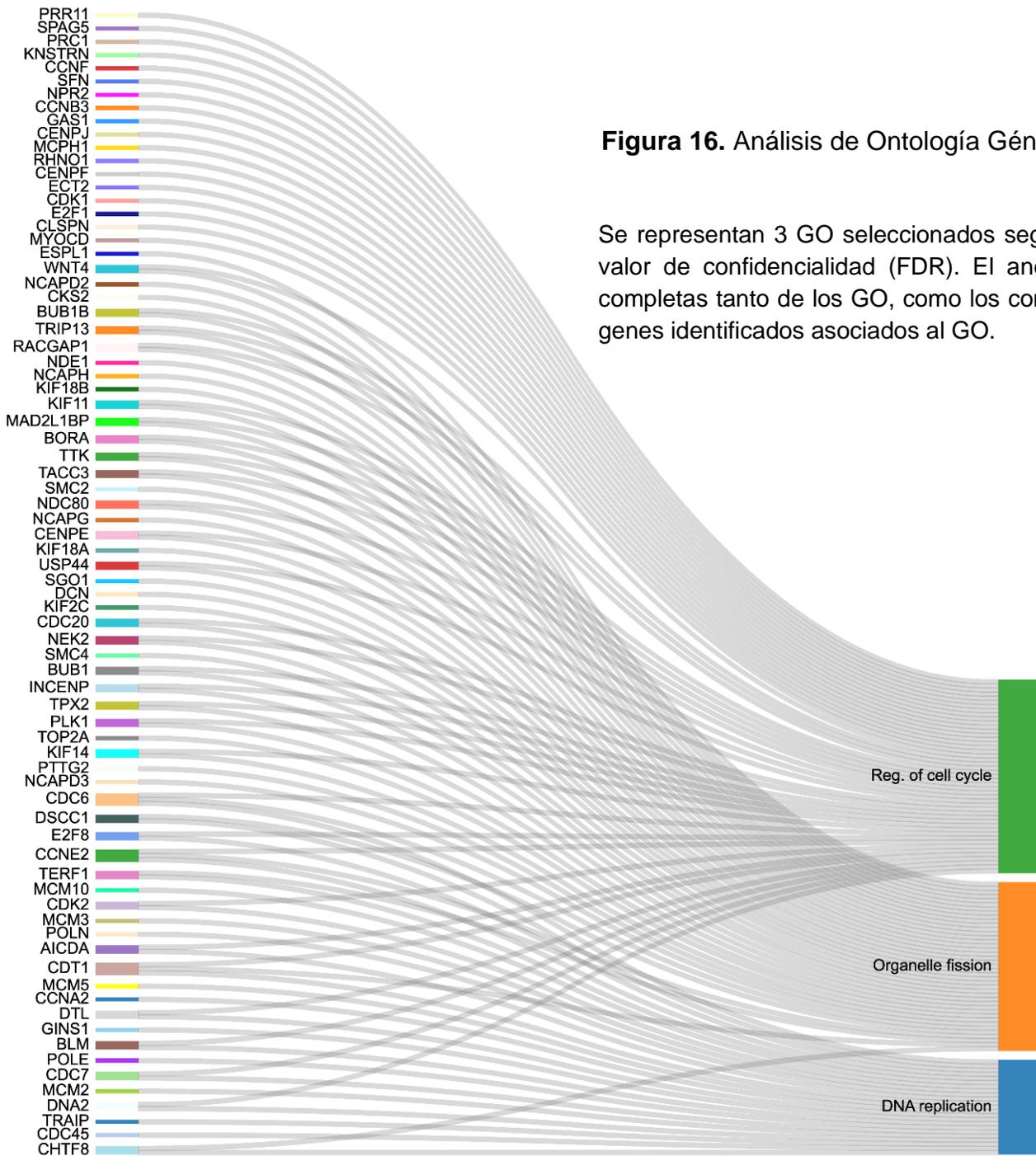
Para la primera aproximación, es decir los genes diferencialmente expresados en el OSC, tanto en el estadio HH23 como en el HH30 fueron analizados según la clasificación de ontología génica.

#### **Ontología génica de genes diferencialmente expresados en el OSC HH23**

##### Procesos Biológicos

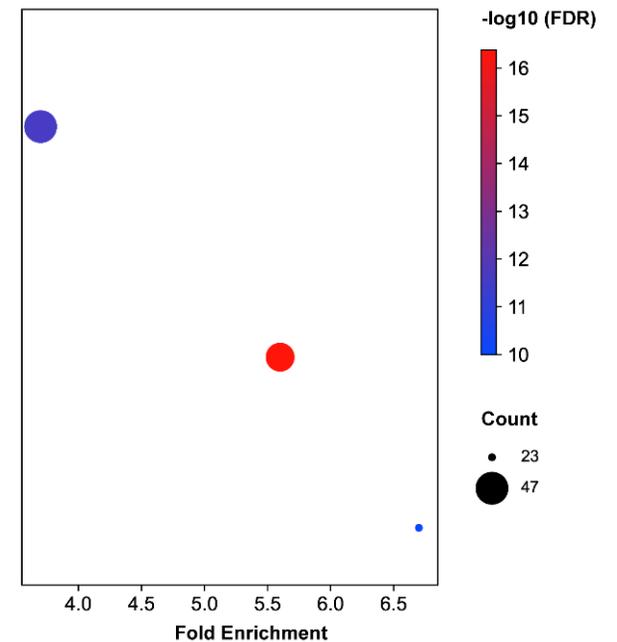
Los 577 genes (fig. 15) regulados al alza en el OSC en estadio HH23 (Anexo1-Tabla 2) fueron clasificados según el termino de procesos biológicos. Los términos mayormente enriquecidos (fig. 16, Anexo 2-Tabla1\_GO\_BP\_HH23) son procesos de replicación del ADN (GO:0006260), fisión de organelos (GO:0048285) y regulación del ciclo celular (GO:0051726), que se agrupan dentro del proceso de replicación como tal y se encuentran relacionados. Dentro del proceso biológico de fisión de organelos, se incluye división nuclear, fisión de mitocondrias y peroxisomas.

El grafico sankey and dot plot permite presentar en conjunto diferentes parámetros del análisis de GO. Por una parte, el panel de la izquierda o sankey plot, muestra los genes enriquecidos y compartidos en los términos de GO; mientras que el panel izquierdo o dot plot, muestra el conteo de genes asociados al término, la confidencialidad y la tasa de enriquecimiento. Tal como se observa en el gráfico, los diferentes términos comparten un gran número de genes (figura 16).



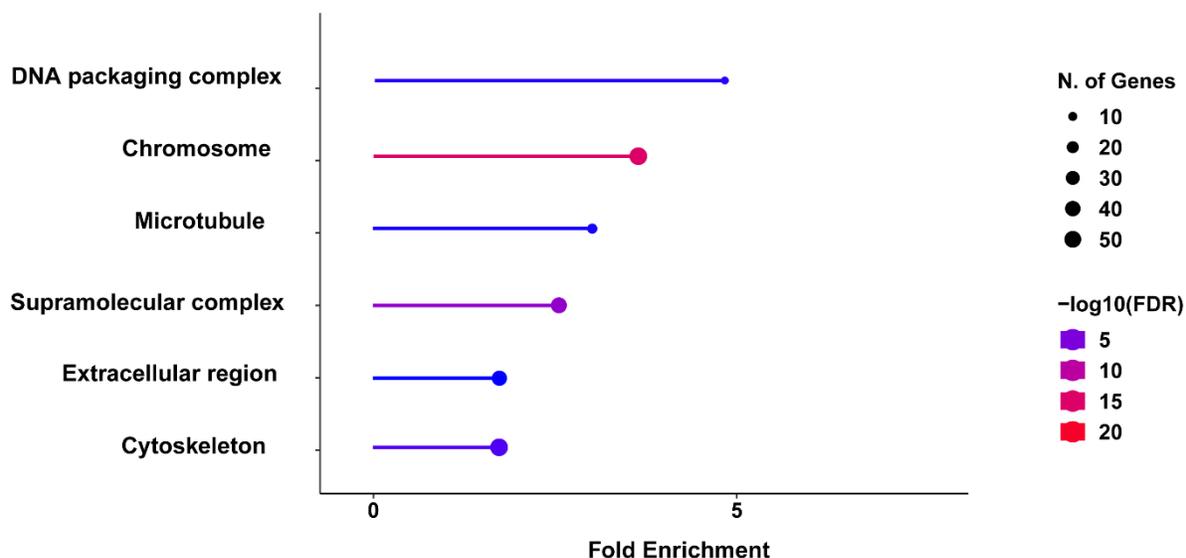
**Figura 16.** Análisis de Ontología Génica de procesos biológicos de OSC HH23.

Se representan 3 GO seleccionados según el mayor conteo de genes (count) y mayor valor de confiabilidad (FDR). El anexo 2\_GENE\_ONTOLOGY contiene las listas completas tanto de los GO, como los conteos, valor de confiabilidad y el número de genes identificados asociados al GO.



## Compartimento Celular

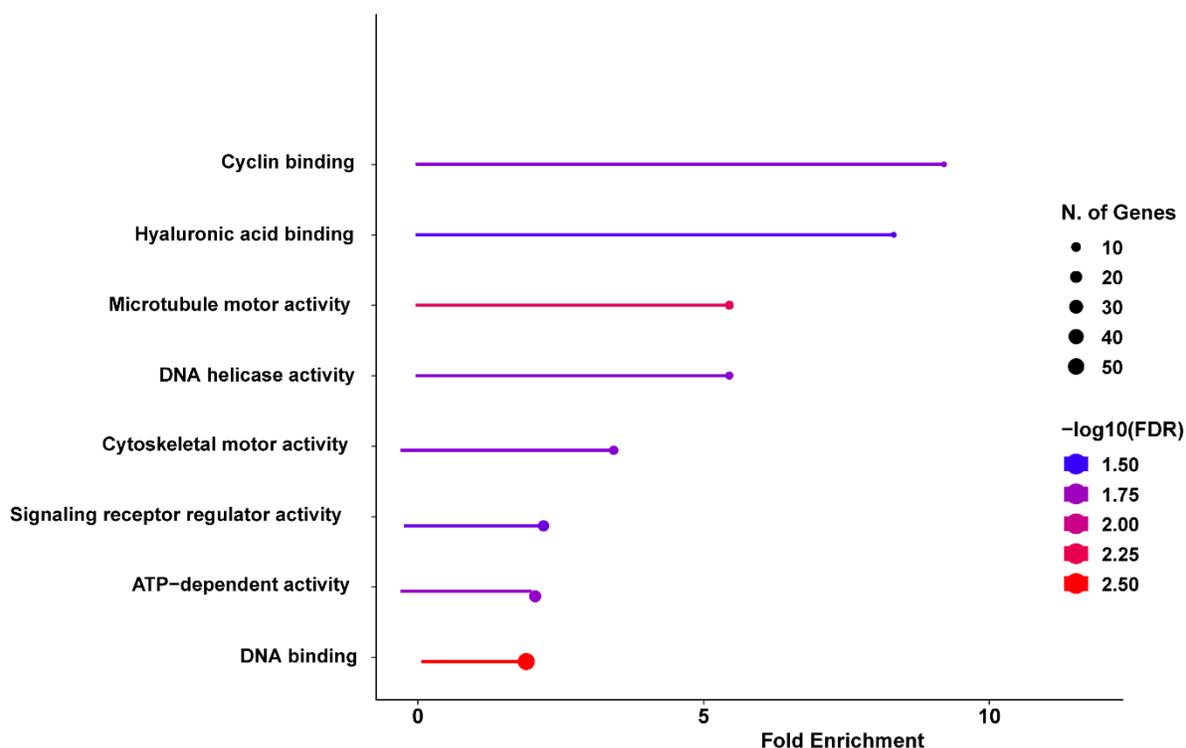
Estos 577 DEG en OSC en estadio HH23, fueron analizados según el compartimento celular en que se localizan (fig. 17, Anexo 2-Tabla2\_GO\_CC\_HH23). En este estadio, dado el estado proliferativo en el que se encuentra la célula, la mayoría de los DEG se localizan en el núcleo, principalmente en los cromosomas (GO: 0000775) o asociados (GO:0000776), además de elementos del citoesqueleto asociados con la dinámica de replicación (GO:0015630, GO:0005856). Por último, se encuentran elementos asociados a la región extracelular (GO:0005576), que en su mayoría corresponde a moléculas de secreción o moléculas de adhesión celular, sin embargo, la tasa de enriquecimiento es de 1.7.



**Figura 17.** Análisis de Ontología Génica de compartimento celular de OSC. Los DEG son clasificados según su compartimento celular ordenados de acuerdo con la tasa de enriquecimiento y clasificados según su FDR. El anexo 2\_GENE\_ONTOLOGY contiene las listas completas tanto de los GO, como los conteos, valor de confiabilidad y el número de genes identificados asociados al GO.

## Función Molecular

Finalmente, los DEG en OSC estadio HH23, fueron clasificados según la función molecular a la cual se encuentran asociados (Anexo 2-Tabla3\_GO\_MF\_HH23). El atributo de función molecular corresponde a las actividades a nivel molecular realizadas por productos génicos o complejos de estos. La mayoría de estos se encuentran asociados a proteínas de andamiaje propias del proceso de replicación y además de proteínas del citoesqueleto (fig.18).



**Figura 18.** Análisis de Ontología Génica de función molecular de OSC HH23.

Los DEG son clasificados según su compartimento celular ordenados de acuerdo con la tasa de enriquecimiento y clasificados según su FDR. El anexo 2\_GENE\_ONTOLOGY contiene las listas completas tanto de los GO, como los conteos, valor de confiabilidad y el número de genes identificados asociados al GO.

El análisis del OSC en estadio HH23 muestra un gran potencial proliferativo, ya que fundamentalmente los términos de ontología génica enriquecidos se relacionan con la síntesis de ADN y la preparación celular propia de este proceso como lo son enzimas implicadas en la síntesis de ADN, reconfiguración celular del citoesqueleto y fisión de organelos. Por otro lado, el análisis de enriquecimiento de genes según la localización o compartimento celular mostro un enriquecimiento del núcleo, tal como era de esperar, debido a los términos de procesos biológicos previamente analizados. Sin embargo, destaca la presencia de enriquecimiento en la región extracelular, aunque la tasa de enriquecimiento no es alta, evidencia la presencia de secreción o transporte de moléculas a la membrana celular. Dentro de este último término, destacan genes de la vía Wnt, como wnt9B, SFRP2 y Wnt4, además de factores de crecimiento como VEGFD, VASN y proteínas involucradas en el desarrollo como RBP3 y APOA1. Finalmente, de forma inesperada, se identificó enriquecimiento de genes relacionados con el procesamiento extracelular de histonas como LOXL2.

De acuerdo con la ontología génica de función molecular, los términos enriquecidos se relacionan fuertemente con el proceso de replicación celular y movilidad de moléculas dentro de la célula, como enriquecimiento en microtúbulos.

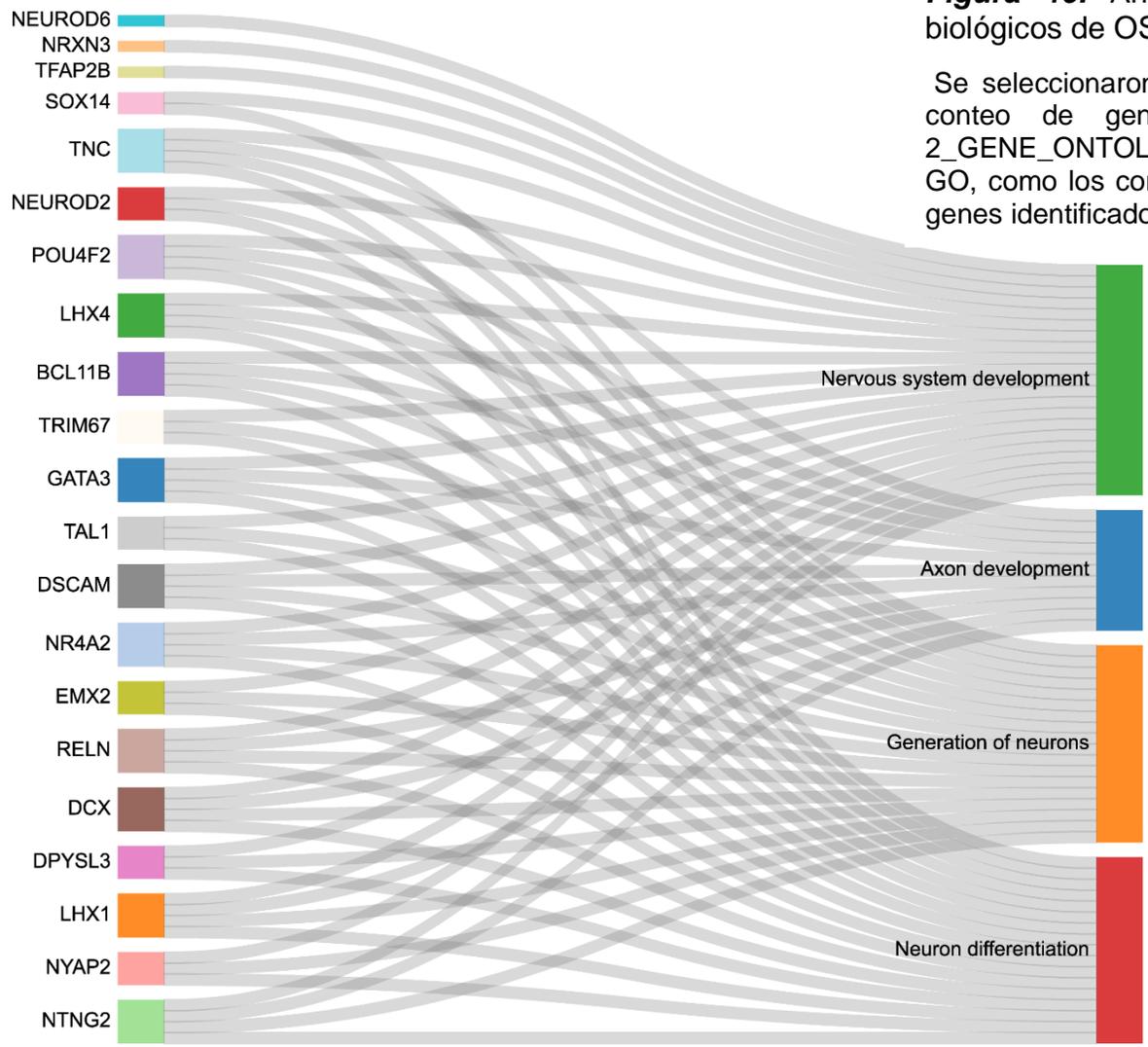
## **Ontología génica de genes diferencialmente expresados en el OSC HH30**

### Procesos Biológicos

Los 224 DEG regulados al alza (fig. 15) en el OSC en estadio HH30 (Anexo1- Tabla 4) fueron clasificados según el termino de procesos biológicos (fig. 19, Anexo 2- Tabla4\_GO\_BP\_HH30). Los términos más enriquecidos se integran en el término de desarrollo de sistema nervioso (GO:0007399), el cual contiene los términos cercanos de neurogénesis (GO:0048699) y diferenciación neuronal (GO:0030182), el primero incluye la producción de neuroblastos hasta la diferenciación de estas en neuronas, mientras que el segundo hace referencia a una diferenciación terminal de las mismas. Por último, el termino de desarrollo de axón (GO:0061564) se encuentra fuertemente enriquecido, este se encuentra contenido en desarrollo de proyecciones axonales, donde se describen procesos como axonogénesis (generación de novo de un axón) y la regeneración del axón (nuevo crecimiento), así como los procesos relacionados con la progresión del axón a lo largo del tiempo (fasciculación y defasciculación).

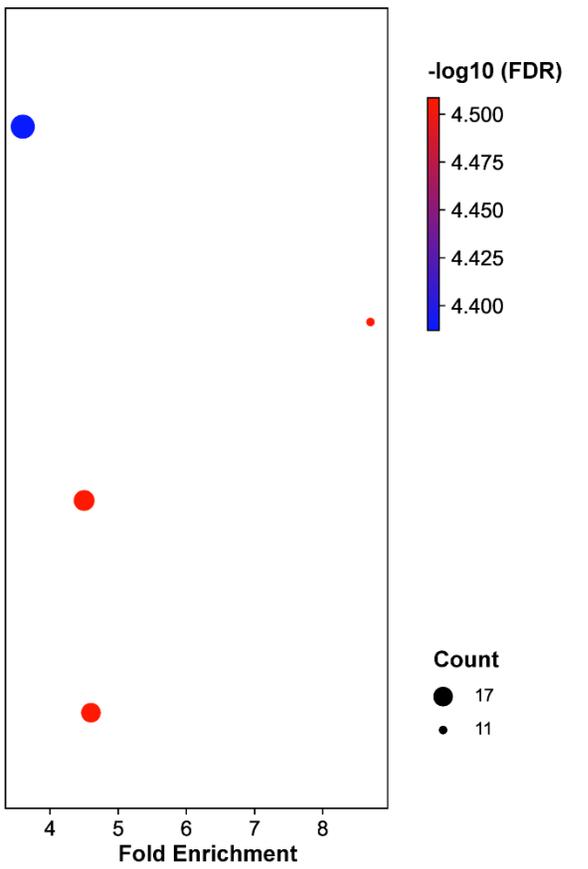
### Compartimento Celular

Los 224 DEG regulados al alza (fig. 15) en el OSC en estadio HH30 (Anexo1- Tabla 4) fueron clasificados según el termino de compartimento celular, sin embargo, no hubo enriquecimiento de ningún termino.



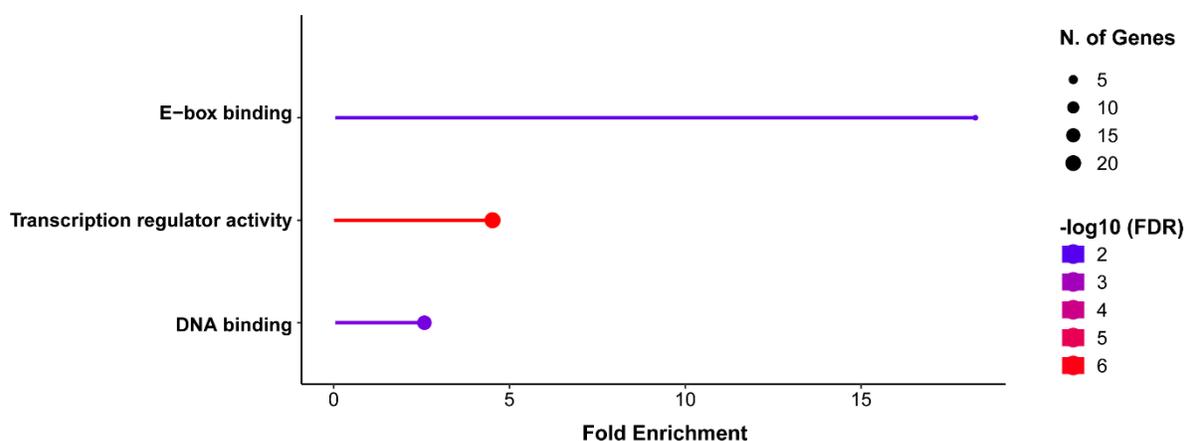
**Figura 19.** Análisis de Ontología Génica de procesos biológicos de OSC HH30.

Se seleccionaron 4 términos GO enriquecidos según el mayor conteo de genes y menor valor de FDR. El anexo 2\_GENE\_ONTOLOGY contiene las listas completas tanto de los GO, como los conteos, valor de confiabilidad y el número de genes identificados asociados al GO.



## Función Molecular

Finalmente, los DEG en OSC estadio HH30, fueron clasificados según la función molecular a la cual se encuentran asociados (fig. 20, Anexo 2-Tabla5\_GO\_MF\_HH30). El término mayormente enriquecido corresponde al relacionado con la unión al E-box (GO:0070888). Este corresponde a un motivo de ADN cuya secuencia consenso CANNTG, se encuentra en los promotores de una amplia gama de genes expresados en neuronas, músculos y otros tejidos (Berardini et al. 2010). Por otro lado, los términos relacionados con la transcripción están enriquecidos como la actividad reguladora de la transcripción (GO:0140110) y unión al ADN (GO:0003677).



**Figura 20.** Análisis de Ontología Génica de función molecular de OSC HH30.

Los DEG son clasificados según su compartimiento celular ordenados de acuerdo con la tasa de enriquecimiento y clasificados según su FDR. El anexo 2\_GENE\_ONTOLOGY contiene las listas completas tanto de los GO, como los conteos, valor de confiabilidad y el número de genes identificados asociados al GO.

El análisis del OSC en estadio HH30 muestra que en este estadio predomina el estado de diferenciación, ya que los términos integrados en el desarrollo del sistema nervioso son fuertemente enriquecidos como la generación de neuronas, y los procesos de guía axonal que tienen una tasa de enriquecimiento de 8.0. Un hecho inesperado, fue que, en la categoría de compartimento celular, no hubiese enriquecimiento. Esto puede deberse a la baja cantidad de DEG de este estadio (224) que no permiten enriquecer ninguna localización en particular. Por último, el análisis de función molecular se correlaciona con los procesos biológicos, ya que involucra la regulación de factores de transcripción y la unión a un dominio conservado de ADN involucrada en la correcta formación de neuronas.

#### 4.1.3.2 OSC HH23 vs cerebro HH30

##### Ontología génica de genes diferencialmente expresados en el OSC HH30

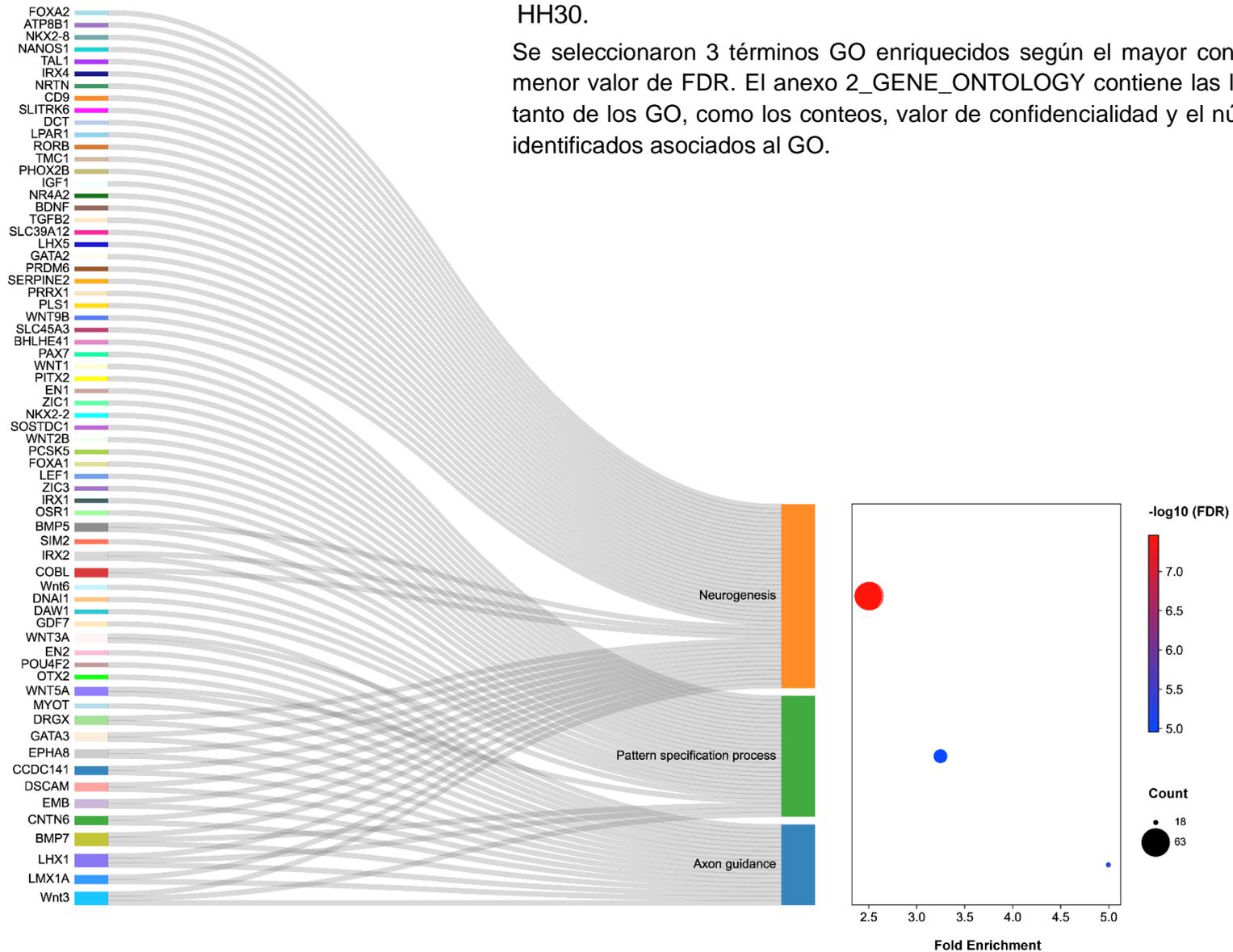
###### Procesos Biológicos

Los 1110 DEG regulados al alza (fig. 15) en el OSC en estadio HH30 (Anexo1-Tabla 4) fueron clasificados según el termino de procesos biológicos (Anexo 2-Tabla4\_GO\_BP\_HH30). Los términos mayormente enriquecidos (fig. 21) dentro del atributo de proceso biológico, incluyen procesos de desarrollo (GO:0032502) que comprende la progresión de cualquier estructura anatómica, que puede ser célula, un tejido o un órgano desde una condición inicial a una final (Ringwald et al. 2022). Dentro es este, el proceso de patrón de especificación (GO:0007389) se encuentra dentro de los más enriquecidos, seguido por la neurogénesis (GO:0022008) que corresponde al proceso de desarrollo de neuronas y células gliales (Ringwald et al. 2022). Por otro lado, el proceso de guía axonal corresponde a la quimiotaxis que dirige la migración de un cono de crecimiento del axón a un sitio objetivo específico en respuesta a una combinación de señales atractivas y repulsivas (Ringwald et al. 2022).

Por último, el proceso de transporte transmembrana (GO:0055085) corresponde al paso de un soluto a través de una bicapa lipídica generalmente asociado al gasto de una molécula de ATP (no mostrado en el gráfico, ver Anexo 2-Tabla4\_GO\_BP\_HH30).

**Figura 21.** Análisis de Ontología Génica de procesos biológicos de OSC HH30.

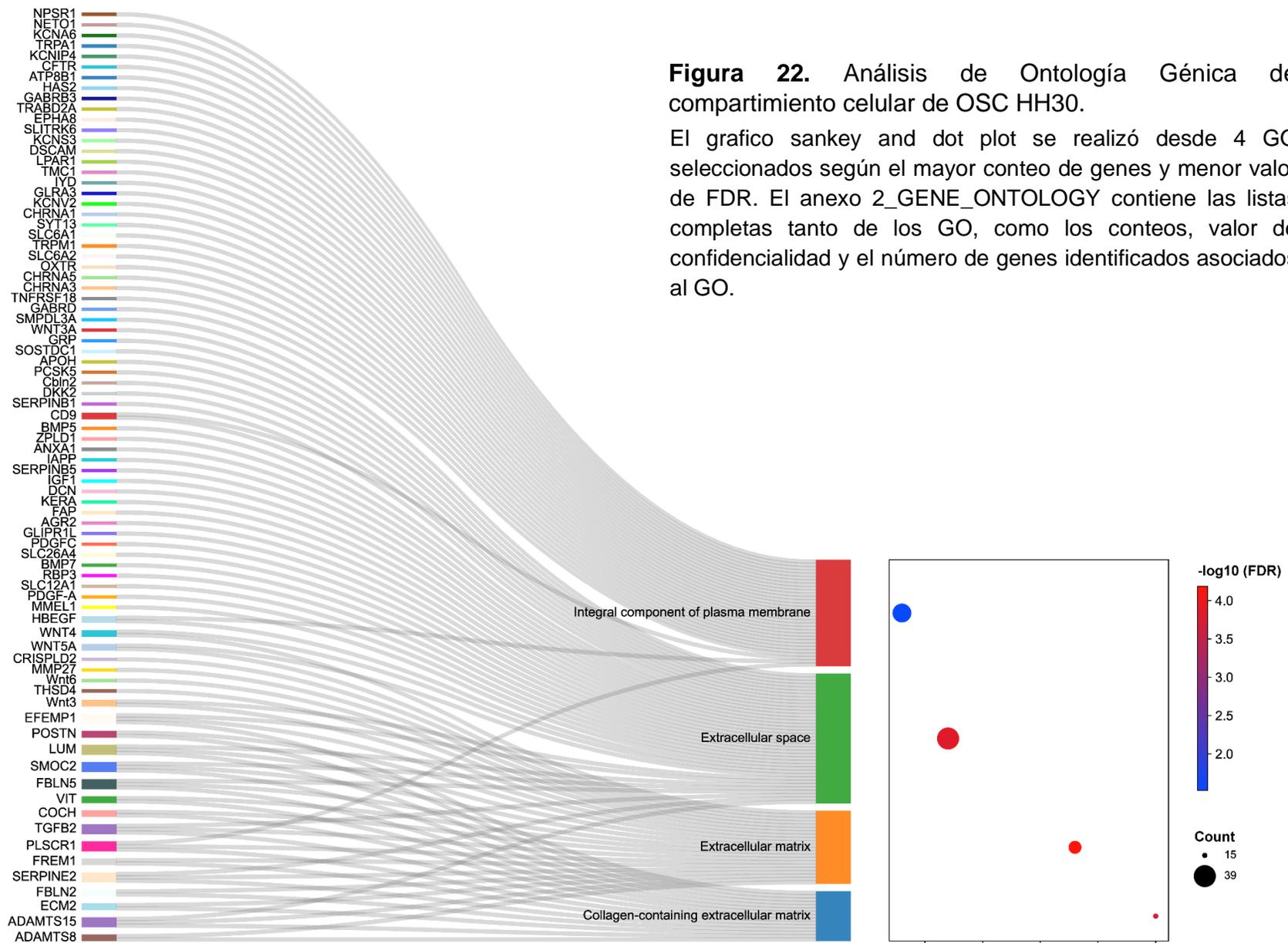
Se seleccionaron 3 términos GO enriquecidos según el mayor conteo de genes y menor valor de FDR. El anexo 2\_GENE\_ONTOLOGY contiene las listas completas tanto de los GO, como los conteos, valor de confiencialidad y el número de genes identificados asociados al GO.



### Compartimento celular

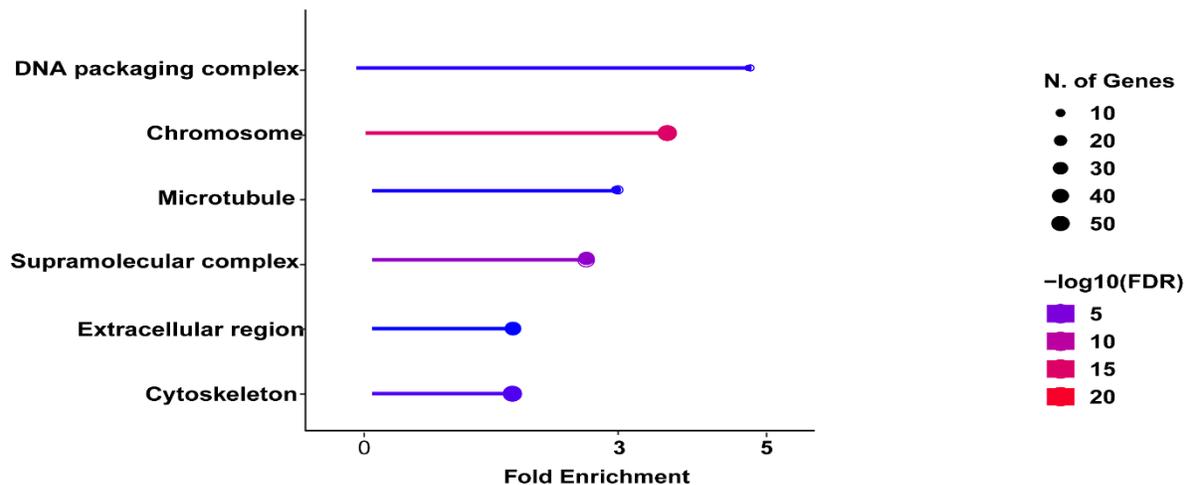
El atributo de componente celular corresponde a las estructuras y compartimentos celulares, ocupados por una maquinaria macromolecular cuando lleva a cabo una función molecular (Berardini et al. 2010). Los términos mayormente enriquecidos (fig. 22, Anexo 2-Tabla5\_GO\_CC\_HH30) corresponde a los componentes integrales de membrana plasmática (GO:0005887) incluyen receptores (EPHA8, NPSR1) y moléculas de adhesión (DSCAM).

La segunda y tercera anotación comparten una gran cantidad de genes, donde en la matriz estructural extracelular (GO:0031012) se encuentran metaloproteasas (ADAMTS15, ADAMTS8) y proteínas de matriz extracelular (FBLN2), mientras que la anotación de espacio extracelular (GO:0005615) hace referencia a los productos de secreción.



## Función Molecular

Los 1110 genes DEG en el OSC en estadio HH30, fueron analizados según su función molecular (Anexo 2-Tabla6\_GO\_MF\_HH30). Las funciones más enriquecidas (fig. 23) son aquellas relacionadas con unión al ADN (GO:0003677), transcripción (GO:0001216) y regulación de esta (GO:0140110). Además de procesos asociados a la membrana celular como unión ligando-receptor (GO:0048018), señalización de receptores (GO:0038023) y actividad de transporte (GO:0005215).



**Figura 23.** Análisis de Ontología Génica de función molecular de OSC HH30.

Gráfico de GO seleccionados según su según la tasa de enriquecimiento y mayor valor de confiabilidad. El anexo 2\_GENE\_ONTOLOGY contiene las listas completas tanto de los GO, como los conteos, valor de confiabilidad y el número de genes identificados asociados al GO.

El análisis de ontología génica del OSC en estadio HH30 se realizó utilizando los datos de DEG obtenidos en el análisis de expresión diferencial con el cerebro en el mismo estadio, este dato es sumamente relevante ya que la comparación: I) es con muestras del mismo estadio de diferenciación, II) se utiliza como condición de comparación el cerebro completo (el cual incluye el OSC). A primera vista, se destaca el potencial diferenciador y la aparente condición secretora del OSC. Dentro del término de proceso biológico, este estadio está definido por el desarrollo del SNC en donde el proceso de especificación de patrones se encuentra enriquecido, esto corresponde a la definición de una región que dará origen a un grupo celular diferenciado. La neurogénesis corresponde a un proceso concomitante e íntimamente relacionado a la especificación de patrones. El término de guía axonal también se encuentra altamente enriquecido con una tasa de 4.9, en donde se encuentran moléculas clásicas que actúan como atrayentes o repelentes axonales como EPH, DSCAM y CNTN6. Según el análisis de enriquecimiento de genes en función de la localización, se identifican diferentes vías relacionadas con la secreción de moléculas al medio extracelular, unido a la matriz extracelular o componentes integrales de membrana. Esto entrega indicios de la capacidad secretora del OSC, especialmente enriquecida en el estadio HH30, caracterizado por la diferenciación, en donde se pasa de un neuroepitelio indiferenciado a una glía radial altamente secretora.

Como era de esperar, en los términos de función molecular, destacan aquellas vías relacionadas con transcripción, como complejos de andamiaje de unión al ADN, factores de transcripción y regulación de esta actividad. También se hallan

fuertemente enriquecidas las vías relacionadas con la actividad de receptor ligando, actividad transportadora y señalización de receptores.

Finalmente, con respecto al enriquecimiento ontológico de genes en este estadio se encontró que el OSC podría presentar un gran potencial secretor en HH30. Entre los genes sobreexpresados destacan numerosos miembros de la familia Wnt, BMP, BDBF y FGF. La tabla 4 (Anexo 2\_GENE\_ONTOLOGY\_HH30) muestra la clasificación de las moléculas diferencialmente expresadas según su localización en la membrana o si son consideradas posibles productos de secreción.

#### **4.1.4 Familia de Factores de crecimiento de Fibroblastos**

El análisis de expresión diferencial mostró que los receptores de FGF y algunos ligandos, se encontraban diferencialmente expresados en el OSC en estadio HH23 y HH30. Dada la relevancia de los FGF en el desarrollo (Dorey and Amaya 2010a), se decidió analizar la expresión de la familia FGF y sus receptores en el OSC, tanto en estadio HH23 y HH30. Los datos analizados corresponden al archivo de Z-score de los transcritos que fueron graficados en R-studio usando la librería Pheatmap.

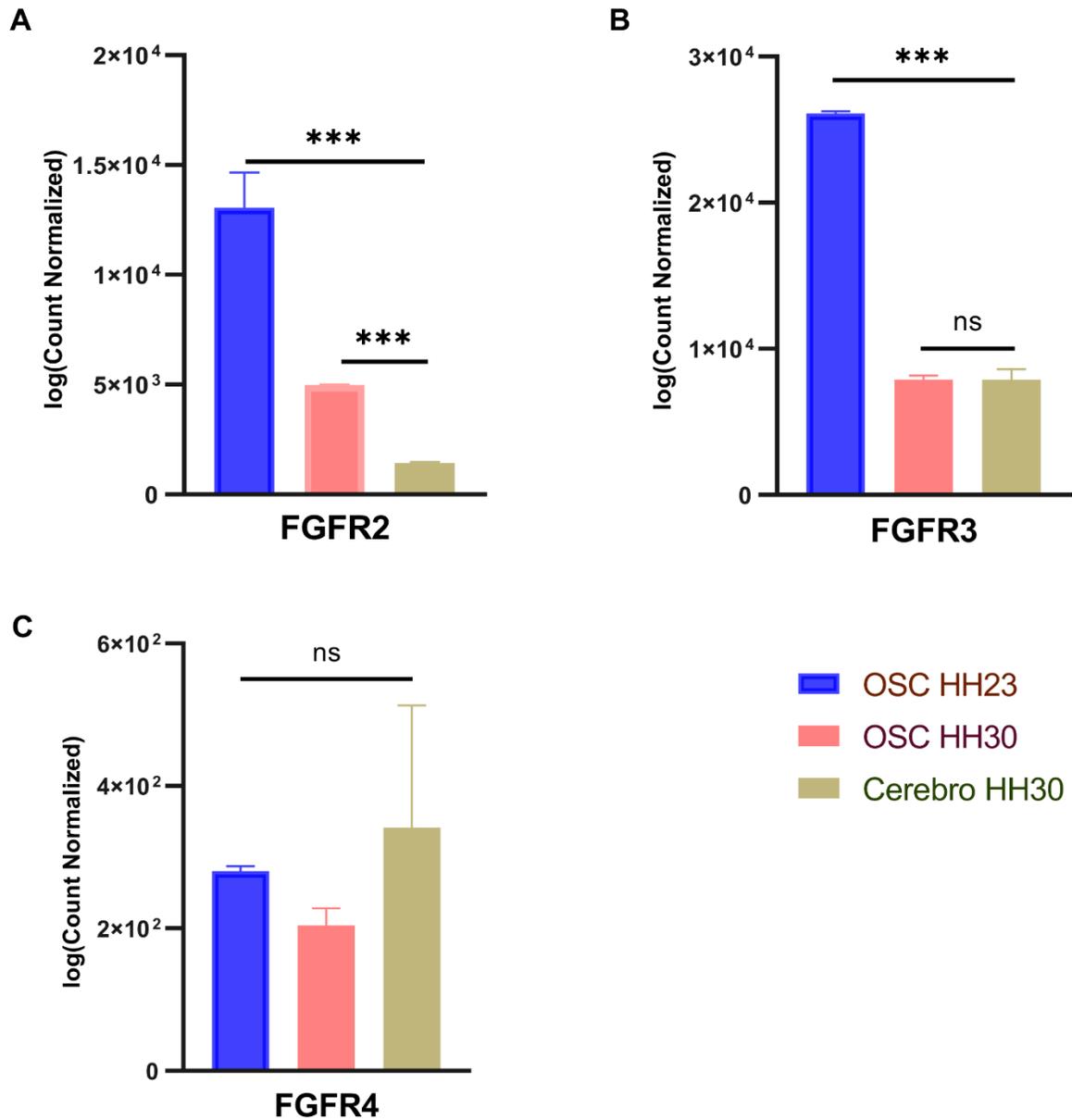
El mapa de calor de la familia de FGF muestra una marcada diferencia en los niveles de expresión de ciertos ligandos y receptores entre los dos estadios estudiados (figura 24). Los valores presentados en color azul (-5) corresponde a aquellos transcritos expresados a la baja, mientras que los que se encuentran en color rojo (+5) son aquellos que se hallan expresados al alza según el análisis de Z-score del conteo normalizado. En el eje X podemos ver las dos replicas (R1 y R2) para cada condición, HH23 y HH30. En la figura 24 se observa que los FGFR2, FGFR3 y FGFR4 se encuentran expresados al alza en el OSC en estadio HH23 y entre los ligandos, la expresión al alza de FGF8, un morfógeno clave para la formación del istmo y el telencéfalo (Toyoda et al. 2010). Con respecto al OSC en estadio HH30, se observa la expresión diferencial de los ligandos FGF13, FGF14, FGF16. Mientras que en las muestras de cerebro se expresan dos receptores, FGFR1 y FGFR5, dentro de los ligandos FGF2, FGF5, FGF12 y FGF18 se expresan diferencialmente en el cerebro.



El análisis de expresión de transcritos utilizando heatmap entrega una visión general de los resultados, ya que permite identificar fácilmente aquellos transcritos de genes que varían entre las diferentes condiciones. En este caso, a partir del heatmap se seleccionaron los genes que se evaluaron utilizando el conteo normalizado, ya que tiene un menor coeficiente de variación y los valores de correlación de interclase son más altos que TPM o FPKM que también se utilizan para heatmap (Zhao et al. 2021).

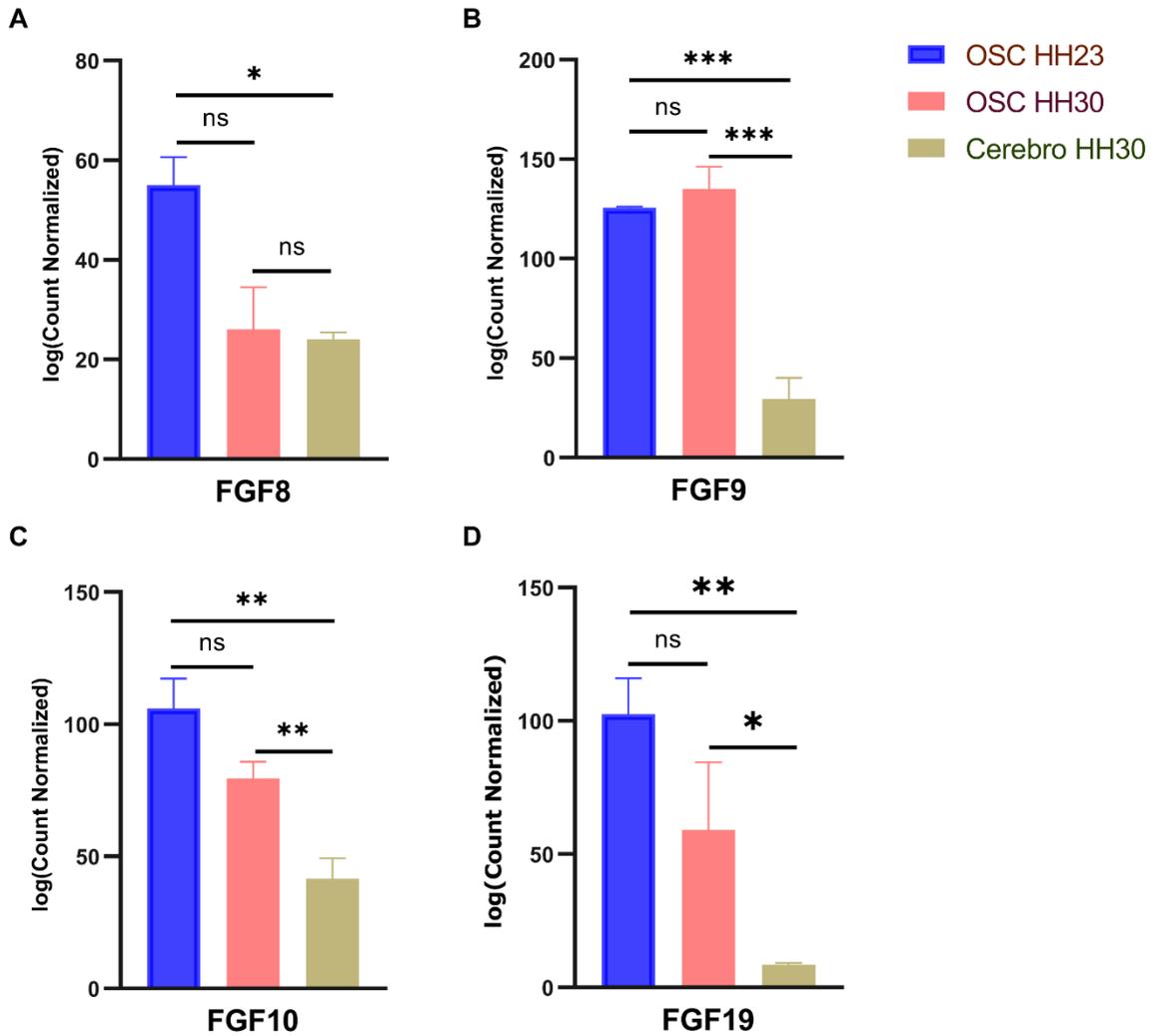
Los receptores FGFR2 y FGFR3 exhiben una expresión diferencial en el estadio HH23 (figura 24), lo cual guarda correlación con el cambio notable observado en el recuento normalizado de los transcritos al comparar las muestras de OSC HH30 y cerebro completo (figura 25). En contraste, FGFR4 muestra una variación en la expresión en el OSC HH23 (figura 24), aunque este cambio no alcanza la significancia en el análisis del recuento normalizado (figura 25).

En lo que respecta a los ligandos FGF8 y FGF19, su expresión se mantiene relativamente constante entre el estadio HH23 del OSC y el HH30, mostrando poca variación. No obstante, el cambio es significativo cuando comparamos el OSC en el estadio HH23 con la muestra del cerebro en el estadio HH30. Por otro lado, los ligandos FGF9 y FGF10 mantienen un nivel constante de expresión en el OSC en ambos estadios, pero su expresión varía cuando se comparan con el cerebro (figura 24 y 26).



**Figura 25.** Conteo normalizado de FGFRs.

Los genes diferencialmente expresados en estadio HH23 fueron seleccionados y graficados usando el conteo normalizado, comparado con las muestras de OSC HH30 y cerebro HH30. Gráfico de A) FGFR2 B) FGFR3 C) FGFR4. \*\*\*: p-value < 0,01 ns: no significativo. El anexo 3\_Z-score contiene la lista de genes con el valor de conteo normalizado y z-score.



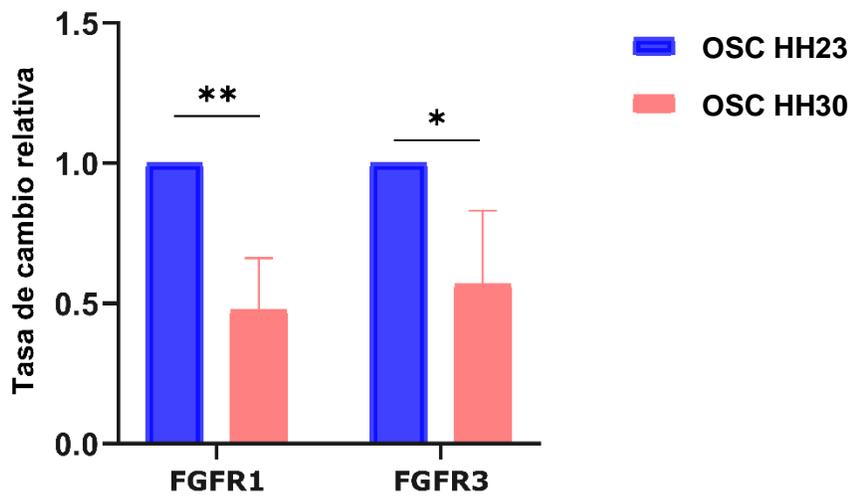
**Figura 26.** Conteo normalizado de ligandos de FGFs.

Los genes diferencialmente expresados en el OSC en ambos estadios fueron seleccionados y graficados usando el conteo normalizado, comparado con la muestra de cerebro HH30. Gráfico de ligando A) FGF8, B) FGF9, C) FGF10 y D) FGF19. ns: no significativo, \*\*\*: pvalue < 0,01. El anexo 3\_Z-score contiene la lista de genes con el valor de conteo normalizado y z-score.

#### 4.1.5 Análisis de transcritos de FGFRs en el OSC

Los análisis transcriptómicos indican que los FGFR se expresan diferencialmente en el OSC en estadio HH23 y no en HH30. Para corroborar esta información se analizaron los ARNm mediante RT-qPCR.

Los resultados (figura 27) comprueban que FGFR3 se expresa diferencialmente en el OSC estadio HH23 y no en HH30. Por otro lado, FGFR1 se encontró diferencialmente expresado en OSC HH23, aunque la data de transcriptómica muestra una expresión similar en OSC HH23 y HH30, mientras que su expresión es mayor en el cerebro, sin embargo, aquí solo se analizó la expresión en el OSC.



**Figura 27.** Cuantificación de FGFR en el OSC mediante RT-qPCR.

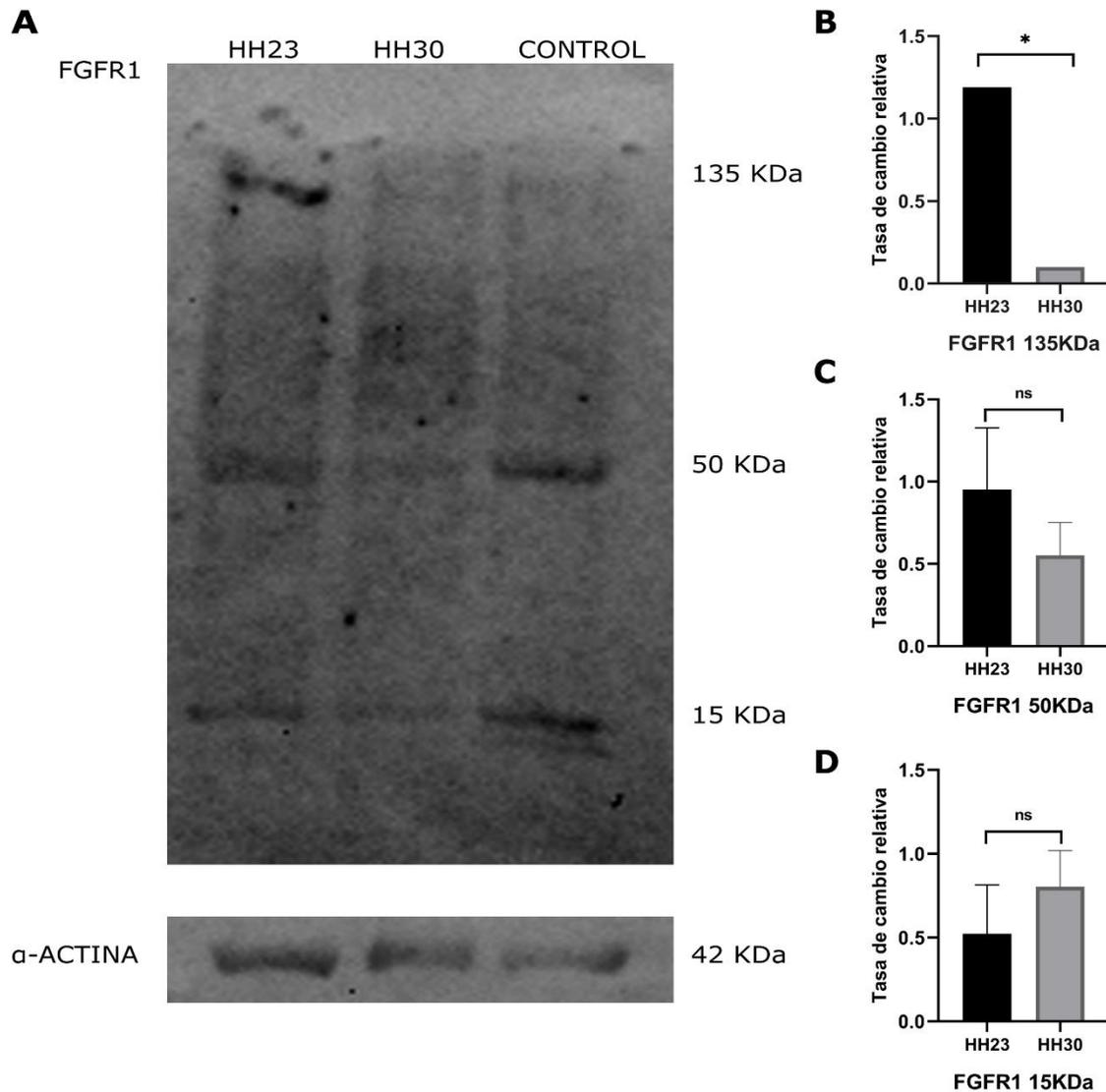
Los análisis fueron realizados por triplicado La tasa de cambio normalizada con respecto al gen GAPDH. n:3

## **4.2 Objetivo 2: Identificar la presencia de FGFRs en el OSC durante el desarrollo embrionario temprano.**

Con el fin de caracterizar la expresión proteica de los receptores de la familia de FGF, se realizaron ensayos de western blot de extractos proteicos de OSC de estadios HH23 y HH30, usando como control positivo primordio de ala en estadio HH30 (Sheeba et al. 2010b).

### **4.2.1 Análisis de expresión de FGFR1 en el OSC**

En el análisis de western blot de FGFR1 en el OSC (fig. 28), se pueden identificar 3 bandas de diferentes pesos, 135, 50 y 15 KDa. Según las bases de datos como Ensembl (Cunningham et al. 2022) y Uniprot (Bateman et al. 2023), este receptor tiene un tamaño aproximado de 110 KDa. Nuestro análisis utilizando el programa `annotate_my_genomes` desarrollado en el laboratorio (Farkas et al. 2022) nos permitió identificar dos variantes de FGFR1 de 18 exones cada una (anexo 4), las cuales tienen un peso aproximado de 110 KDa. ahora bien, según el análisis de western blot se identifica una proteína de 135 KDa, que podría corresponder al receptor glicosilado, ya que en su secuencia tiene 8 sitios potenciales de glicosilación. Con respecto a esta variante, se observa mayor expresión en el estadio HH23 (fig. 28, panel B). Por otro lado, las bandas de 50 y 15 KDa podrían corresponder a clivajes del receptor ya sea por proteasas extracelulares o intracelular, sin embargo, su cambio no es significativo (fig. 28, panel C-D). Lamentablemente el anticuerpo utilizado no informa el sitio de reconocimiento, por lo que no podemos saber que extremo de la proteína reconoce.



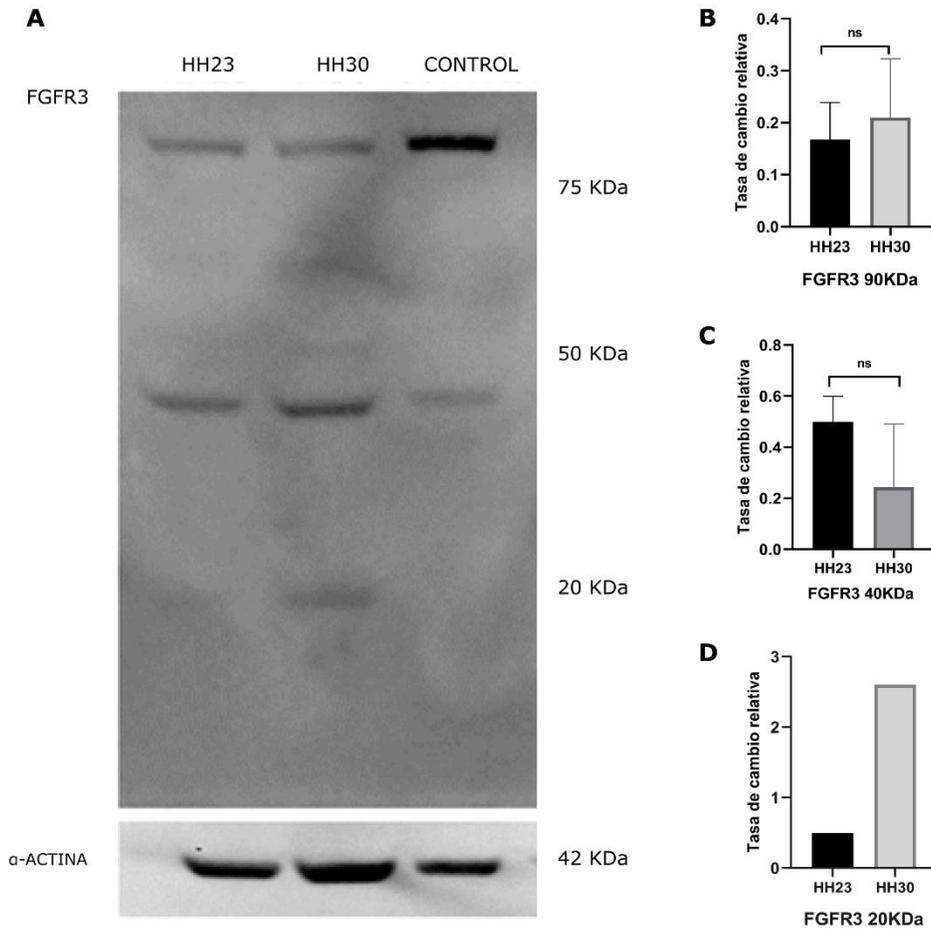
**Figura 28.** Ensayo de Western blot de FGFR1.

Análisis de western blot contra FGFR1 de extracto de OSC provenientes de embriones en estadio HH23 (línea 1) HH30 (línea 2) y primordio de ala de embrión de pollo HH30 (línea 3). En la línea inferior control de carga con  $\alpha$ -actina de stripping de membrana(A). B-D cuantificación de variantes de FGFR1. N=2. ns: no significativo.

#### **4.2.2 Análisis de expresión de FGFR3 en el OSC**

Para el análisis de FGFR3, se utilizó un anticuerpo que reconoce el dominio inmunoglobulina-like I, es decir la región extracelular del receptor. Se identificaron 3 bandas diferentes (fig. 29), la de mayor peso molecular corresponde a aproximadamente 90 KDa, mientras que las dos restantes son de 40 y 20 KDa.

La base de datos Ensembl registra dos variantes de splicing, las cuales fueron detectadas utilizando el programa `annotate_my_genomes`, la isoforma FGFR3 X1 de 22 exones cuyo peso molecular es de 94 KDa y otra FGFR3 X6 de 18 exones de 81 KDa (anexo 4), sin embargo, mediante el análisis de western blot solo se observa una banda de aproximadamente 90 KDa cuyo cambio no es significativo (fig. 29, panel A). Por último, las bandas de 40 y 20 KDa podrían corresponder a los dominios extracelulares del FGFR3, al igual que las variantes anteriores, su cambio no es significativo (fig. 29, panel C- D).



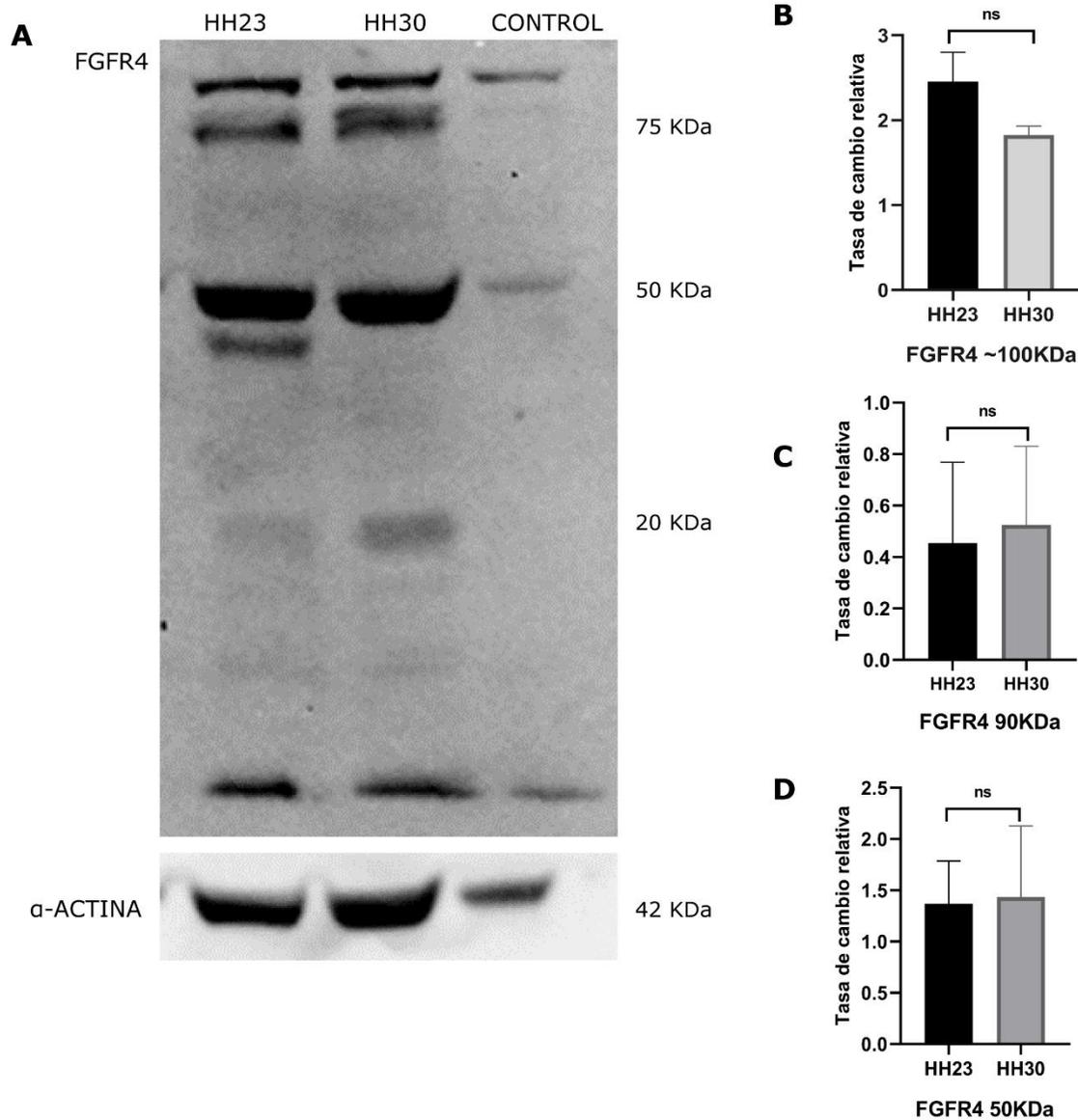
**Figura 29.** Ensayo de Western blot de FGFR3.

A) Análisis de western blot contra FGFR3 de extracto de OSC provenientes de embriones en estadio HH23 (línea 1) HH30 (línea 2) y primordio de ala de embrión de pollo HH30 (línea 3). En la línea inferior control de carga con  $\alpha$ -actina de stripping de membrana. B-D) cuantificación de variantes de FGFR3. Experimento realizado por triplicado. ns: no significativo.

### **4.2.3 Análisis de expresión de FGFR4 en el OSC**

Para el análisis de FGFR4, se utilizó un anticuerpo que reconoce el dominio inmunoglobulina-like I, es decir la región extracelular del receptor. Se reconocen una gran cantidad de bandas diferentes (fig. 30), la de mayor peso molecular corresponde a aproximadamente 100 KDa, seguida por una de 90 y 50 KDa. Adicionalmente, se observa bandeo de estas (bandas sobrepuestas o muy cercanas), indicando posiblemente modificaciones postraduccionales de la proteína FGFR4.

La base de datos Ensembl registra cuatro variantes de splicing, de las cuales solo una fue detectada por el análisis de RNA-seq, la isoforma FGFR4 X1 de 17 exones (anexo 4) y un peso aproximado de 90 KDa (figura 30, panel C), mientras que las bandas más pequeñas podrían corresponder a modificaciones postraduccionales como clivaje por proteasas que se hallan en el medio extracelular. Por otro lado, la banda de mayor tamaño de aproximado 100 KDa podría corresponder a glicosilación de la proteína, ya que se han reportado al menos 7 sitios potenciales de N-glicosilación. Nuestros análisis indican que no hay cambios significativos en la expresión de los receptores en el OSC entre el estadio HH23 y HH30.



**Figura 30.** Ensayo de Western blot de FGFR4.

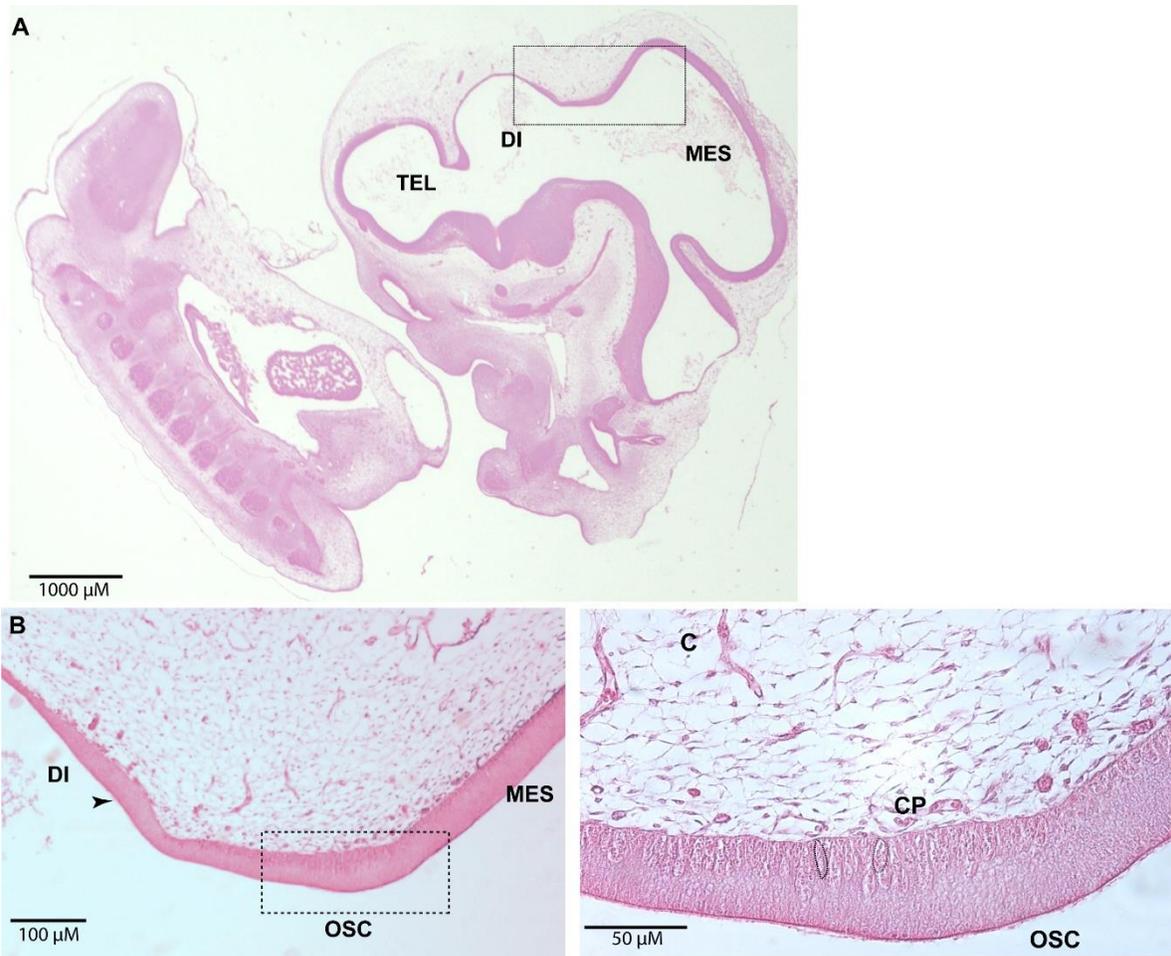
Análisis de western blot contra FGFR4 de extracto de OSCp provenientes de embriones en estadio HH23 (línea 1) HH30 (línea 2) y primordio de ala de embrión de pollo HH30 (línea 3, panel A). En la línea inferior control de carga con  $\alpha$ -actina de stripping de membrana. B-D) cuantificación de variantes de FGFR4. Experimento realizado por triplicado. ns: no significativo.

### **4.3 Objetivo 3: Determinar la localización de los FGFRs en la OSC durante el desarrollo embrionario temprano.**

Con el fin de analizar la distribución de los receptores de FGF, se realizaron análisis de inmunofluorescencia con embriones de *G. gallus* en estadio HH23, HH25 y HH30.

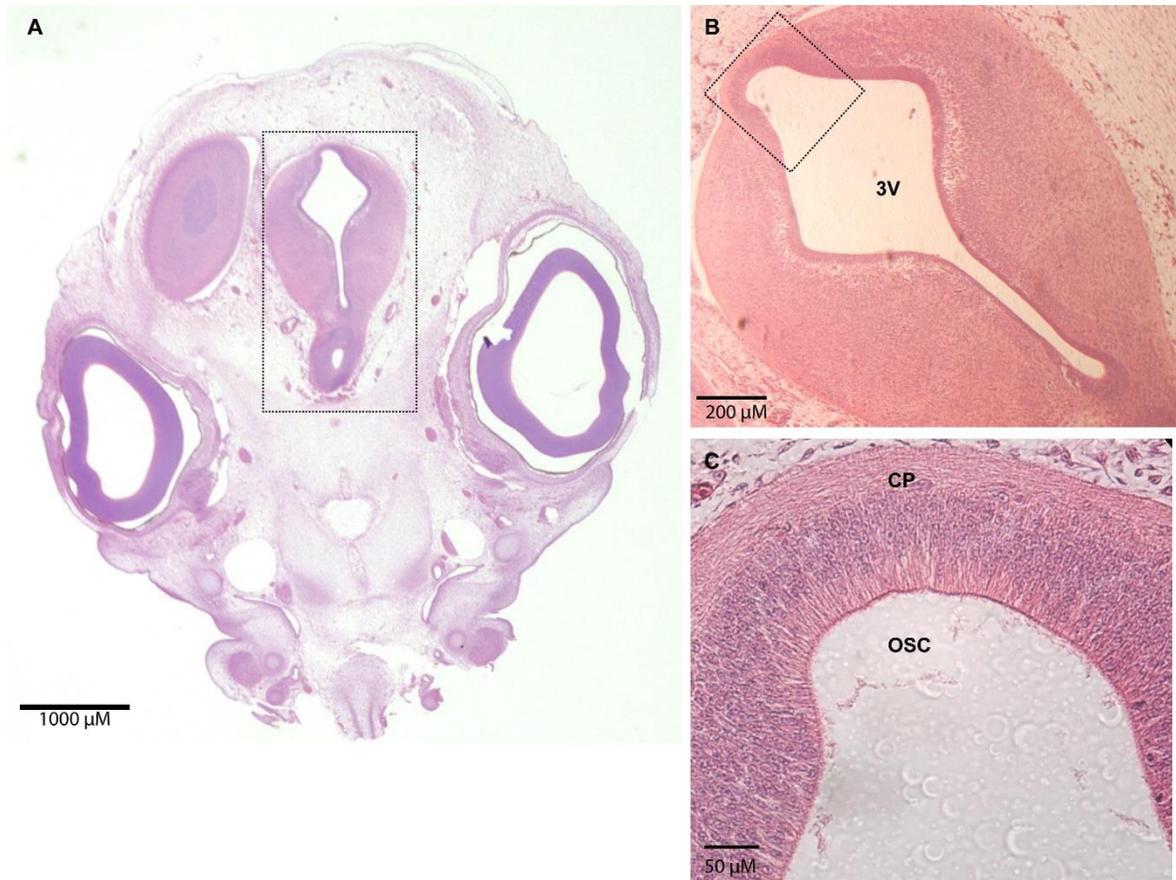
Mediante la tinción de H-E de secciones sagitales de cuerpo completo de embriones de *G. gallus* en estadio HH25 se observa las tres grandes vesículas o cavidades del cerebro, el telencéfalo, diencefalo y mesencefalo que se encuentran en contacto con el LCR<sub>e</sub> (fig. 31 A). Con mayor aumento se logra identificar el primordio de glándula pineal en la región caudal del diencefalo y el primordio de OSC en el límite con el mesencefalo (fig. 31 B). En la figura 31 C se delimitan en línea punteada los axones comisurales que forman la comisura posterior que pasan desde un hemisferio cerebral a otro. Por otro lado, en la región más apical se encuentran las células endocelómicas del OSC.

Mediante secciones frontales de la cabeza del embrión a nivel de diencefalo caudal, (fig. 32 A) se observa la región del diencefalo que contacta el 3 ventrículo donde se encuentra el OSC (fig. 32 B). Las células del OSC en estadio diferenciado (HH30) tienen una disposición de células de la glía radial, que contacta con el tercer ventrículo a través de su membrana apical y tiene un proceso basal que pasa entre los axones de la comisura posterior y se ancla a la membrana limitante externa (fig. 32).



**Figura 31.** Tinción de Hematoxilina-Eosina de secciones sagitales de primordio de OSC en estadio HH25.

A: embrión completo en orientación sagital, recuadro negro delimita el OSC. B: punta de flecha negra indica el primordio de la glándula pineal. C: las elipses punteadas corresponden a los axones comisurales de la comisura posterior por sobre el OSC. TEL: telencéfalo, DI: diencéfalo, OSC: órgano subcomisural, MES: mesencéfalo, CP: comisura posterior.

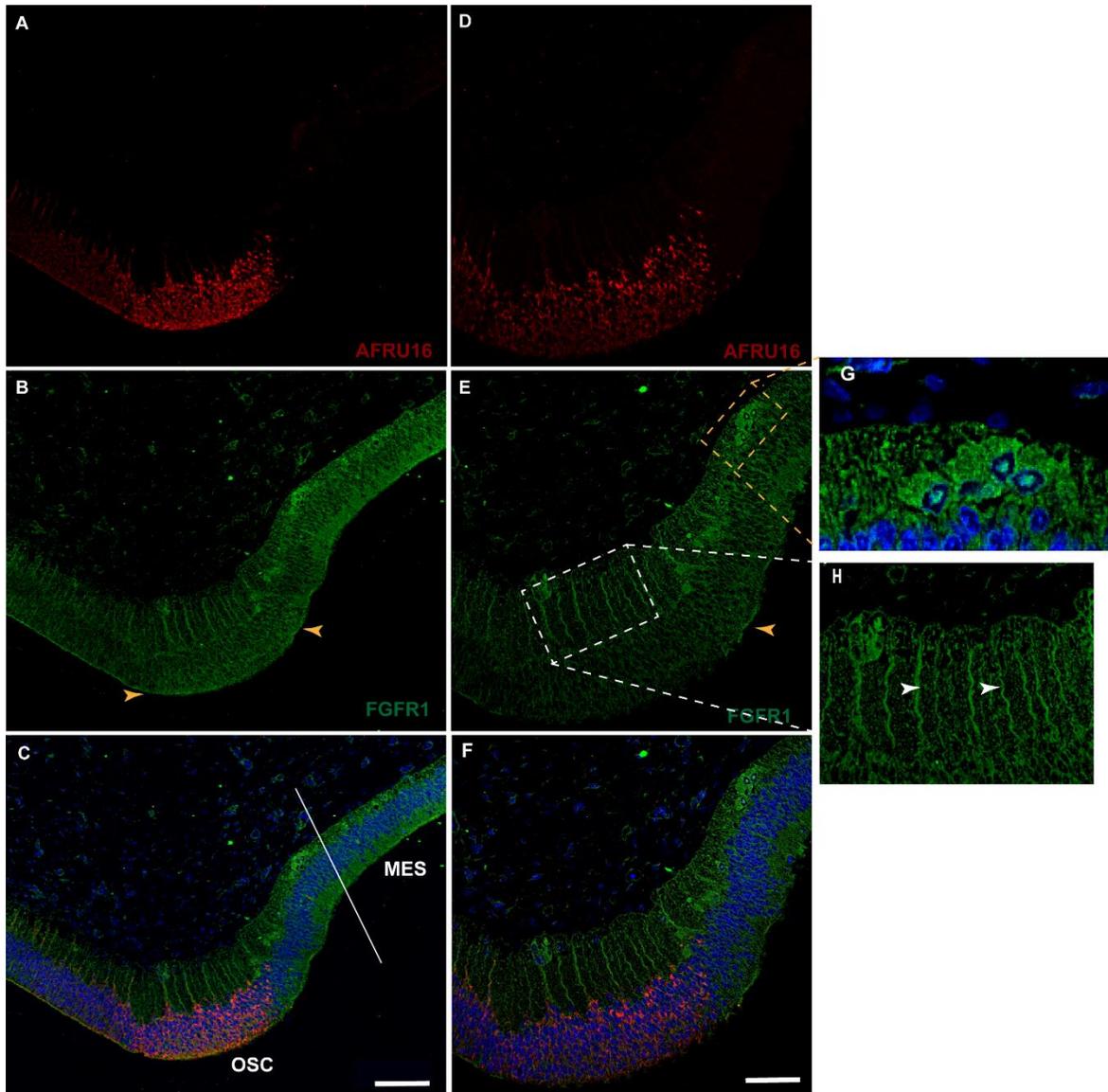


**Figura 32.** Tinción de Hematoxilina-Eosina de secciones frontales de OSC en estadio HH30.

A: Cabeza de embrión de *G. gallus* en orientación frontal, recuadro negro delimita la región del 3V y la placa del techo donde se encuentra el OSC. B: ampliación de recuadro de A. C: región del techo diencefálico donde se encuentra el OSC formado por células de la glía radial y se puede observar los axones comisurales cruzando de un hemisferio a otro. OSC: órgano subcomisural, CP: comisura posterior.

#### **4.3.1 Análisis de expresión de FGFR1 en el OSC**

Con el fin de caracterizar la distribución de la expresión de FGFR1 en el techo diencefálico de embriones *G. gallus* se analizó el estadio HH30, el cual muestra una leve presencia de esta proteína hacia la región apical del diencefalo caudal (fig. 33 B y E). Con mayor aumento se observa que las proyecciones de las células gliales hacia la comisura posterior y algunas neuronas limítrofes entre el OSC y la región mesencefálica expresan FGFR1. Si bien la localización esperada del receptor es en la membrana de las células, también se aprecia expresión en el núcleo celular (figura 33 E). La expresión de la proteína OSC-espondina detectada con AFRU16 es específica de las células de la glía radial del OSC, en la figura 33 A y D se puede observar la expresión en la región apical del diencefalo.



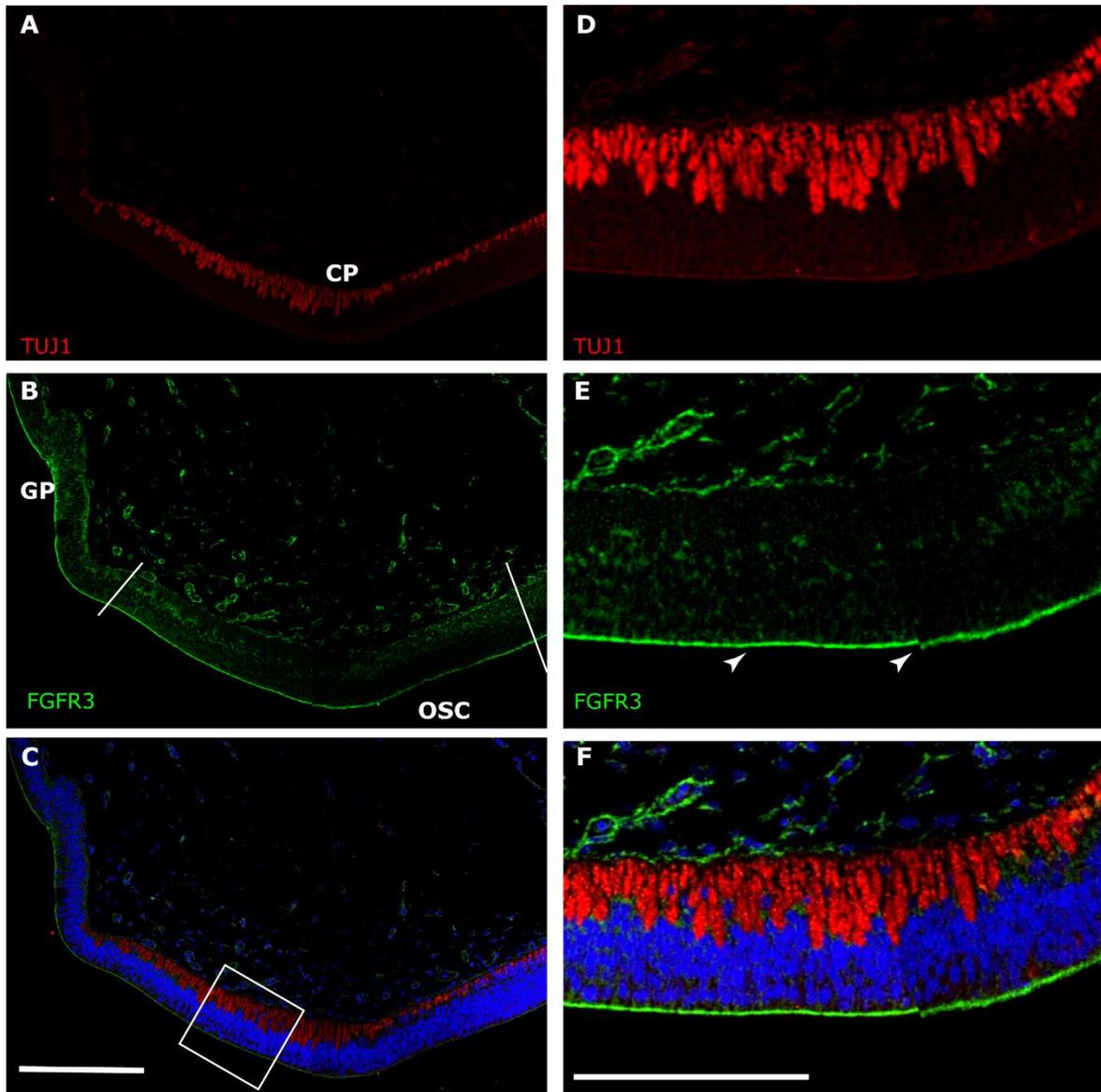
**Figura 33.** Inmunofluorescencia de FGFR1 de secciones sagitales de primordio de OSC en estadio HH30 mediante microscopia Confocal.

Análisis de expresión de OSC-espondina (A y D), FGFR1(B, E, G y H), núcleos en azul (TOPRO) y merge (C y F) en la sección sagital del techo diencefálico de embriones *G. gallus* en estadio HH30 con aumento 25x (panel izquierdo) y 40x (panel derecho). B y E: las puntas de flechas amarillas muestran la expresión apical del receptor. E: recuadro amarillo muestra la expresión de FGFR1 en el núcleo de las células y en azul el marcador TOPRO, ampliación digital en G. El recuadro blanco muestra las proyecciones basales de las células de la glía radial, ampliación digital de proyecciones basales (recuadro en E). OSC: órgano subcomisural, MES: mesencéfalo. La barra de escala en C: 100  $\mu$ M; F: 50  $\mu$ M.

#### **4.3.2 Análisis de expresión de FGFR3 en el OSC**

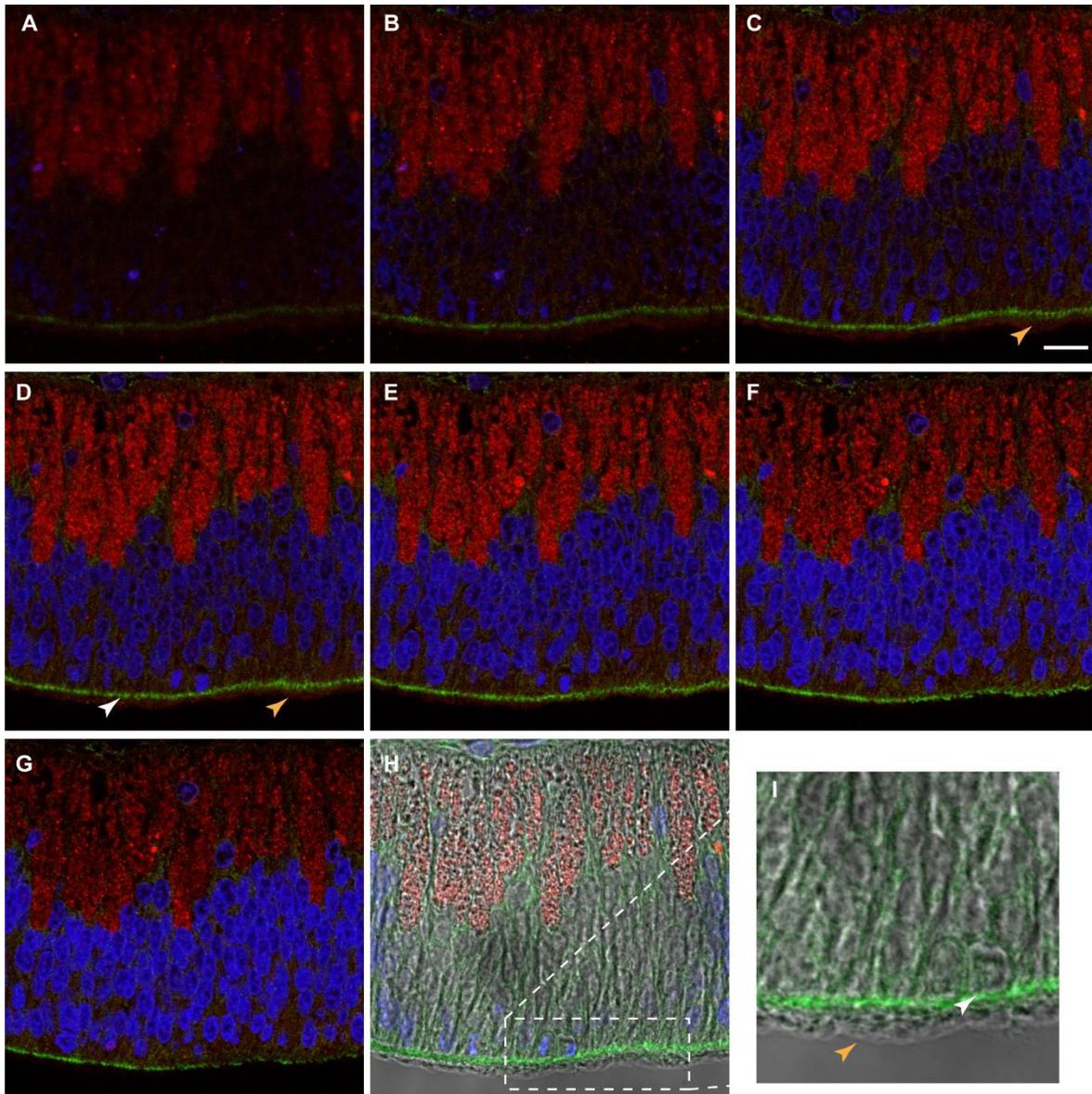
La distribución de FGFR3 en el techo diencefálico de embriones de *G. gallus* fue analizada en dos estadios, HH25 y HH30, mediante secciones sagitales y frontales.

En secciones sagitales en el estadio HH25, la expresión de FGFR3 es distintiva y marcadamente apical en todo el techo diencefálico, además de estar presente en la región de la glándula pineal (figura 35 B). Al ampliar la visualización y aplicar análisis de Z-stack, se confirma que la expresión se mantiene en la membrana apical de las células del neuroepitelio del OSC, estableciendo contacto con el líquido cefalorraquídeo (figura 34 E y G), y no se observa en los cilios apicales que forman parte de la estructura de las células de la glía radial (figura 35). La expresión de TUJ1, que identifica tubulina BIII es un marcador de neuronas, por lo que en rojo se destaca la comisura posterior (figura 34 A y D).



**Figura 34.** Inmunofluorescencia de FGFR3 de secciones sagitales de primordio de OSC en estadio HH25 mediante microscopia Confocal.

Análisis de expresión de TUJ1 (A y D), FGFR3 (B y E), núcleos en azul (TOPRO) y merge (C, F y G) en la sección sagital del techo diencefálico de embriones *G. gallus* en estadio HH25 con aumento 10x (panel izquierdo), 25x (panel derecho). E: Las puntas de flechas muestran la expresión apical de FGFR3 en el neuroepitelio, recuadro blanco muestra la ampliación de la región apical del neuroepitelio en el OSC mostrado en la imagen E. GP: glándula pineal, OSC: órgano subcomisural, MES: mesencéfalo. La barra de escala en ambas fotografías es 200  $\mu$ M

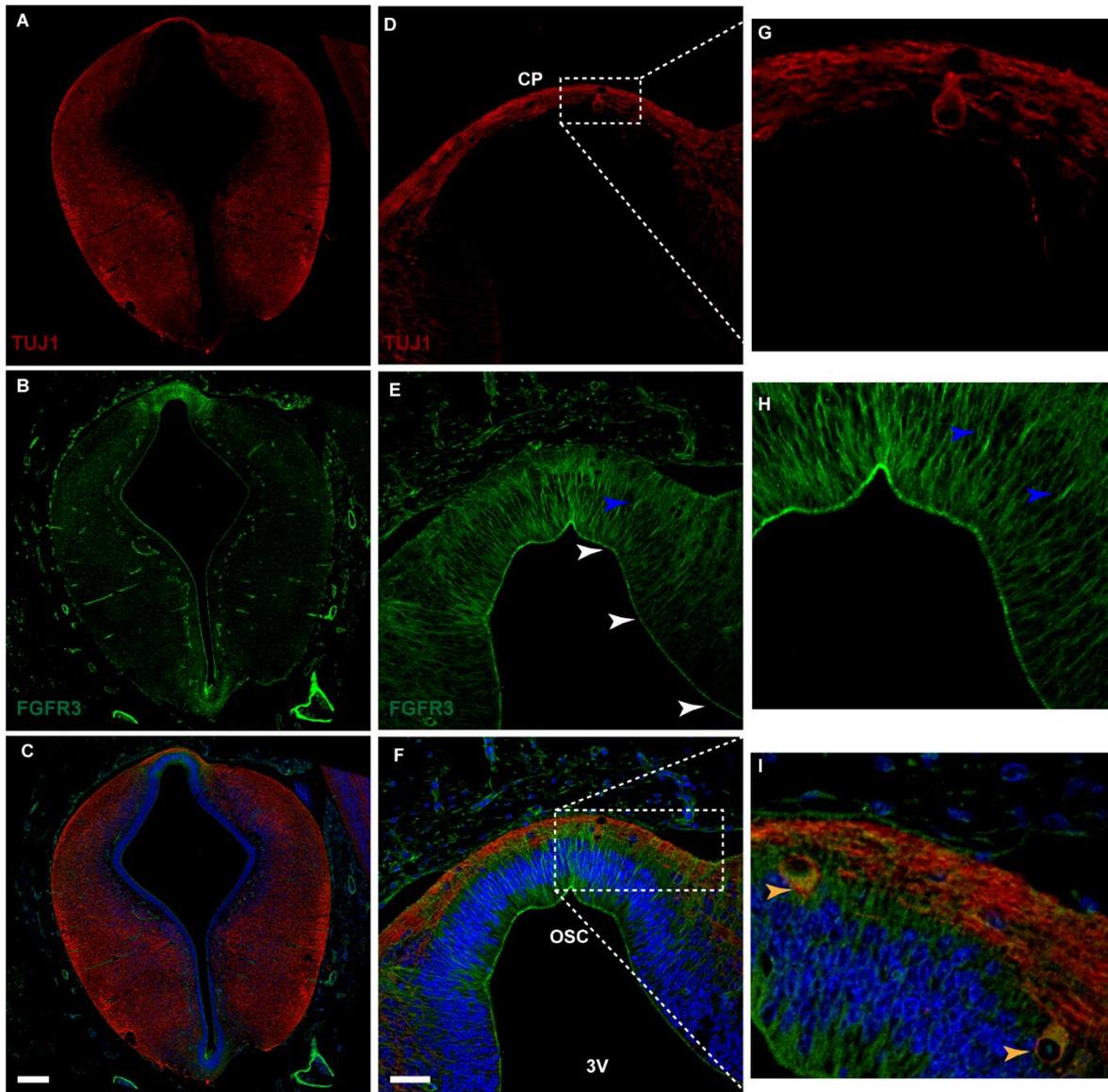


**Figura 35.** Z-stack de Inmunofluorescencia de FGFR3 de secciones sagitales de primordio de OSC en estadio HH25 mediante microscopia confocal.

Análisis de expresión de TUJ1 (rojo), FGFR3 (verde), núcleos (azul) del OSC con aumento 63x. Las puntas de flechas blancas muestran la expresión apical de FGFR3 en el neuroepitelio, pero no en la región de los cilios (puntas de flechas amarillas). Panel H-I: imagen de máxima proyección con luz blanca, recuadro en blanco muestra una ampliación de la membrana apical en el que se distingue la membrana de las células de la glía radial que expresan FGFR3 y los cilios. La barra de escala 10  $\mu$ M.

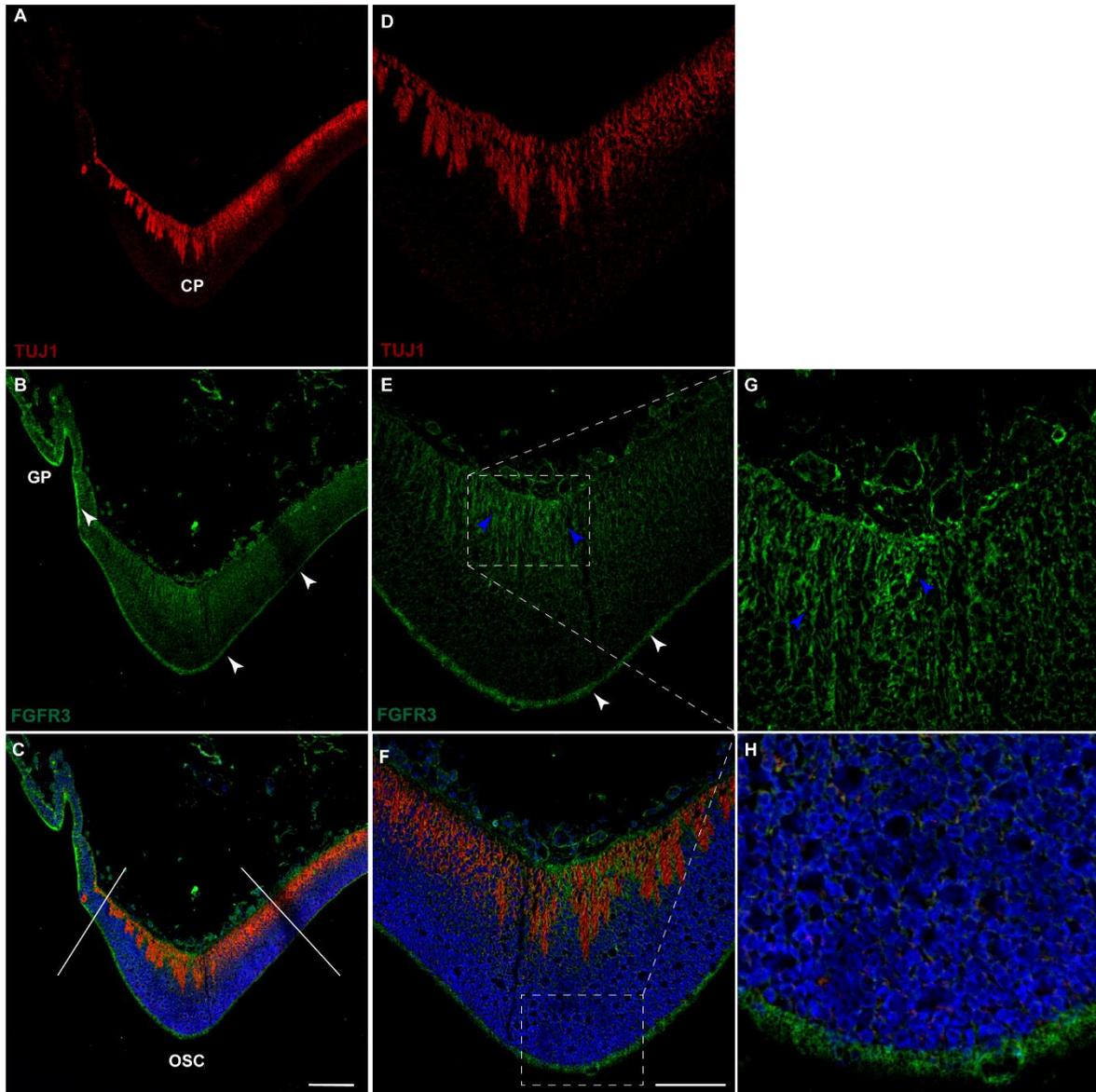
En el estadio HH30, en secciones frontales, la proteína FGFR3 exhibe una expresión apical que no solo se restringe a las células de la glía radial en el OSC (como se observó en el estadio HH25), sino que también se extiende por todo el neuroepitelio en contacto con el tercer ventrículo (figura 36 B y E). Además, en este estadio se puede observar la expresión en las proyecciones basales de las células ependimales del OSC, (figura 36 E y F). Al igual que en caso de FGFR1, también se identificaron neuronas positivas para TUJ1 que expresan FGFR3 en la región cercana a la comisura posterior, sin embargo, su expresión es solo de membrana. Por último, es posible identificar los axones comisurales que cruzan de un hemisferio cerebral a otro, marcados con TUJ1 (figura 36 A y D).

En las secciones sagitales de embriones de *G. gallus* en el estadio HH30, se conserva la expresión apical de FGFR3 en todo el techo diencefálico, mostrando un nivel particularmente elevado en la región de la glándula pineal (figura 37 B). Tal como se observó en la figura anterior (figura 36 E), el receptor también se expresa en las proyecciones basales de las células ependimales del OSC, estableciendo contacto con las meninges (figura 37 F y G).



**Figura 36.** Inmunofluorescencia de FGFR3 de secciones frontales de primordio de OSC en estadio HH30 mediante microscopia Confocal.

Análisis de expresión de TUJ1 (A, D y G), FGFR3 (B, E y H), núcleos en azul (TOPRO) y merge (C, F e I) en sección frontal del techo diencefálico de embriones *G. gallus* en estadio HH30 con aumento 10x (panel izquierdo) y 25x (panel derecho). Recuadro blanco muestra la ampliación de los axones comisurales y neuroblasto, ampliación digital en G. Las puntas de flechas blancas muestran la expresión apical de FGFR3 en las células ependimales en contacto con el tercer ventrículo y las azules la expresión en las proyecciones basales (E), ampliación digital en H. En imagen F-I se observa la expresión de FGFR3 en un grupo neuronal ubicado en la región de cercana a la comisura posterior en el OSC CP: comisura posterior, OSC: órgano subcomisural, 3V: tercer ventrículo. La barra de escala en C 200  $\mu$ M, F:20  $\mu$ M.



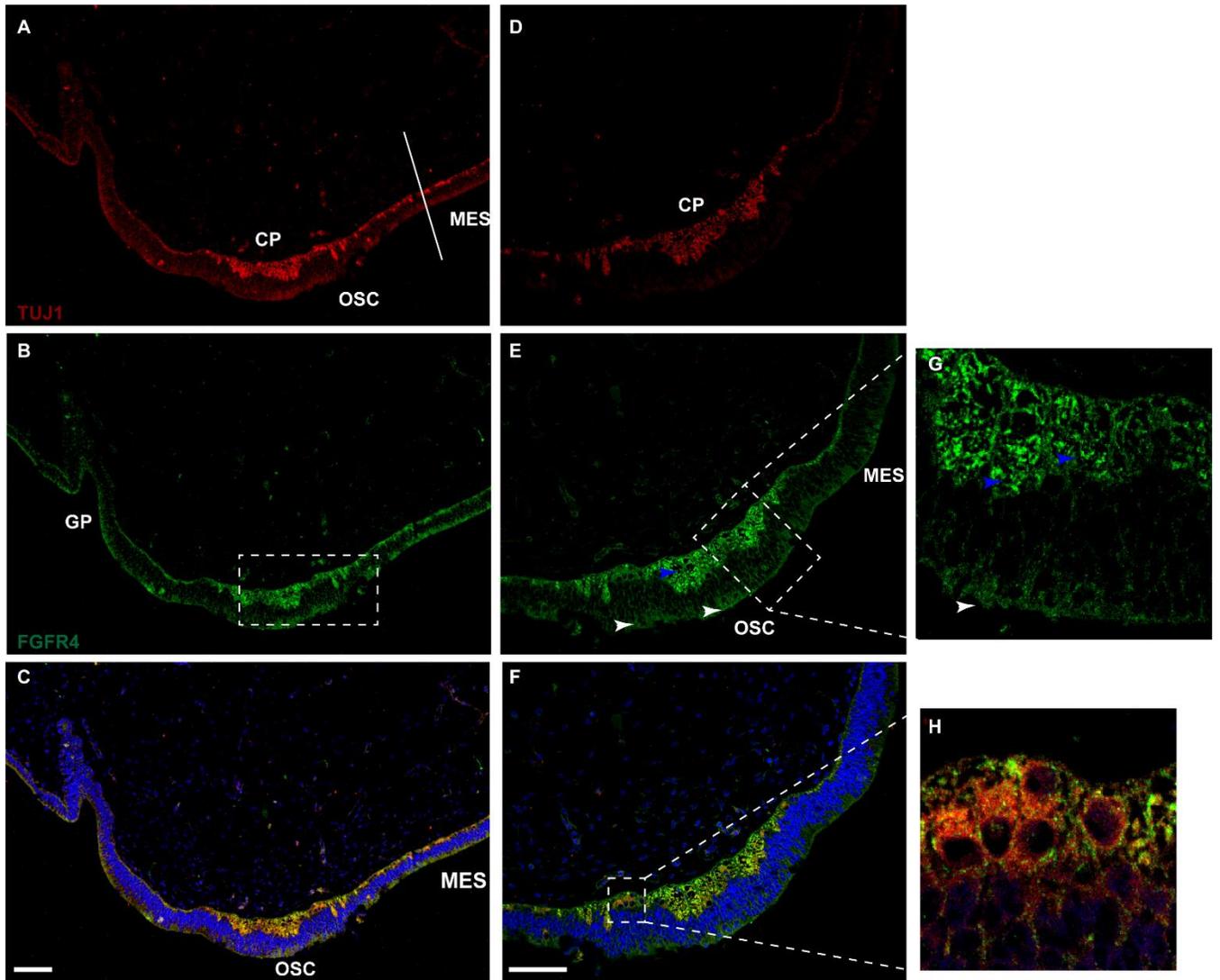
**Figura 37.** Inmunofluorescencia de FGFR3 de secciones sagitales de primordio de OSC en estadio HH30 mediante microscopia Confocal.

Análisis de expresión de TUJ1 (A y D), FGFR3 (B y E), núcleos en azul (TOPRO) y merge (C, F y G) en sección sagital del techo diencefálico de embriones *G. gallus* en estadio HH30 con aumento 10x (panel izquierdo) y 25x (panel derecho). Las puntas de flechas azules indican las proyecciones basales de las células de la glía radial en la comisura posterior en E, ampliación digital en G. Las flechas blancas (E) y recuadro blanco (F-H) muestran la expresión apical de FGFR3 en las células endocelulares en contacto con el tercer ventrículo y fuertemente en la región apical de la glándula pineal. Recuadro blanco muestra la expresión de FGFR3 en las proyecciones basales de las células endocelulares del OSC y en contacto con las meninges. CP: comisura posterior, OSC: órgano subcomisural. La barra de escala en C 100  $\mu$ M, F:50  $\mu$ M.

### **4.3.3 Análisis de expresión de FGFR4 en el OSC**

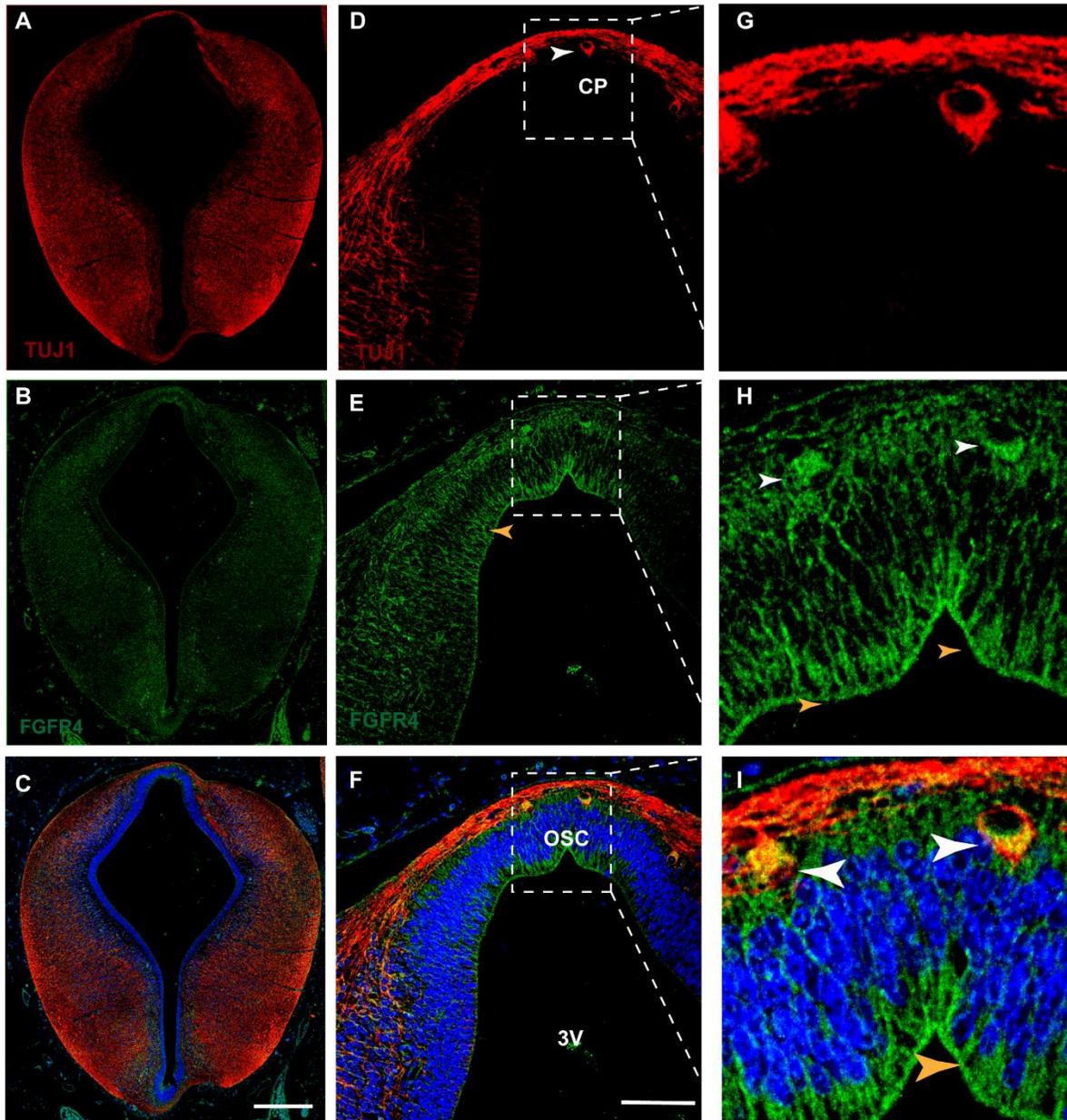
El análisis de inmunofluorescencia para estudiar la localización de FGFR4 se realizó en estadio HH25 y HH30. En el estadio HH25, en secciones sagitales, se observó una inmunoreacción principalmente en cuerpos celulares positivos también para TUJ1, por lo pudieran ser células tipo neuroblasto. Estos cuerpos celulares se encuentran en el límite con el mesencéfalo en la placa del techo, en contacto con los axones comisurales (figura 38). En comparación con los otros receptores, tanto en las secciones sagitales como en las frontales, FGFR4 muestra una expresión apical reducida (figuras 38 y 39).

En el estadio HH30, la expresión de FGFR4 se mantiene en las células positivas para TUJ1, ubicadas en la región basal del OSC en contacto con la comisura posterior (figura 39).



**Figura 38.** Inmunofluorescencia de FGFR4 de secciones sagitales de primordio de OSC en estadio HH25 mediante microscopia Confocal.

Análisis de expresión de TUJ1 (A y D), FGFR4 (B, E y G), núcleos en azul (TOPRO) y Merge (C, F y H) en la sección sagital del techo diencefálico de embriones *G. gallus* en estadio HH25 con aumento 10x (panel izquierdo), 25x (panel central) y 63x (panel izquierdo). Las puntas de flechas azules muestran la expresión de FGFR3 en neuronas TUJ1 positivas que se ubican en la región del OSC que limita con el mesencéfalo. GP: glándula pineal, CP: comisura posterior OSC: órgano subcomisural, MES: mesencéfalo. La barra de escala en C: 100  $\mu$ M, en F: 50  $\mu$ M.



**Figura 39.** Inmunofluorescencia de FGFR4 de secciones frontales de primordio de OSC en estadio HH30 mediante microscopia Confocal.

Análisis de expresión de TUJ1 (A, D y G), FGFR4 (B, E y H), núcleos en azul (TOPRO) y merge (C, F e I) en sección frontal del techo diencefálico de embriones *G. gallus* en estadio HH30 con aumento 10x (panel izquierdo), 25x (panel central) y ampliación digital de 25x (panel izquierdo). Las puntas de flechas amarillas muestran la expresión apical de FGFR4 en las células ependimales en contacto con el tercer ventrículo, las puntas de flechas blancas muestran la expresión en un neuroblasto (TUJ1 positivo) y FGFR3 positiva. CP: comisura posterior, OSC: órgano subcomisural, 3V: tercer ventrículo. La barra de escala en C 200  $\mu$ M, F:20  $\mu$ M.

## 5 DISCUSIÓN

El Órgano Subcomisural es una glándula cerebral que presenta una serie de características únicas. En primer lugar, su ubicación precisa es en el límite entre el diencéfalo y el mesencéfalo, justo bajo la comisura posterior (Gobron et al. 1999; Sepúlveda et al. 2021). Además, las células de la glía radial presentes en el OSC establecen contacto directo en su superficie apical con el área ventricular, permitiéndoles detectar las propiedades y composición del líquido cefalorraquídeo (LCR). Por otro lado, a través de sus proyecciones basales, el OSC establece conexiones con vasos sanguíneos y la lámina terminal, que se comunica con el espacio subaracnoideo, lo que le permite potencialmente recibir y transmitir señales endocrinas (Sepúlveda et al. 2021). Una notable característica del OSC es la diversidad de receptores que han sido identificados (Estivill-torrús et al. 2001; Grondona et al. 2012). Además, se ha identificado la secreción al LCR de una proteína llamada OSC-espondina, que exhibe actividad neurodiferenciadora (Guiñazú, Richter, and Rodríguez 2002; Meiniel 2001; Meiniel and Meiniel 2006; Vera et al. 2013). Por último, en etapas tempranas del desarrollo, se ha demostrado que una expresión de factores de transcripción diferenciada en la zona del OSC (Estivill-Torrús et al. 2001; Fernández-Llebrez et al. 2004; Ferran et al. 2007).

Estos antecedentes permiten sugerir que el OSC actuaría como un organizador secundario cerebral, los cuales se caracterizan por: estar en el límite de las vesículas encefálicas, liberar morfógenos diferenciadores y expresar factores de transcripción característicos. En relación con esto, en la presente tesis nos

propusimos caracterizar el transcriptoma del OSC en dos estadios, un estadio temprano HH23 (4 días de desarrollo), en donde predomina la proliferación celular y HH30 (7 días de desarrollo), en donde las células se hallan como glía radial.

#### OSC en estadio HH23: Proliferativo y Secretor

El cerebro en el estadio HH23 se encuentra mayormente en un estado de proliferación celular, como se ha documentado en investigaciones previas (Gato et al. 2005). Por lo tanto, era razonable anticipar que el OSC en este estadio también exhibiera un alto potencial proliferativo, lo cual se reflejó en la clasificación de ontología génica. Por otro lado, es relevante destacar que en el enriquecimiento génico de este estadio se identificaron numerosos componentes relacionados con la membrana y la secreción extracelular, incluyendo receptores de membrana y elementos de la matriz extracelular.

Un ejemplo específico es la proteína de unión al retinol (RBP-3), que se encontró enriquecida en este estadio. En este contexto, investigaciones previas que evalúan la composición del líquido cefalorraquídeo de embriones de pollo (Parada et al. 2006) y de ratas (Parada, Gato, and Bueno 2005) han demostrado su presencia en estadios que abarcan desde HH20 hasta HH24. La proteína RBP no solo es crucial en el transporte del retinol, un morfógeno crucial en la formación de patrones anteroposterior y dorsoventral, también se ha reconocido su participación en la neurodiferenciación (Maden 2002; Parada, Gato, and Bueno 2008).

Adicionalmente, se observó que ciertos componentes de la vía de señalización WNT, como WNT4 y WNT9B, estaban enriquecidos en el OSC en el estadio HH23.

Sin embargo, es importante señalar que hasta ahora solo se ha descrito a WNT4 como un componente del LCR<sub>e</sub>, secretado por los plexos coroideos. Se ha demostrado que WNT4 desempeña una función en la proliferación y diferenciación celular en este contexto (Fame and Lehtinen 2020; Johansson et al. 2013). Dentro de otra familia enriquecida y estudiada por nuestro laboratorio encontramos las apolipoproteínas (APOA1), que también han sido descrita en el LCR<sub>e</sub> (Parada et al. 2006, 2005), y que desempeñan funciones claves en el desarrollo del sistema nervioso como transportador y modulador de la neurogénesis (Fame and Lehtinen 2020; Kaiser et al. 2019; Pinson et al. 2000; Vera et al. 2015).

Finalmente, entre las moléculas que no se categorizan como morfógenos clásicos ni transportadores, identificamos la autotaxina o ENPP2 y LOXL2 en el enriquecimiento del estadio HH23. La autotaxina es una enzima lisofosfolipasa extracelular que regula la generación de moléculas de ácido lisofosfatídico (LPA) (Liu et al. 2009), las cuales desempeñan un papel fundamental en la diferenciación de oligodendrocitos. Aunque el origen de su secreción aún no está completamente claro (Yuelling et al. 2012) varios autores proponen mecanismos principalmente autocrinos. Sin embargo, recientes investigaciones sugieren que el mecanismo paracrino también puede ser relevante (Saunders et al. 2011; Yuelling et al. 2012).

LOXL2 es una amina oxidasa dependiente de cobre que se secreta y se ha asociado con la remodelación de la matriz extracelular, particularmente en la transición epitelio-mesénquima en células cancerosas (Kim, Kim, and Kim 2011). Aunque su función en el desarrollo del sistema nervioso está empezando a ser estudiado (Almazroea 2023), cabe resaltar que interacciona con la histona H3 (Herranz et al.

2016). Estudios recientes de nuestro laboratorio han indicado la presencia de esta histona en el LCR<sub>e</sub>, aunque no se ha publicado esta información.

Estos datos sugieren la posibilidad de que el OSC en el estadio HH23 y posiblemente en estadios anteriores funcione como un centro secretor de proteínas esenciales hacia el LCR<sub>e</sub>, las cuales estarían involucradas en procesos de proliferación, diferenciación y supervivencia en etapas tempranas del desarrollo cerebral.

La data obtenida por RNAseq en el OSC HH23 es una valiosa aproximación para entender el papel que juega esta glándula durante el desarrollo embrionario temprano, sin embargo, es fundamental reconocer las limitaciones inherentes de este estudio. La comparación se llevó a cabo exclusivamente con muestras de OSC en el estadio HH30, ya que no se contaba con muestras de cerebro completo HH23 en los datos públicos. Esta limitación podría introducir cierto sesgo en el análisis. A pesar de ello, es importante destacar las tasas de confiabilidad de las anotaciones y la coherencia entre los resultados obtenidos mediante análisis histológicos y transcriptómicos previos, lo que apoyan las conclusiones extraídas de los datos de RNAseq.

### OSC en estadio HH30: Célula de la glía radial secretora

Con relación al OSC en el estadio HH30, se observó que la expresión génica de las células neuroepiteliales experimentó una transformación desde un estado proliferativo (HH23) hacia un estado diferenciado, donde las células han adquirido características de la glía radial, actuando como un estado intermedio entre el neuroepitelio y la etapa neuronal. Para analizar los datos obtenidos de RNAseq, se emplearon dos enfoques distintos para el enriquecimiento de genes en este estadio, mediante la primera aproximación, en la que comparamos OSC en estadio HH23 con HH30, y para la segunda, se utilizó la data pública disponible en NCBI de cerebro completo de embriones en estadio HH30 para comparar con OSC en HH30. Si bien ambos análisis convergen en el enriquecimiento de los mismos procesos biológicos que se mencionaron previamente, al comparar los estadios del OSC utilizando la primera aproximación, la cantidad de genes diferencialmente expresados es menor ( $n=224$  DEG) que la segunda aproximación ( $n=1110$  DEG), esto se podría explicar por la calidad de la secuenciación de la data pública utilizada. Cabe recalcar que las muestras fueron normalizadas y se consideraron las diferencias metodológicas existentes, sin embargo, es necesario validar la expresión diferencial de los genes analizados para una mejor comprensión. Ahora bien, esta aproximación compara con el cerebro en el mismo estadio, lo que pertenece al universo muestral, por lo tanto, nos enfocaremos en el análisis de estos resultados.

Los análisis de ontología génica del OSC en el estadio HH30 indican el enriquecimiento de procesos de desarrollo de sistema nervioso que incluyen

procesos de especificación de patrones, neurogénesis y guía axonal. Si bien en el OSC como tal no se han descrito procesos de neurogénesis o de especificación de patrones o no se han estudiado hasta la fecha, esto podría indicar que el OSC podría estar regulando estos procesos en tejidos cercanos. De hecho, en nuestro laboratorio ha sido arduamente estudiada la proteína de secreción OSC-espondina que es secretada al LCR<sub>e</sub> desde estadios tempranos y estudios de pérdida de función demuestran su potencial neurogénico (Sepúlveda et al. 2021; Vera et al. 2013). El OSC se establece en una región estratégica en el techo diencefálico, bajo la comisura posterior, una región donde los axones cruzan desde un hemisferio cerebral a otro (Sepúlveda et al. 2021), lo hace un regulador perfecto de la guía axonal. Al respecto, nuestros análisis bioinformáticos muestran la expresión diferencial de proteínas clásicas de guía axonal como semaforinas y efrinas, de las cuales nuestro laboratorio previamente ha descrito la presencia del receptor de efrina EphA7 en la placa del techo diencefálica (Stanic et al. 2014).

Si bien en el estadio HH23, también encontramos enriquecimiento de la región extracelular en el término de compartimento celular, en el estadio HH30 la tasa de enriquecimiento es mayor, pasando de 1.7 a 2.3, respectivamente; e incluye exclusivamente movimiento de moléculas hasta membrana celular, espacio extracelular, proteínas integrales de membrana y superficie celular. Esto nos indica que en este estadio el OSC, es una glándula altamente secretora y dada su morfología constituida de células de la glía radial, podría estar secretando hacia la cara ventricular o hacia los vasos sanguíneos por sus procesos basales (Estivill-torrús et al. 2001; Rodríguez et al. 1992; Rodríguez, Rodríguez, and Hein 1998).

Nuestros análisis mostraron que el termino más enriquecido es matriz extracelular, donde estudios en estadios tempranos han demostrado la importancia de estas moléculas para la formación de gradientes de concentración de morfógenos (Yan and Lin 2009), migración celular (Long and Huttner 2019; Mercurio 2004) e incluso para la señalización de receptores (Schlessinger et al. 2000b). Dentro de los más enriquecidos se encuentran las proteínas ADAMTS8 y ADAMTS15, conocidas metaloproteasas que degradan componentes de la matriz como agreganos (Jones and Riley 2005). Si bien no se ha descrito a estos miembros en el cerebro, diversos estudios han demostrado la importancia en la de la escisión proteolítica de Reelin por ADAMTS4-5 (Krstic, Rodriguez, and Knuesel 2012). Al respecto un estudio reciente ha descrito las funciones de ADAM en el clivaje de la región extracelular de numerosos receptores de tirosina quinasa como FGFR, receptores Eph, VEGFR, entre otros; lo que genera una regulación negativa de la señalización, actuando como dominante negativa del receptor (Degnin, Laederich, and Horton 2011; Huang 2021).

Por otro lado, la familia de fibulinas (FBLN), glicoproteínas secretadas que pueden unir calcio e interactuar con muchas otras proteínas como la laminina e integrinas (Sicot et al. 2023), se encuentran enriquecidas en este estadio. En particular la FBLN2 ha sido estudiada en modelos in vitro actuando en forma sinérgica con la semaforina 3A como repelente del crecimiento axonal (Schaeffer et al. 2018). También se ha identificado en procesos patológicos como la depresión, donde se encuentra regulada a la baja (Turner et al. 2014) y un aumento en su expresión luego de lesiones cerebrales y médula espinal (Schaeffer et al. 2018).

Dentro de las vías de señalización reguladas al alza, se encuentra la vía de señalización de WNT y BMP, ambos descritos como componentes claves en el desarrollo y presentes en el LCR<sub>e</sub> (Fame and Lehtinen 2020). Dentro de este estadio se encontró la expresión diferencial de 9 ligandos de WNTs. Se ha estudiado la importancia de las proteínas WNT en análisis con modelos hipomórficos, knock-down y out encontrando que la señalización de WNT es necesaria para la proliferación de la zona ventricular y la neurogénesis cortical correcta (Brafman and Willert 2017; Inestrosa and Varela-Nallar 2015; Zhou et al. 2006). Con respecto a algunos miembros, se sabe que WNT5A es secretado por el plexo coroideo hacia el LCR<sub>e</sub>, donde se asocia con lipoproteínas como APOA y APOE para su transporte (Kaiser et al. 2019). Análisis de knock-out condicionales en el plexo coroideo revelaron una morfogénesis aberrante, no afectando la proliferación ni supervivencia celular (Kaiser et al. 2019).

Además, nuestro análisis bioinformático encontró la expresión de los ARNm de BMP7 y BMP5 en el OSC en estadio HH30. Diversos estudios han demostrado la presencia de BMP7 en el LCR<sub>e</sub> (Ortega and Alcántara 2010; Segklia et al. 2012), mostrando que la pérdida de BMP7 resulta en una reducción del grosor cortical, debido a un aumento en la apoptosis y disminución de la proliferación celular (Segklia et al. 2012). Análisis de hibridación in situ han revelado la co-expresión de BMP2-7 en regiones críticas para el establecimiento de los plexos coroideos telencefálicos (Lun, Monuki, and Lehtinen 2015).

Finalmente, se encontró enriquecimiento de diversos factores de crecimiento como el factor de crecimiento derivado de plaquetas A (PDGF-A), factor de crecimiento

transformante beta 2 (TGFB2), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF19), factor de crecimiento similar al EGF que se une a la heparina (HBEGF). Sin embargo, no se han descrito funciones de estos factores en el LCR<sub>e</sub>, sino que en procesos de regeneración y patologías (Sepúlveda et al. 2021), excepto FGF19. El factor de crecimiento FGF19, es una hormona endocrina que se ha descrito como reguladora de procesos metabólicos relacionados con la obesidad (Hsuchou, Pan, and Kastin 2013).

Toda esta evidencia tomada en conjunto nos conduce a la conclusión de que el OSC opera como una glándula desde etapas tempranas del desarrollo, mediante liberación de morfógenos y moléculas de señalamiento. Esto se evidencia especialmente en la etapa HH30, donde se observa un notorio incremento en la actividad de las vías implicadas en la producción de moléculas secretadas. Ahora bien, queda por dilucidar hacia donde es secretada cada molécula y cómo el OSC es regulado para llevar a cabo esta función. No obstante, es fundamental tener en cuenta las limitaciones inherentes a este análisis transcriptómico, dado que la traducción de ARNm a proteínas no es un proceso absoluto (Liu, Beyer, and Aebersold 2016). Este aspecto fue abordado en un estudio realizado en 2015, el cual identificó una correlación significativamente mayor entre los genes con expresión diferencial detectados mediante RNA-seq y sus correspondientes productos proteicos, en comparación con los ARNm que no presentaban tal diferenciación (Koussounadis et al. 2015), indicando una alta predictibilidad entre los análisis transcriptómicos y la expresión proteica.

Al respecto, al analizar las cuantificaciones proteicas mediante western blot no se observan cambios significativos en la expresión, sin embargo, mediante el análisis transcriptómico del OSC, se observan cambios significativos. Esta discrepancia entre los niveles de ARNm-proteína pueden deberse a modificaciones postranscripcionales en las bases nucleotídicas (Boo and Kim 2020) y mecanismos regulatorios de la traducción que modulan el transporte desde el núcleo al citoplasma, la traducción y estabilidad del ARNm (Yu et al. 2015).

Otra consideración importante es la heterogeneidad celular en el OSC, ya que análisis previos de nuestro laboratorio han reportado expresión diferencial de diferentes moléculas presentando un patrón restringido espacio temporalmente (Stanic et al. 2014).

Es importante destacar que hasta la fecha no se han llevado a cabo investigaciones proteómicas centradas en el secretoma del OSC. Por lo tanto, se vuelve imperativo profundizar en el análisis de los distintos componentes de secreción liberados al LCR<sub>e</sub>. Este enfoque permitiría establecer posibles correlaciones entre los elementos proteicos presentes en el LCR<sub>e</sub> y aquellos que podrían ser secretados por el OSC.

#### Expresión de la familia de FGFs y FGFRs en el OSC en estadios tempranos

Diversos estudios han demostrado la relevancia de los FGFs en el desarrollo (Kumar et al. 2021) y en la regionalización del tubo neural (Mason 2007) durante estadios tempranos. Sin embargo, el entendimiento de los FGFR es limitado en

comparación con el conocimiento sobre los ligandos, debido a la redundancia funcional (Blunt et al. 1997; Leerberg et al. 2019) y al solapamiento de expresión (Blunt et al. 1997). A pesar de esto, diversas investigaciones han podido identificar funciones para los FGFRs, por ejemplo, el organizador ístmico, un centro organizador secundario es responsable de la diferenciación y la formación del patrón del mesencéfalo y el cerebelo a través de la secreción FGF8 (Pera et al. 2002). La generación de mutantes únicos para cada FGFR muestra fenotipos similares al *wild-type*, mientras que la generación de mutantes dobles y triples (FGFR1a, FGFR1b y FGFR2), muestran fenotipos similares al mutante *knock-out* de FGF8 con fenotipo acerebeloso y con defectos en el desarrollo del mesencéfalo (Leerberg et al. 2019).

Estudios en *Xenopus* muestran que FGFR1 y FGF8 pueden modular la guía de axones hacia el tectum óptico al influir en la expresión de *Slit1* (Atkinson-Leadbeater et al. 2010; Yang et al. 2018). El desarrollo de ratones KO condicionales para FGFR1 han demostrado su crucial participación en la formación de las tres principales comisuras cerebrales (cuerpo calloso, comisura hipocampal y comisura anterior) (Tole et al. 2006). En cuanto a su expresión cerebral, análisis de hibridación *in situ* en ratones adultos reveló un patrón característico de distribución de los receptores FGF. Mientras que los FGFR1-3 se expresan de manera amplia en el cerebro, la expresión de FGFR4 es restringida, limitándose al OSC y a la habénula medial (Hultman et al. 2019).

Considerando que la expresión de FGFs y FGFRs y los antecedentes previamente presentados con respecto al OSC como: I) estar ubicado en límites entre vesículas

cerebrales, II) presentar patrones de expresión diferencial de diversos factores de transcripción relacionados con la morfogénesis y III) la señalización mediante moléculas solubles; se decidió analizar la expresión de FGFs y FGFRs en la placa del techo diencefálica en estadios tempranos.

### Expresión de FGFR1 en el OSC

Los análisis transcriptómicos mostraron que FGFR1 no se expresa diferencialmente en el OSC en ninguno de los dos estadios analizados, con respecto a la muestra de cerebro HH30. Ahora bien, esto no significa que no se exprese en el OSC en ambos estadios, de hecho, los análisis de ARNm por RT-qPCR muestran que en el OSC en estadio HH23 existe una mayor expresión.

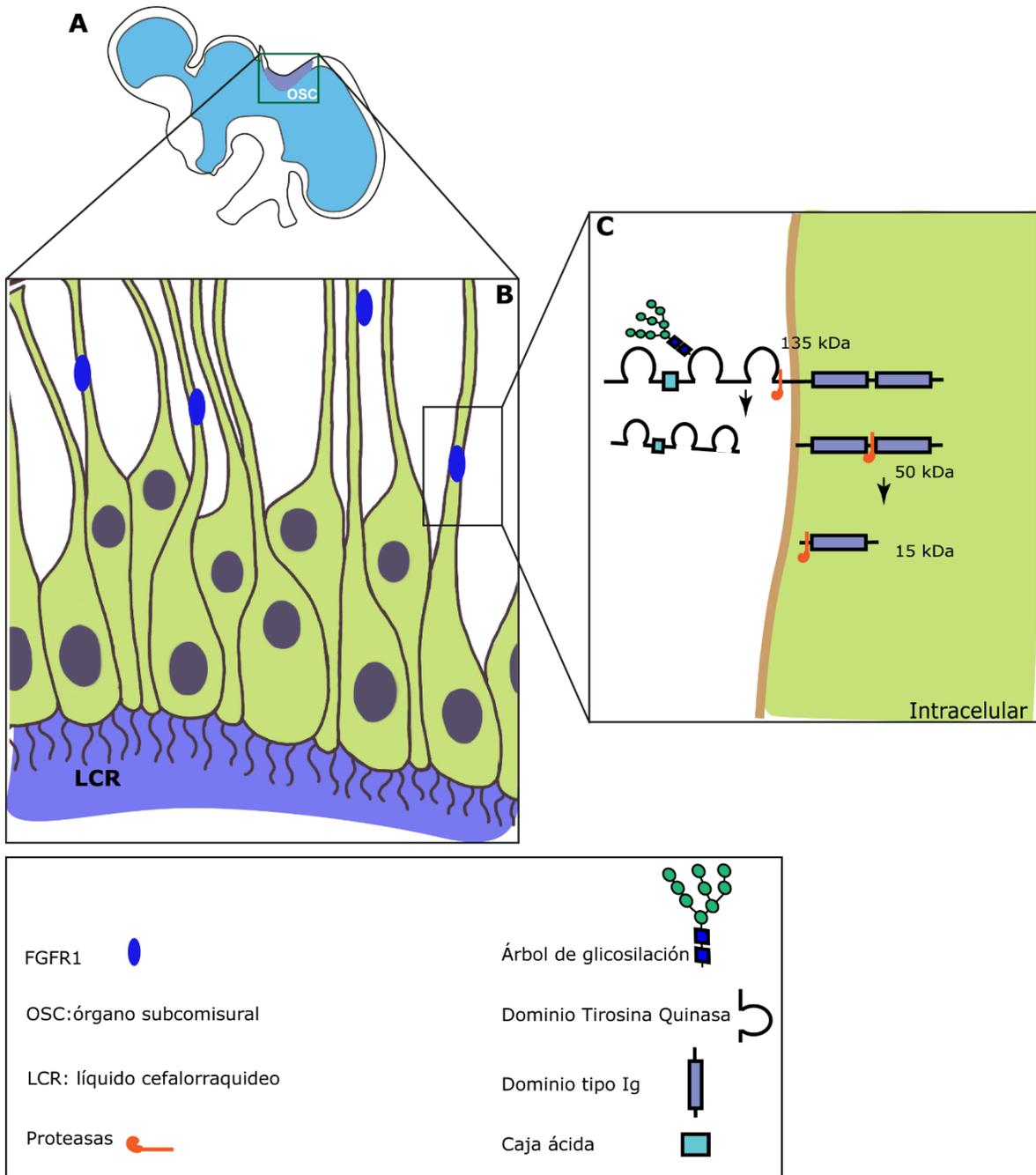
El receptor FGFR1, es una proteína con un peso aproximado de 110 KDa que está compuesta por tres dominios distintos. Nuestros análisis han revelado que en el OSC se expresan tres variantes diferentes de esta proteína. La variante de mayor peso molecular, alrededor de 135 KDa, podría estar relacionada con la glicosilación, ya que contiene posibles sitios de glicosilación. Es relevante señalar que la N-glicosilación del FGFR1 incrementa la velocidad de interacción con el ligando FGF2 y el heparán sulfato, proporcionándole una vía adicional para modular la señalización de FGF (Duchesne et al. 2006).

Las variantes más pequeñas, de alrededor de 50 y 15 KDa, podrían estar relacionadas con clivajes del receptor. No obstante, no es posible concluir a qué dominio corresponden, ya que no se especifica el sitio de reconocimiento del

anticuerpo. Este tipo de modificación postraduccional ha sido ampliamente documentada en la literatura (Huang 2021; Loeb, Harris, and Craik 2006). En este contexto, es importante resaltar que el ectodominio del FGFR1 desempeña un papel de regulación negativa en la señalización del receptor, ya que puede formar dímeros con el ectodominio de otro receptor (Hanneken, Mercado, and Maher 2021).

En cuanto a la distribución del receptor FGFR1 en la placa del techo diencefálica, se realizaron análisis exclusivamente en el estadio HH30 en sección sagital, lo cual reveló una expresión preponderante en las proyecciones basales de las células de la glía radial y algunas neuronas en la región mesencefálicas. Conforme a lo documentado en el estudio de hibridación in situ del 2019, FGFR1 no tiene una localización específica en el OSC (Hultman et al. 2019). Estos resultados concuerdan con lo reportado previamente, donde se ha descrito que la expresión de FGFR1 es ubicua en el cerebro de pollo, *Xenopus* y ratón y con altos niveles de expresión en el telencéfalo y diencefalo anterior en estadios tempranos del desarrollo (Groth and Lardelli 2002; Walshe and Mason 2000a).

Es relevante destacar que FGFR1 constituye un receptor transmembrana, no obstante, en los neuroblastos que limitan entre el OSC y el mesencéfalo se detecta una localización nuclear, lo cual ha sido reportado posterior a la dimerización de FGFR1 y al clivaje intracelular por proteasas donde podría jugar un rol incluso como factor de transcripción (Hanneken et al. 2021; Merilahti et al. 2017).



**Figura 40.** Representación de la posible localización de FGFR1 en células de la glía radial de OSC y sus posibles variantes.

En este esquema se resumen las variantes del receptor y su posible localización celular considerando nuestros análisis de western blot, inmunofluorescencia y lo reportado en la literatura. La representación en A muestra la localización de la expresión de FGFR1 con puntos de color azul en la placa del techo diencefálico, en la región del OSC que limita con el mesencéfalo. En B la ampliación de las células de la glía radial que forman el OSC, que expresan en sus prolongaciones basales el receptor. Finalmente, en C se presentan las variantes encontradas, la de mayor tamaño podría corresponder a la proteína glicosiladas,

mientras que las de menor tamaño 50 y 15 KDa. podrían corresponder a la región interna del receptor posterior al clivaje de la región extracelular y/o intracelular.

### Expresión de FGFR3 en el OSC

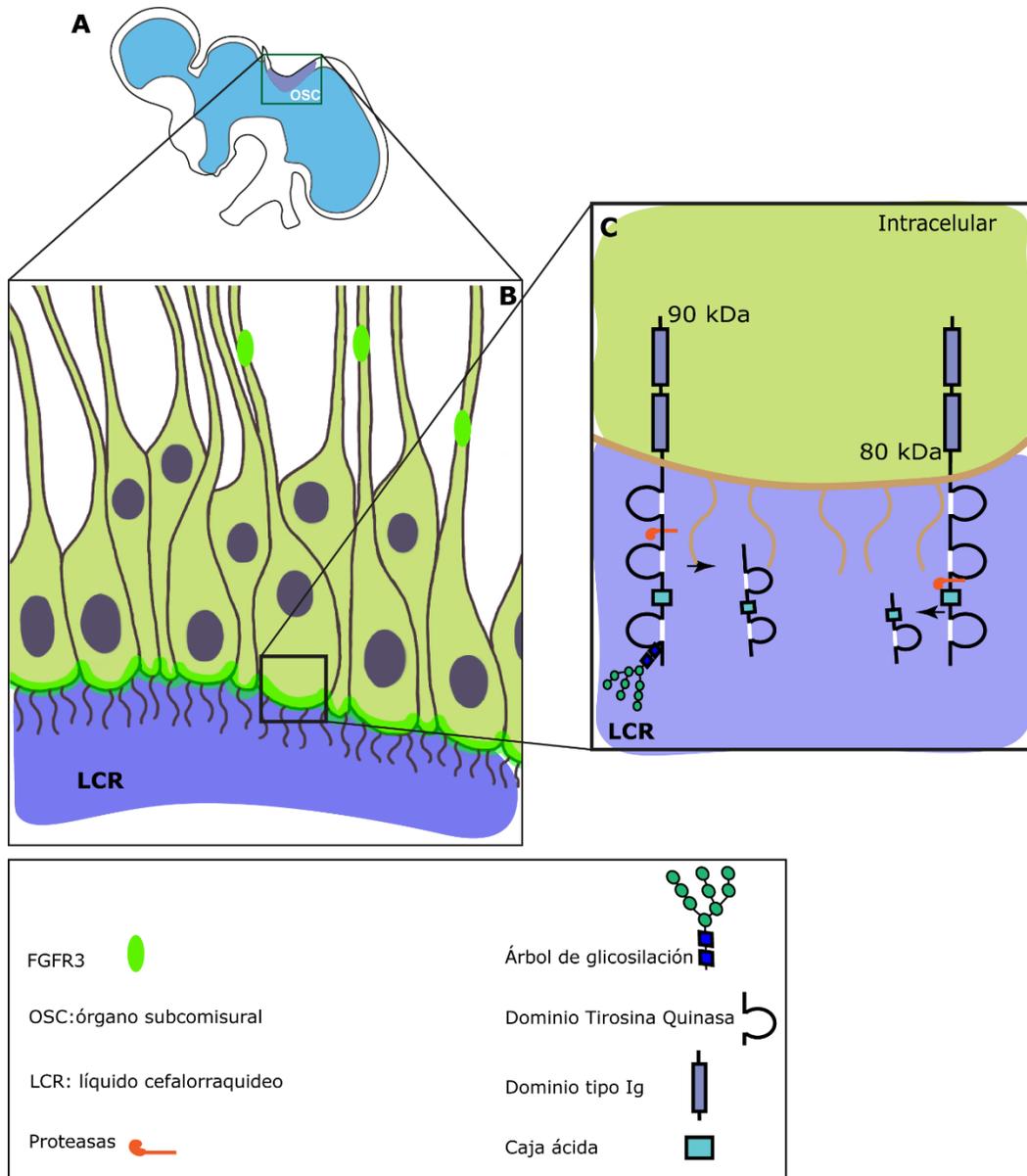
Nuestros análisis transcriptómicos muestran alta expresión del receptor FGFR3 en el OSC en el estadio HH23 en comparación con el HH30 y cerebro, lo cual se confirma con un cambio significativo en la expresión mediante RT-qPCR.

El receptor FGFR3 es una proteína que consta de 3 dominios lo que resulta en un peso de aproximadamente 90 KDa., sin embargo, mediante el programa `annotate_my_genomes` (Farkas et al. 2022) se lograron anotar dos isoformas, FGFR3 X1 de 22 exones cuyo peso molecular es de 94 KDa y otra FGFR3 X6 de 18 exones de 81 KDa. Nuestros análisis proteicos indicarían que la proteína correspondería a una variante de aproximadamente 90 KDa, no obstante, se ha demostrado que los FGFRs sufren modificaciones postraduccionales como clivaje extracelular e intracelular y glicosilación (Gong 2014; Merilahti et al. 2017). Por lo que podría corresponder a la variante de 81KDa con glicosilaciones o a la variante de mayor peso ya que el anticuerpo reconoce el dominio inmunoglobulina-like I, es decir la región extracelular del receptor. Ahora bien, las bandas de menor tamaño podrían corresponder a dominios extracelulares de FGFR3 unidas al receptor formando dominantes negativas que fueron separadas por el SDS-PAGE.

Con respecto a la localización del receptor en el OSC, en el estadio HH25, se observó que FGFR3 presenta una expresión principalmente en la región apical de todo el techo diencefálico, desde el primordio de la glándula pineal hasta el mesencéfalo. Estos hallazgos concuerdan con los resultados de estudios de

hibridación in situ en embriones de pollo, que indican que los transcritos de FGFR3 se expresan particularmente en el diencéfalo y la porción anterior del mesencéfalo, excluyendo la región posterior, además destacando su expresión en el centro organizador como la zona intratalámica en HH21 (Walshe and Mason 2000b).

En el OSC en estadio HH30, la distribución de la proteína FGFR3 sigue el patrón de expresión observado en el estadio HH25. Las células de la glía radial mantienen la expresión en la membrana apical y en las proyecciones basales. Esto podría indicar que el receptor contribuye a la señalización paracrina en el OSC, ya que la membrana de las células contacta con el LCRé y también de forma autocrina, ya que aparentemente el OSC tendría la capacidad de secretar ligandos FGFs.



**Figura 41.** Representación de la localización de FGFR3 en células de la glía radial de OSC.

En este esquema se resumen las variantes del receptor y su posible localización celular considerando nuestros análisis de western blot, inmunofluorescencia y lo reportado en la literatura. La representación en A muestra la localización de la expresión de FGFR3 con puntos de color verde en la placa del techo diencefálico. La ampliación en B destaca la localización apical y en las proyecciones basales del receptor. La representación en C indica las posibles variantes reportadas por el ensayo de western blot, que podrían corresponder a las isoformas detectadas por los análisis bioinformáticos. Las variantes clivados podrían actuar como dominantes negativos del mismo receptor.

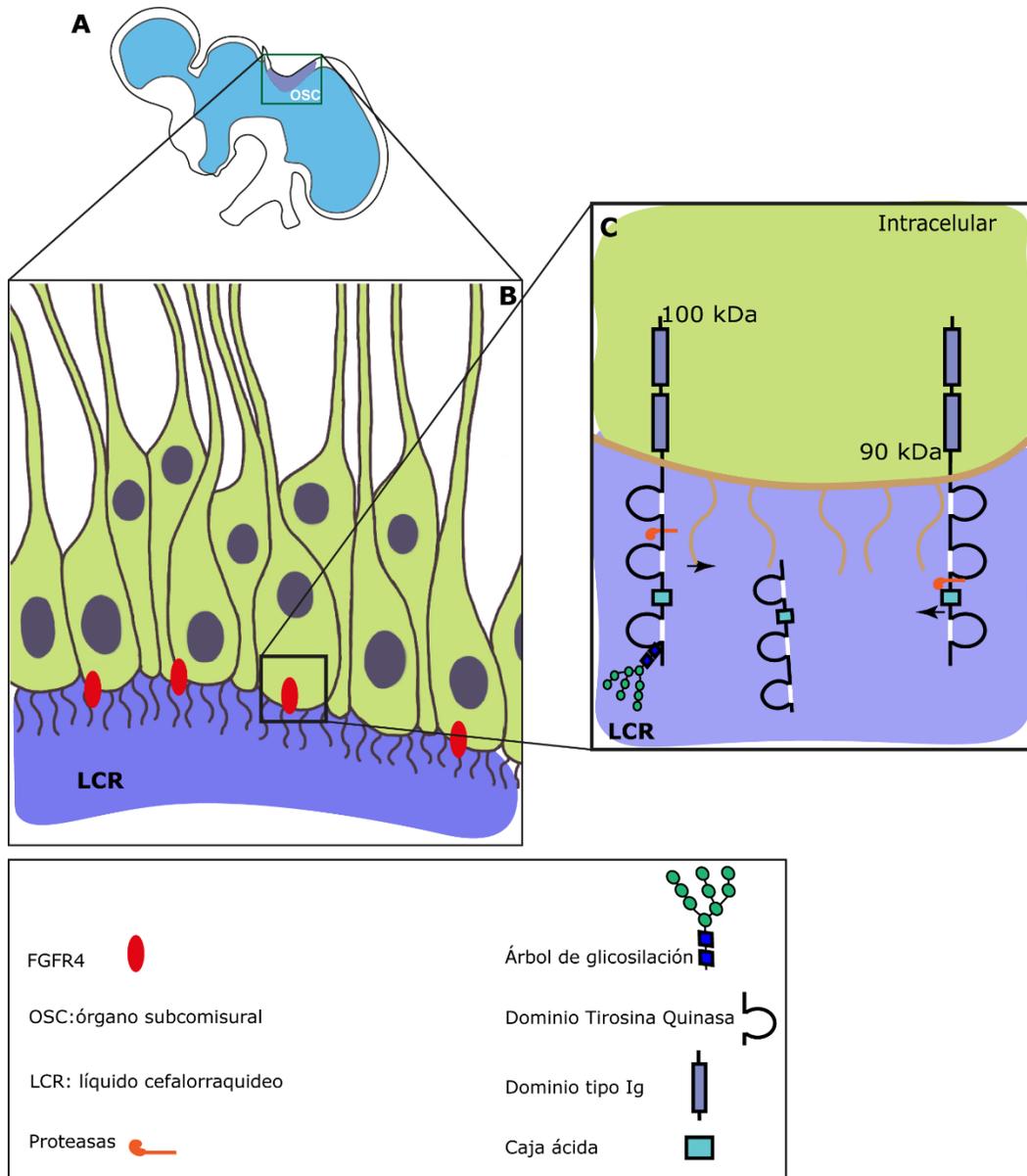
### Expresión de FGFR4 en el OSC

Los análisis de datos de RNA-seq demuestran que la expresión del receptor es idéntica en todas las muestras analizadas, tanto en el OSC en los dos estadios como en el cerebro. A través del programa de anotación (Farkas et al. 2022), se logró identificar la isoforma de 17 exones (de un total 18) de FGFR4 X1, con un peso aproximado de 90 KDa. A través de análisis proteicos, se detectó la isoforma de 90 KDa, aunque también se encontró una variante de 100 KDa. Similar a lo observado en otros FGFR, este receptor podría sufrir modificaciones postraduccionales (Gong 2014). La banda de mayor peso molecular podría corresponder a una glicosilación del receptor, mientras que la banda de menor peso podría estar asociada al dominio extracelular clivado por proteasas.

Con relación a la localización del receptor FGFR4, en el estadio HH25 se limita a las neuronas identificadas en el límite con la comisura posterior y presenta una expresión ligeramente apical. En el estadio HH30, esta localización se mantiene y la expresión se intensifica. Los análisis de hibridación in situ indican que FGFR4 se expresa de manera discreta en el OSC en estadios adultos (Hultman et al. 2019). No obstante, nuestros análisis demuestran que esta expresión discreta se conserva en estadios embrionarios en el OSC de pollos.

Las principales funciones asociadas a FGFR4 han sido estudiadas en algunos tipos de cáncer (Liu et al. 2020), sin embargo, las funciones del receptor en el desarrollo cerebral han sido escasamente estudiadas hasta el momento y por lo tanto se requiere mayor investigación respecto a este receptor que actúa en la vía klotho, en conjunto con FGF19, a través de señalización endocrina (Liu et al. 2020) regulando

procesos de apoptosis y proliferación. Al respecto, las células de la glía radial tienen contacto con vasos sanguíneos y las meninges por su proceso basal, lo que podría contribuir a esta función. En este trabajo detectamos expresión de FGFR4 en las regiones basales de la placa del techo, sin embargo, nuestros marcadores no nos permiten concluir si corresponden a los procesos basales de las células de la glía del OSC.



**Figura 42.** Representación de la localización de FGFR4 en células de la glía radial de OSC.

En este esquema se resumen las variantes del receptor y su posible localización celular considerando nuestros análisis de western blot, inmunofluorescencia y lo reportado en la literatura. La representación en A muestra la localización de la expresión de FGFR4 con puntos de color rojo en la placa del techo diencefálico. La ampliación en B destaca la localización apical del receptor. La representación en C indica las posibles variantes reportadas por el ensayo de western blot, que podrían corresponder a las isoformas detectadas por los análisis bioinformáticos.

### FGFs expresados diferencialmente

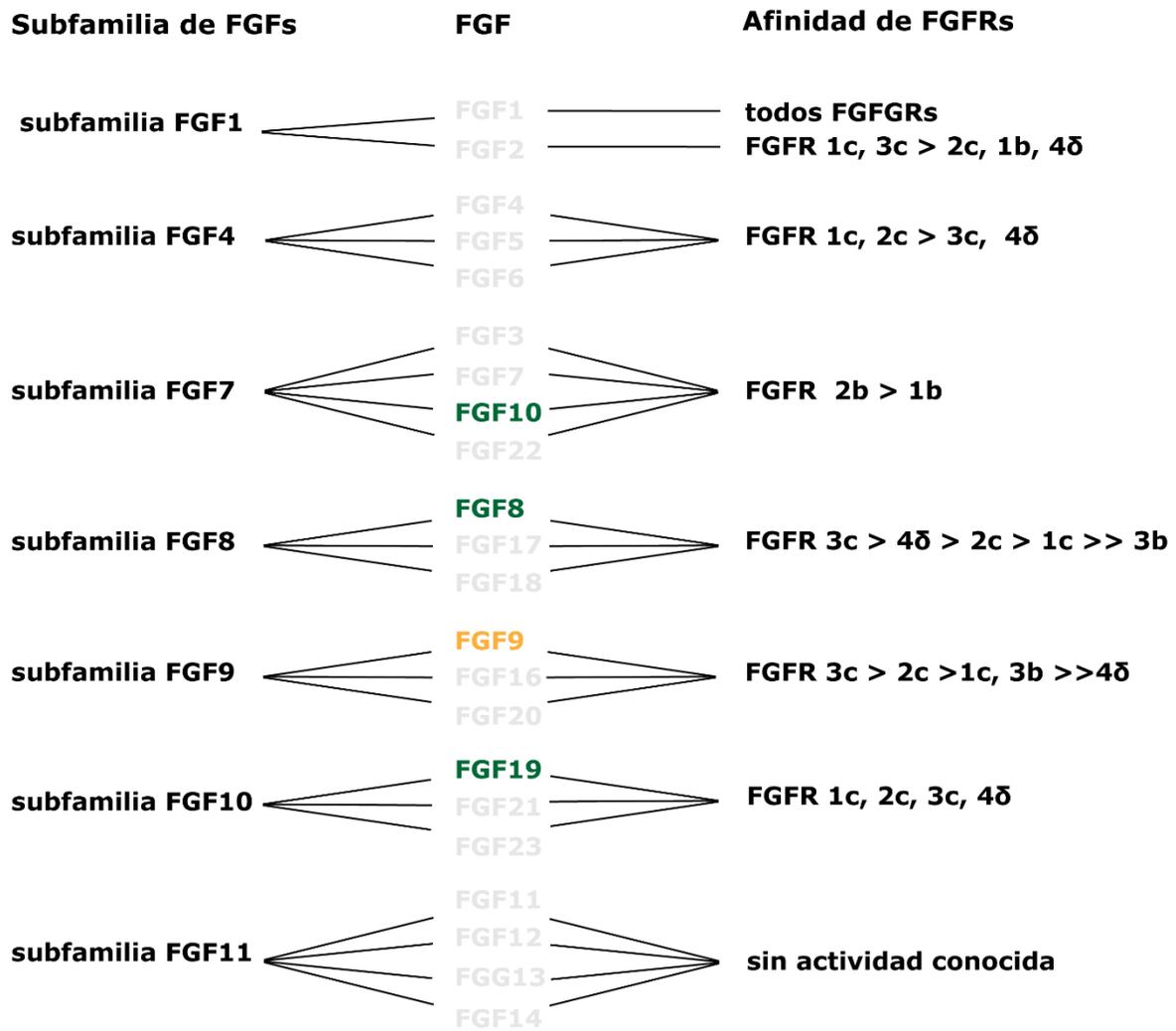
Nuestros análisis resaltan la expresión de ligandos de FGF en el estadio HH23, algunos de los cuales han sido identificados como elementos cruciales en la regulación del desarrollo del cerebro embrionario.

Es importante señalar que, hasta la fecha, no se han presentado análisis que confirmen la secreción de estos FGFs por el OSC. Sin embargo, se ha documentado que el origen de secreción de FGF8, un morfógeno clave en las primeras etapas del desarrollo cerebral, es la región anterior del prosencéfalo (Toyoda et al. 2010). De acuerdo con nuestros análisis, es posible especular que FGF8 podría ser secretado hacia el LCR<sub>e</sub> por el OSC, donde podría desempeñar funciones morfogénicas. Un ejemplo relevante es la presencia de FGF2 en el LCR<sub>e</sub>, el cual se ha identificado como un regulador de la proliferación y neurogénesis de las células neuroepiteliales (Martín et al. 2006). Estas observaciones plantean la posibilidad de que FGF8 podría ejercer un papel similar en el LCR<sub>e</sub> en términos de regulación del desarrollo cerebral.

Con respecto a FGF9 no se han descrito funciones en el desarrollo cerebral embrionario, ni tampoco su presencia en el LCR<sub>e</sub>. Por el contrario, FGF10 se ha descrito como modulador clave en la transición de las células neuroepitelial a célula de la glía radial, donde la pérdida de FGF10 muestra un retraso en la formación de neuronas corticales (Sahara and O'Leary 2009). Con respecto a FGF19, se ha descrito como un gen ortólogo de FGF15 de ratón que está regulado positivamente por FGF8 en el centro organizador ístmico lo que sugiere una acción sinérgica de FGF19 y FGF8 (Gimeno and Martinez 2007). Por último, FGF19 forma parte de los

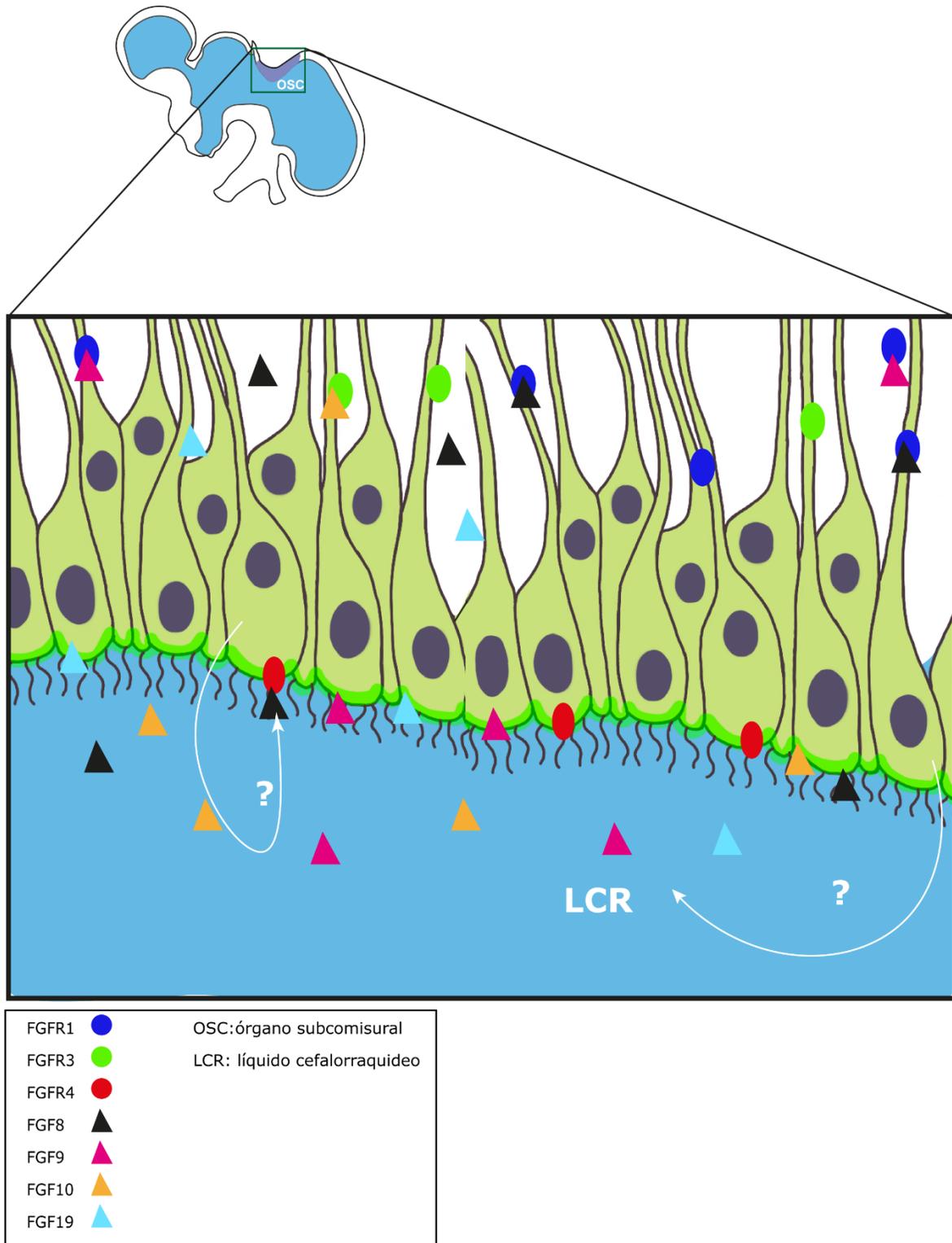
ligandos que actúan de forma endocrina, regulando el apetito y homeostasis de la glucosa (Stanley and Buettner 2014). A la fecha no se ha descrito la localización precisa en el OSC de FGF19, sin embargo, dada la presencia de FGFR4 el receptor de la vía FGF19- $\beta$ klotho en la región cercana a las meninges surge como un tema interesante de analizar.

Tomando en cuenta los antecedentes expuestos, se generó un diagrama a partir del análisis de expresión diferencial que ilustra la relación entre ligandos y receptores según sus familias. Entre las 11 subfamilias en las que se divide el grupo de FGFs, se identificó que 4 ligandos pertenecientes a 3 subfamilias presentan una expresión diferencial en el OSC en comparación con el cerebro (fig. 43). Siguiendo la conocida afinidad de los receptores FGFR, se deduce que los receptores FGFR2B, FGFR3C y FGFR4 son los que podrían tener una actividad potencialmente más destacada en el OSC. Esta información nos entrega las primeras pistas para entender las posibles interacciones entre los ligandos y receptores en el OSC y cómo podrían contribuir a la regulación de los procesos neurogénicos y de desarrollo en este tejido.



**Figura 43.** Expresión de subfamilias de FGFs en el OSC.

Se evaluó la expresión de la familia de ligandos de FGF en el OSC con respecto al cerebro. Los ligandos en verde representan aquellos diferencialmente expresados en OSC HH23, en color amarillo aquellos que su expresión se mantiene constante en el OSC, con respecto al cerebro HH30 y los en color gris, los cuales no presentan expresión diferencial en el OSC o su cambio no es significativo. La actividad conocida o afinidad de los diferentes receptores por los ligandos se muestra en el panel derecho. Modificado de Zhang, 2006



**Figura 44.** Modelo propuesto de señalización de FGF en el OSC

Se presenta un modelo de la expresión de FGFR en el OSC, destacando su alta expresión en este tejido. Además, se observa la expresión de ligandos de FGF que

muestran una regulación diferencial en el OSC en comparación con el cerebro. Esta regulación implica tanto señalización autocrina, donde los ligandos actúan sobre los receptores de FGF presentes en el mismo OSC, como señalización paracrina, donde los ligandos son secretados hacia la cara apical en el líquido cefalorraquídeo (LCR) o hacia los vasos sanguíneos cercanos a través de procesos basales. Esta compleja red de interacciones entre los ligandos de FGF y los receptores FGFR en el OSC desempeña un papel crucial en la regulación de eventos de desarrollo y funciones celulares específicas en este tejido.

## 6 CONCLUSIONES

Los análisis transcriptómicos revelan que en estadio HH23 el OSC tiene una actividad esencialmente proliferativa, mientras que en HH30 prevalece la expresión de genes diferenciadores.

- El OSC actúan como una glándula altamente secretora en el estadio HH30, sin embargo, no es posible asegurar el destino de la secreción, hacia el LCR e y/o hacia los vasos sanguíneos basales y/ o meninges.
- En HH23 el OSC presenta una expresión diferencial de FGF8, factor clásico de los centros organizadores secundarios.
- FGFR2 y FGFR3 se encuentran diferencialmente expresados en el OSC en el estadio HH23, mientras que FGFR1 tiene niveles de expresión similares en todo el cerebro.
- En el OSC se identificaron dos isoformas de FGFR3, X1 y X6 las cuales se expresan en la membrana apical en las células de la glía radial en contacto con el LCR e en estadio HH23 y HH30.
- Se identificó la isoforma FGFR4 X1 en el OSC, la cual se expresa en los neuroblastos cercanos a la comisura posterior.

## 7 BIBLIOGRAFÍA

- Almazroea, Abdulhadi. 2023. "Homozygous LOXL2 Variant in Individuals Affected by Non-Syndromic Occipital Encephalocele." *Birth Defects Research* 115(12):1163–68. doi: 10.1002/BDR2.2213.
- Alvarez, Ignacio S., María Araujo, and M. Angela Nieto. 1998. "Neural Induction in Whole Chick Embryo Cultures by FGF." *Developmental Biology* 199(1):42–54. doi: 10.1006/DBIO.1998.8903.
- Atkinson-Leadbetter, Karen, Gabriel E. Bertolesi, Carrie L. Hehr, Christine A. Webber, Paula B. Cechmanek, and Sarah McFarlane. 2010. "Dynamic Expression of Axon Guidance Cues Required for Optic Tract Development Is Controlled by Fibroblast Growth Factor Signaling." *Journal of Neuroscience* 30(2):685–93. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4165-09.2010.
- Bateman, Alex, Maria Jesus Martin, Sandra Orchard, Michele Magrane, Shadab Ahmad, Emanuele Alpi, Emily H. Bowler-Barnett, Ramona Britto, Hema Bye-A-Jee, Austra Cukura, Paul Denny, Tunca Dogan, Thank God Ebenezer, Jun Fan, Penelope Garmiri, Leonardo Jose da Costa Gonzales, Emma Hatton-Ellis, Abdulrahman Hussein, Alexandr Ignatchenko, Giuseppe Insana, Rizwan Ishtiaq, Vishal Joshi, Dushyanth Jyothi, Swaathi Kandasamy, Antonia Lock, Aurelien Luciani, Marija Lugaric, Jie Luo, Yvonne Lussi, Alistair MacDougall, Fabio Madeira, Mahdi Mahmoudy, Alok Mishra, Katie Moulang, Andrew Nightingale, Sangya Pundir, Guoying Qi, Shriya Raj, Pedro Raposo, Daniel L. Rice, Rabie Saidi, Rafael Santos, Elena Speretta, James Stephenson, Prabhat Tootoo, Edward Turner, Nidhi Tyagi, Preethi Vasudev, Kate Warner, Xavier Watkins, Rossana Zaru, Hermann Zellner, Alan J. Bridge, Lucila Aimó, Ghislaine Argoud-Puy, Andrea H. Auchincloss, Kristian B. Axelsen, Parit Bansal, Delphine Baratin, Teresa M. Batista Neto, Marie Claude Blatter, Jerven T. Bolleman, Emmanuel Boutet, Lionel Breuza, Blanca Cabrera Gil, Cristina Casals-Casas, Kamal Chikh Echioukh, Elisabeth Coudert, Beatrice Cuche, Edouard de Castro, Anne Estreicher, Maria L. Famiglietti, Marc Feuermann, Elisabeth Gasteiger, Pascale Gaudet, Sebastien Gehant, Vivienne Gerritsen, Arnaud Gos, Nadine Gruaz, Chantal Hulo, Nevila Hyka-Nouspikel, Florence Jungo, Arnaud Kerhornou, Philippe Le Mercier, Damien Lieberherr, Patrick Masson, Anne Morgat, Venkatesh Muthukrishnan, Salvo Paesano, Ivo Pedruzzi, Sandrine Pilbout, Lucille Pourcel, Sylvain Poux, Monica Pozzato, Manuela Pruess, Nicole Redaschi, Catherine Rivoire, Christian J. A. Sigrist, Karin Sonesson, Shyamala Sundaram, Cathy H. Wu, Cecilia N. Arighi, Leslie Arminski, Chuming Chen, Yongxing Chen, Hongzhan Huang, Kati Laiho, Peter McGarvey, Darren A. Natale, Karen Ross, C. R. Vinayaka, Qinghua Wang, Yuqi Wang, and Jian Zhang. 2023. "UniProt: The

Universal Protein Knowledgebase in 2023.” *Nucleic Acids Research* 51(D1):D523–31. doi: 10.1093/NAR/GKAC1052.

- Benjamini, Yoav, and Yocef Hochberg. 1995. “Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing.” *Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Methodological)* 57(1):289–300. doi: 10.1111/J.2517-6161.1995.TB02031.X.
- Berardini, Tanya Z., Donghui Li, Eva Huala, Susan Bridges, Shane Burgess, Fiona McCarthy, Seth Carbon, Suzanna E. Lewis, Christopher J. Mungall, Amina Abdulla, Valerie Wood, Erika Feltrin, Giorgio Valle, Rex L. Chisholm, Petra Fey, Pascale Gaudet, Warren Kibbe, Siddhartha Basu, Yulia Bushmanova, Karen Eilbeck, Deborah A. Siegele, Brenley McIntosh, Daniel Renfro, Adrienne Zweifel, James C. Hu, Michael Ashburner, Susan Tweedie, Yasmin Alam-Faruque, Rolf Apweiler, Andrea Auchincloss, Amos Bairoch, Daniel Barrell, David Binns, Marie Claude Blatter, Lydie Bougueleret, Emmanuel Boutet, Lionel Breuza, Alan Bridge, Paul Browne, Wei Mun Chan, Elizabeth Coudert, Louise Daugherty, Emily Dimmer, Ruth Eberhardt, Anne Estreicher, Livia Famiglietti, Serenella Ferro-Rojas, Marc Feuermann, Rebecca Foulger, Nadine Gruaz-Gumowski, Ursula Hinz, Rachael Huntley, Silvia Jimenez, Florence Jungo, Guillaume Keller, Kati Laiho, Duncan Legge, Philippe Lemercier, Damien Lieberherr, Michele Magrane, Claire O’Donovan, Ivo Pedruzzi, Sylvain Poux, Catherine Rivoire, Bernd Roechert, Tony Sawford, Michel Schneider, Eleanor Stanley, Andre Stutz, Shyamala Sundaram, Michael Tognolli, Ioannis Xenarios, Midori A. Harris, Jennifer I. Deegan, Amelia Ireland, Jane Lomax, Pankaj Jaiswal, Marcus Chibucos, Michelle Gwinn Giglio, Jennifer Wortman, Linda Hannick, Ramana Madupu, David Botstein, Kara Dolinski, Michael S. Livstone, Rose Oughtred, Judith A. Blake, Carol Bult, Alexander D. Diehl, Mary Dolan, Harold Drabkin, Janan T. Eppig, David P. Hill, Li Ni, Martin Ringwald, Dmitry Sitnikov, Candace Collmer, Trudy Torto-Alalibo, Stan Lauderkind, Mary Shimoyama, Simon Twigger, Peter D’Eustachio, Lisa Matthews, Rama Balakrishnan, Gail Binkley, J. Michael Cherry, Karen R. Christie, Maria C. Costanzo, Stacia R. Engel, Dianna G. Fisk, Jodi E. Hirschman, Benjamin C. Hitz, Eurie L. Hong, Cynthia J. Krieger, Stuart R. Miyasato, Robert S. Nash, Julie Park, Marek S. Skrzypek, Shuai Weng, Edith D. Wong, Martin Aslett, Juancarlos Chan, Ranjana Kishore, Paul Sternberg, Kimberly van Auken, Varsha K. Khodiyar, Ruth C. Lovering, Philippa J. Talmud, Doug Howe, and Monte Westerfield. 2010. “The Gene Ontology in 2010: Extensions and Refinements.” *Nucleic Acids Research* 38(Database issue). doi: 10.1093/NAR/GKP1018.
- Blunt, Allison G., Avril Lawshé, Michael L. Cunningham, Marianne L. Seto, David M. Ornitz, and Craig A. MacArthur. 1997. “Overlapping Expression and Redundant Activation of Mesenchymal Fibroblast Growth Factor (FGF)

- Receptors by Alternatively Spliced FGF-8 Ligands." *Journal of Biological Chemistry* 272(6):3733–38. doi: 10.1074/JBC.272.6.3733.
- Boo, Sung Ho, and Yoon Ki Kim. 2020. "The Emerging Role of RNA Modifications in the Regulation of mRNA Stability." *Experimental & Molecular Medicine* 52(3):400–408. doi: 10.1038/s12276-020-0407-z.
- Brafman, David, and Karl Willert. 2017. "Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling during Early Vertebrate Neural Development." *Developmental Neurobiology* 77(11):1239–59.
- Briscoe, James, and Stephen Small. 2015a. "Morphogen Rules: Design Principles of Gradient-Mediated Embryo Patterning." *Development* 142(23):3996–4009. doi: 10.1242/dev.129452.
- Briscoe, James, and Stephen Small. 2015b. "Morphogen Rules: Design Principles of Gradient-Mediated Embryo Patterning." *Development* 142(23):3996–4009. doi: 10.1242/dev.129452.
- Camacho-Aguilar, Elena, and Aryeh Warmflash. 2020. "Insights into Mammalian Morphogen Dynamics from Embryonic Stem Cell Systems." *Current Topics in Developmental Biology* 137:279–305. doi: 10.1016/bs.ctdb.2019.11.010.
- Caprile, Teresa, Germán Osorio, Juan Pablo Henríquez, and Hernán Montecinos. 2009. "Polarized Expression of Integrin Beta1 in Diencephalic Roof Plate during Chick Development, a Possible Receptor for SCO-Spondin." *Developmental Dynamics : An Official Publication of the American Association of Anatomists* 238(10):2494–2504. doi: 10.1002/DVDY.22070.
- Cavodeassi, Florencia, and Corinne Houart. 2012. "Brain Regionalization: Of Signaling Centers and Boundaries." *Developmental Neurobiology* 72(3):218–33. doi: 10.1002/dneu.20938.
- Cecilia, Dall'Aglio, Ceccarelli Piero, Pascucci Luisa, Brecchia Gabriele, and Boiti Cristiano. 2006. "Receptors for Leptin and Estrogen in the Subcommissural Organ of Rabbits Are Differentially Modulated by Fasting." *Brain Research* 1124(1):62–69. doi: 10.1016/j.brainres.2006.09.091.
- Chen, Shifu, Yanqing Zhou, Yaru Chen, and Jia Gu. 2018. "Fastp: An Ultra-Fast All-in-One FASTQ Preprocessor." *Bioinformatics* 34(17):i884–90. doi: 10.1093/BIOINFORMATICS/BTY560.
- Chua, Ceres C., Nader Rahimi, Kimberly Forsten-Williams, and Matthew A. Nugent. 2004. "Heparan Sulfate Proteoglycans Function as Receptors for Fibroblast Growth Factor-2 Activation of Extracellular Signal-Regulated Kinases 1 and 2." *Circulation Research* 94(3):316–23. doi: 10.1161/01.RES.0000112965.70691.AC.

Crespo-Enriquez, Ivan, Juha Partanen, Salvador Martinez, and Diego Echevarria. 2012. "Fgf8-Related Secondary Organizers Exert Different Polarizing Planar Instructions along the Mouse Anterior Neural Tube." *PLOS ONE* 7(7):e39977. doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0039977.

Cunningham, Fiona, James E. Allen, Jamie Allen, Jorge Alvarez-Jarreta, M. Ridwan Amode, Irina M. Armean, Olanrewaju Austine-Orimoloye, Andrey G. Azov, If Barnes, Ruth Bennett, Andrew Berry, Jyothish Bhai, Alexandra Bignell, Konstantinos Billis, Sanjay Boddu, Lucy Brooks, Mehrnaz Charkhchi, Carla Cummins, Luca Da Rin Fioretto, Claire Davidson, Kamalkumar Dodiya, Sarah Donaldson, Bilal El Houdaigui, Tamara El Naboulsi, Reham Fatima, Carlos Garcia Giron, Thiago Genez, Jose Gonzalez Martinez, Cristina Guijarro-Clarke, Arthur Gymer, Matthew Hardy, Zoe Hollis, Thibaut Hourlier, Toby Hunt, Thomas Juettemann, Vinay Kaikala, Mike Kay, Ilias Lavidas, Tuan Le, Diana Lemos, Jose Carlos Marugán, Shamika Mohanan, Aleena Mushtaq, Marc Naven, Denye N. Ogeh, Anne Parker, Andrew Parton, Malcolm Perry, Ivana Pilizota, Irina Prosovetkaia, Manoj Pandian Sakthivel, Ahamed Imran Abdul Salam, Bianca M. Schmitt, Helen Schuilenburg, Dan Sheppard, Jose G. Perez-Silva, William Stark, Emily Steed, Kyösti Sutinen, Ranjit Sukumaran, Dulika Sumathipala, Marie Marthe Suner, Michal Szpak, Anja Thormann, Francesca Floriana Tricomi, David Urbina-Gómez, Andres Veidenberg, Thomas A. Walsh, Brandon Walts, Natalie Willhoft, Andrea Winterbottom, Elizabeth Wass, Marc Chakiachvili, Bethany Flint, Adam Frankish, Stefano Giorgetti, Leanne Haggerty, Sarah E. Hunt, Garth R. Iisley, Jane E. Loveland, Fergal J. Martin, Benjamin Moore, Jonathan M. Mudge, Matthieu Muffato, Emily Perry, Magali Ruffier, John Tate, David Thybert, Stephen J. Trevanion, Sarah Dyer, Peter W. Harrison, Kevin L. Howe, Andrew D. Yates, Daniel R. Zerbino, and Paul Flicek. 2022. "Ensembl 2022." *Nucleic Acids Research* 50(D1):D988–95. doi: 10.1093/NAR/GKAB1049.

Danecek, Petr, James K. Bonfield, Jennifer Liddle, John Marshall, Valeriu Ohan, Martin O. Pollard, Andrew Whitwham, Thomas Keane, Shane A. McCarthy, and Robert M. Davies. 2021. "Twelve Years of SAMtools and BCFtools." *GigaScience* 10(2):1–4. doi: 10.1093/GIGASCIENCE/GIAB008.

Degnin, Catherine R., Melanie B. Laederich, and William A. Horton. 2011. "Ligand Activation Leads to Regulated Intramembrane Proteolysis of Fibroblast Growth Factor Receptor 3." *Molecular Biology of the Cell* 22(20):3861–73. doi: 10.1091/MBC.E11-01-0080/ASSET/IMAGES/LARGE/3861FIG6.JPEG.

Dorey, Karel, and Enrique Amaya. 2010a. "FGF Signalling: Diverse Roles during Early Vertebrate Embryogenesis." *Development* 137(22):3731–42. doi: 10.1242/dev.037689.

- Dorey, Karel, and Enrique Amaya. 2010b. "FGF Signalling: Diverse Roles during Early Vertebrate Embryogenesis." *Development* 137(22):3731–42. doi: 10.1242/DEV.037689.
- Duchesne, Laurence, Bérangère Tissot, Timothy R. Rudd, Anne Dell, and David G. Fernig. 2006. "N-Glycosylation of Fibroblast Growth Factor Receptor 1 Regulates Ligand and Heparan Sulfate Co-Receptor Binding." *Journal of Biological Chemistry* 281(37):27178–89. doi: 10.1074/JBC.M601248200.
- Eagleson, Gerald W., and Ryan D. Dempewolf. 2002. "The Role of the Anterior Neural Ridge and Fgf-8 in Early Forebrain Patterning and Regionalization in *Xenopus Laevis*." *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 132(1):179–89. doi: 10.1016/S1096-4959(01)00521-8.
- Echevarría, Diego, Claudia Vieira, Lourdes Gimeno, and Salvador Martínez. 2003. "Neuroepithelial Secondary Organizers and Cell Fate Specification in the Developing Brain." *Brain Research Reviews* 43(2):179–91. doi: 10.1016/J.BRAINRESREV.2003.08.002.
- Estivill-torrús, Guillermo, Manuel F. C. O. López-aranda, Jesús M. Grondona, Antoine Bach, Benoît Robert, Tania Vitalis, David J. Price, Casto Ramos, Eduardo Soriano, and Pedro Fernández-llebrez. 2001. "The Development of the Subcommissural Organ." 45:75–76.
- Estivill-Torrús, Guillermo, Tania Vitalis, Pedro Fernández-Llebrez, and David J. Price. 2001. "The Transcription Factor Pax6 Is Required for Development of the Diencephalic Dorsal Midline Secretory Radial Glia That Form the Subcommissural Organ." *Mechanisms of Development* 109(2):215–24. doi: 10.1016/S0925-4773(01)00527-5.
- Fame, Ryann M., and Maria K. Lehtinen. 2020. "Emergence and Developmental Roles of the Cerebrospinal Fluid System." *Developmental Cell* 52(3):261–75. doi: 10.1016/j.devcel.2020.01.027.
- Farkas, Carlos, Antonia Recabal, Andy Mella, Daniel Candia-Herrera, Maryori González Olivero, Jody Jonathan Haigh, Estefanía Tarifeño-Saldivia, and Teresa Caprile. 2022. "Annotate\_my\_genomes: An Easy-to-Use Pipeline to Improve Genome Annotation and Uncover Neglected Genes by Hybrid RNA Sequencing." *GigaScience* 11. doi: 10.1093/gigascience/giac099.
- Fernández-Llebrez, P., J. M. Grondona, J. Pérez, M. F. López-Aranda, G. Estivill-Torrús, P. F. Llebrez-Zayas, E. Soriano, C. Ramos, Y. Lallemand, A. Bach, and B. Robert. 2004. "Msx1-Deficient Mice Fail to Form Prosomere 1 Derivatives, Subcommissural Organ, and Posterior Commissure and Develop Hydrocephalus." *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 63(6):574–86. doi: 10.1093/JNEN/63.6.574.

- Ferran, J. L., L. Sánchez-Arrones, J. E. Sandoval, and Luis Puelles. 2007. "A Model of Early Molecular Regionalization in the Chicken Embryonic Pretectum." *Journal of Comparative Neurology* 505(4):379–403. doi: 10.1002/cne.21493.
- Fletcher, Russell B., Julie C. Baker, and Richard M. Harland. 2006. "FGF8 Spliceforms Mediate Early Mesoderm and Posterior Neural Tissue Formation in *Xenopus*." *Development* 133(9):1703–14. doi: 10.1242/DEV.02342.
- Gato, Ngel, J. A. Moro, M. I. Alonso, D. Bueno, and Departament De Gene. 2005. "Embryonic Cerebrospinal Fluid Regulates Neuroepithelial Survival , Proliferation , and Neurogenesis in Chick Embryos." 484(March):475–84. doi: 10.1002/ar.a.20185.
- Ge, Steven Xijin, Dongmin Jung, Dongmin Jung, and Runan Yao. 2020. "ShinyGO: A Graphical Gene-Set Enrichment Tool for Animals and Plants." *Bioinformatics* 36(8):2628–29. doi: 10.1093/BIOINFORMATICS/BTZ931.
- Gimeno, L., and Salvador Martinez. 2007. "Expression of Chick *Fgf19* and Mouse *Fgf15* Orthologs Is Regulated in the Developing Brain by *Fgf8* and *Shh*." *Developmental Dynamics* 236(8):2285–97. doi: 10.1002/DVDY.21237.
- Gobron, S., I. Creveaux, R. Meiniel, R. Didier, B. Dastugue, and A. Meiniel. 1999. "SCO-Spondin Is Evolutionarily Conserved in the Central Nervous System of the Chordate Phylum." *Neuroscience* 88(2):655–64. doi: 10.1016/S0306-4522(98)00252-8.
- Gong, Siew Ging. 2014. "Isoforms of Receptors of Fibroblast Growth Factors." *Journal of Cellular Physiology* 229(12):1887–95. doi: 10.1002/JCP.24649.
- Götz, Magdalena, and Wieland B. Huttner. 2005. "The Cell Biology of Neurogenesis." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 6(10):777–88. doi: 10.1038/nrm1739.
- Grondona, Jesús M., Carolina Hoyo-Becerra, Rick Visser, Pedro Fernández-Llóbregas, and María Dolores López-ávalos. 2012. *The Subcommissural Organ and the Development of the Posterior Commissure*. Vol. 296.
- Groth, Casper, and Michael Lardelli. 2002. "The Structure and Function of Vertebrate Fibroblast Growth Factor Receptor 1." *International Journal of Developmental Biology* 46(4 SPEC.):393–400. doi: 10.1387/ijdb.12141425.
- Guerra, Maria M., César González, Teresa Caprile, Maryoris Jara, Karin Vío, Rosa I. Muñoz, Sara Rodríguez, and Esteban M. Rodríguez. 2015. "Understanding How the Subcommissural Organ and Other Periventricular Secretory Structures Contribute via the Cerebrospinal Fluid to Neurogenesis." *Frontiers in Cellular Neuroscience* 9(DEC):480.

- Guillemot, François, and Céline Zimmer. 2011. "From Cradle to Grave: The Multiple Roles of Fibroblast Growth Factors in Neural Development." *Neuron* 71(4):574–88.
- Guiñazú, María F., Hans G. Richter, and Esteban M. Rodríguez. 2002. "Bovine Floor Plate Explants Secrete SCO-Spondin." *Cell and Tissue Research* 308(2):177–91. doi: 10.1007/s00441-002-0511-5.
- Hamburger, Viktor, and Howard L. Hamilton. 1951. *A S E R I E S O F N O R M A L S T A G E S I N T H E D E V E L O P M E N T O F T H E C H I C K E M B R Y O*.
- Hanneken, Anne, Maluz Mercado, and Pamela Maher. 2021. "Constitutive and Regulated Shedding of Soluble FGF Receptors Releases Biologically Active Inhibitors of FGF-2." *International Journal of Molecular Sciences* 22(5):1–20. doi: 10.3390/IJMS22052712.
- Herranz, Nicolás, Natàlia Dave, Alba Millanes-Romero, Laura Pascual-Reguant, Lluís Morey, Víctor M. Díaz, Víctor Lórenz-Fonfría, Ricardo Gutierrez-Gallego, Celia Jerónimo, Ane Iturbide, Luciano Di Croce, Antonio García de Herreros, and Sandra Peiró. 2016. "Lysyl Oxidase-like 2 (LOXL2) Oxidizes Trimethylated Lysine 4 in Histone H3." *The FEBS Journal* 283(23):4263–73. doi: 10.1111/FEBS.13922.
- Hsuchou, Hung, Weihong Pan, and Abba J. Kastin. 2013. "Fibroblast Growth Factor 19 Entry into Brain." *Fluids and Barriers of the CNS* 10(1):1–8. doi: 10.1186/2045-8118-10-32/FIGURES/5.
- Huang, Hao. 2021. "Proteolytic Cleavage of Receptor Tyrosine Kinases." *Biomolecules* 11(5). doi: 10.3390/BIOM11050660.
- Hultman, Karin, Jarrad M. Scarlett, Arian F. Baquero, Anda Cornea, Yu Zhang, Casper B. G. Salinas, Jenny Brown, Gregory J. Morton, Erin J. Whalen, Kevin L. Grove, Frank H. Koegler, Michael W. Schwartz, and Aaron J. Mercer. 2019. "The Central Fibroblast Growth Factor Receptor/Beta Klotho System: Comprehensive Mapping in <sc> Mus Musculus </Scp> and Comparisons to Nonhuman Primate and Human Samples Using an Automated in Situ Hybridization Platform." *Journal of Comparative Neurology* 527(12):2069–85. doi: 10.1002/cne.24668.
- Inestrosa, Nivaldo C., and Lorena Varela-Nallar. 2015. "Wnt Signalling in Neuronal Differentiation and Development." *Cell and Tissue Research* 359(1):215–23. doi: 10.1007/s00441-014-1996-4.
- Ishikawa, Yuji, Naoyuki Yamamoto, Masami Yoshimoto, and Hironobu Ito. 2012. "The Primary Brain Vesicles Revisited: Are the Three Primary Vesicles (Forebrain/Midbrain/Hindbrain) Universal in Vertebrates." *Brain Behavior and Evolution* 79(2):75–83. doi: 10.1159/000334842.

- Itoh, Nobuyuki, and David M. Ornitz. 2004. "Evolution of the Fgf and Fgfr Gene Families." *Trends in Genetics* 20(11):563–69. doi: 10.1016/j.tig.2004.08.007.
- Itoh, Nobuyuki, and David M. Ornitz. 2011. "Fibroblast Growth Factors: From Molecular Evolution to Roles in Development, Metabolism and Disease." *Journal of Biochemistry* 149(2):121–30. doi: 10.1093/jb/mvq121.
- Ivanova, Nadezhda, Viliana Gugleva, Mirena Dobрева, Ivaylo Pehlivanov, Stefan Stefanov, and Velichka Andonova. 2016. "The FGF Family in Humans, Mice, and Zebrafish: Development, Physiology, and Pathophysiology." *Intech i(tourism)*:13.
- Jacobson, A. G., and R. Gordon. 1976. "Nature and Origin of Patterns of Changes in Cell Shape in Embryos." *Journal of Supramolecular Structure* 5(3):371–80. doi: 10.1002/JSS.400050309.
- Jimenez-Pascual, Ana, and Florian A. Siebzehnruhl. 2019. "Fibroblast Growth Factor Receptor Functions in Glioblastoma." *Cells 2019, Vol. 8, Page 715* 8(7):715. doi: 10.3390/CELLS8070715.
- Johansson, Pia A., Martin Irmeler, Dario Acampora, Johannes Beckers, Antonio Simeone, and Magdalena Götz. 2013. "The Transcription Factor Otx2 Regulates Choroid Plexus Development and Function." *Development (Cambridge)* 140(5):1055–66. doi: 10.1242/dev.090860.
- Johnson, Daniel E., and Lewis T. Williams. 1992. "Structural and Functional Diversity in the Fgf Receptor Multigene Family." *Advances in Cancer Research* 60(C):1–41. doi: 10.1016/S0065-230X(08)60821-0.
- Jones, Gavin C., and Graham P. Riley. 2005. "ADAMTS Proteinases: A Multi-Domain, Multi-Functional Family with Roles in Extracellular Matrix Turnover and Arthritis." *Arthritis Research and Therapy* 7(4):160–69. doi: 10.1186/AR1783/FIGURES/2.
- Joyner, Alexandra L., Aimin Liu, and Sandrine Millet. 2000. "Otx2, Gbx2 and Fgf8 Interact to Position and Maintain a Mid–Hindbrain Organizer." *Current Opinion in Cell Biology* 12(6):736–41. doi: 10.1016/S0955-0674(00)00161-7.
- Kaiser, Karol, Daniel Gyllborg, Jan Procházka, Alena Sala, Petra Kompaníková, Francisco Lamus Molina, Rocio Laguna-goya, Tomasz Radaszkiewicz, Jakub Harno, Michaela Procházková, David Pot, Roger A. Barker, Ángel Gato Casado, Radislav Sedlá, Ernest Arenas, and J. Carlos Villaescusa. 2019. "WNT5A Is Transported via Lipoprotein Particles in the Cerebrospinal Fluid to Regulate Hindbrain Morphogenesis." *Nature Communications* 10:1–15. doi: 10.1038/s41467-019-09298-4.
- Kesavan, Gokul, Anja Machate, Stefan Hans, and Michael Brand. 2020. "Cell-Fate Plasticity, Adhesion and Cell Sorting Complementarily Establish a Sharp

- Midbrain-Hindbrain Boundary." *Development (Cambridge, England)* 147(11). doi: 10.1242/DEV.186882.
- Kiecker, Clemens, and Andrew Lumsden. 2004. "Hedgehog Signaling from the ZLI Regulates Diencephalic Regional Identity." *Nature Neuroscience* 2004 7:11 7(11):1242–49. doi: 10.1038/nn1338.
- Kiecker, Clemens, and Andrew Lumsden. 2012. "The Role of Organizers in Patterning the Nervous System." *Annual Review of Neuroscience* 35:347–67. doi: 10.1146/annurev-neuro-062111-150543.
- Kim, Daehwan, Joseph M. Paggi, Chanhee Park, Christopher Bennett, and Steven L. Salzberg. 2019. "Graph-Based Genome Alignment and Genotyping with HISAT2 and HISAT-Genotype." *Nature Biotechnology* 2019 37:8 37(8):907–15. doi: 10.1038/s41587-019-0201-4.
- Kim, Young Mi, Eun Cheol Kim, and Youngho Kim. 2011. "The Human Lysyl Oxidase-like 2 Protein Functions as an Amine Oxidase toward Collagen and Elastin." *Molecular Biology Reports* 38(1):145–49. doi: 10.1007/S11033-010-0088-0/FIGURES/2.
- Koussounadis, Antonis, Simon P. Langdon, In Hwa Um, David J. Harrison, and V. Anne Smith. 2015. "Relationship between Differentially Expressed mRNA and mRNA-Protein Correlations in a Xenograft Model System." *Scientific Reports* 2015 5:1 5(1):1–9. doi: 10.1038/srep10775.
- Krstic, Dimitrije, Myriam Rodriguez, and Irene Knuesel. 2012. "Regulated Proteolytic Processing of Reelin through Interplay of Tissue Plasminogen Activator (TPA), ADAMTS-4, ADAMTS-5, and Their Modulators." *PLOS ONE* 7(10):e47793. doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0047793.
- Kumar, Vijay, Ravi Shankar Goutam, Soochul Park, Unjoo Lee, and Jaebong Kim. 2021. "Cells Functional Roles of FGF Signaling in Early Development of Vertebrate Embryos." 10:2148. doi: 10.3390/cells10082148.
- Lamus, F., C. Martín, E. Carnicero, J. A. Moro, J. M. F. Fernández, A. Mano, Gato, and M. I. Alonso. 2020. "FGF2/EGF Contributes to Brain Neuroepithelial Precursor Proliferation and Neurogenesis in Rat Embryos: The Involvement of Embryonic Cerebrospinal Fluid." *Developmental Dynamics* 249(1):141–53. doi: 10.1002/dvdy.135.
- Leerberg, Dena M., Rachel E. Hopton, and Bruce W. Draper. 2019. "Fibroblast Growth Factor Receptors Function Redundantly during Zebrafish Embryonic Development." *Genetics* 212(4):1301–19. doi: 10.1534/genetics.119.302345.
- Li, Heng. 2018. "Minimap2: Pairwise Alignment for Nucleotide Sequences." *Bioinformatics* 34(18):3094–3100. doi: 10.1093/BIOINFORMATICS/BTY191.

- Liao, Yang, Gordon K. Smyth, and Wei Shi. 2019. "The R Package Rsubread Is Easier, Faster, Cheaper and Better for Alignment and Quantification of RNA Sequencing Reads." *Nucleic Acids Research* 47(8). doi: 10.1093/nar/gkz114.
- Liu, Shuying, Mandi Murph, Nattapon Panupinthu, and Gordon B. Mills. 2009. "ATX-LPA Receptor Axis in Inflammation and Cancer." [http://Dx.Doi.Org/10.4161/Cc.8.22.9937](http://dx.doi.org/10.4161/cc.8.22.9937) 8(22):3695–3701. doi: 10.4161/CC.8.22.9937.
- Liu, Yanan, Meng Cao, Yuepiao Cai, Xiaokun Li, Chengguang Zhao, and Ri Cui. 2020. "Dissecting the Role of the FGF19-FGFR4 Signaling Pathway in Cancer Development and Progression." *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 8. doi: 10.3389/FCELL.2020.00095.
- Liu, Yansheng, Andreas Beyer, and Ruedi Aebersold. 2016. "On the Dependency of Cellular Protein Levels on mRNA Abundance." *Cell* 165(3):535–50. doi: 10.1016/J.CELL.2016.03.014.
- Loeb, Carly R. K., Jennifer L. Harris, and Charles S. Craik. 2006. "Granzyme B Proteolyzes Receptors Important to Proliferation and Survival, Tipping the Balance toward Apoptosis." *Journal of Biological Chemistry* 281(38):28326–35. doi: 10.1074/JBC.M604544200.
- Long, Katherine R., and Wieland B. Huttner. 2019. "How the Extracellular Matrix Shapes Neural Development." *Royal Society Open Biology* 9(1). doi: 10.1098/RSOB.180216.
- Love, Michael I., Wolfgang Huber, and Simon Anders. 2014. "Moderated Estimation of Fold Change and Dispersion for RNA-Seq Data with DESeq2." *Genome Biology* 15(12):1–21. doi: 10.1186/S13059-014-0550-8/FIGURES/9.
- Lowery, Laura Anne, and Hazel Sive. 2009. "Totally Tubular: The Mystery behind Function and Origin of the Brain Ventricular System." *BioEssays* 31(4):446–58.
- Lun, Melody P., Edwin S. Monuki, and Maria K. Lehtinen. 2015. "Development and Functions of the Choroid Plexus–Cerebrospinal Fluid System." *Nature Reviews Neuroscience* 2015 16:8 16(8):445–57. doi: 10.1038/nrn3921.
- Maden, Malcolm. 2002. "Retinoid Signalling in the Development of the Central Nervous System." *Nature Reviews Neuroscience* 2002 3:11 3(11):843–53. doi: 10.1038/nrn963.
- Martín, C., D. Bueno, M. I. Alonso, J. A. Moro, S. Callejo, C. Parada, and P. Martín. 2006. "FGF2 Plays a Key Role in Embryonic Cerebrospinal Fluid Trophic Properties over Chick Embryo Neuroepithelial Stem Cells." 297:402–16. doi: 10.1016/j.ydbio.2006.05.010.

- Martínez, Salvador, Eduardo Puelles, Luis Puelles, and Diego Echevarria. 2012. "Molecular Regionalization of the Developing Neural Tube." *The Mouse Nervous System* 2–18. doi: 10.1016/B978-0-12-369497-3.10001-9.
- Mason, Ivor. 2007. "Initiation to End Point: The Multiple Roles of Fibroblast Growth Factors in Neural Development." *Nature Reviews Neuroscience* 8(8):583–96. doi: 10.1038/nrn2189.
- Matsumoto, Naoyuki, Yohei Shinmyo, Yoshie Ichikawa, and Hiroshi Kawasaki. 2017. "Gyrification of the Cerebral Cortex Requires FGF Signaling in the Mammalian Brain." *ELife* 6. doi: 10.7554/ELIFE.29285.
- Matsuo, Isao, and Chiharu Kimura-Yoshida. 2013. "Extracellular Modulation of Fibroblast Growth Factor Signaling through Heparan Sulfate Proteoglycans in Mammalian Development." *Current Opinion in Genetics and Development* 23(4):399–407.
- Medina, Loreta. 2009. "Evolution and Embryological Development of Forebrain." *Encyclopedia of Neuroscience* 1172–92. doi: 10.1007/978-3-540-29678-2\_3112.
- Meinhardt, Hans. 1983. "Cell Determination Boundaries as Organizing Regions for Secondary Embryonic Fields." *Developmental Biology* 96(2):375–85. doi: 10.1016/0012-1606(83)90175-6.
- Meiniel, Annie. 2001. "SCO-Spondin, a Glycoprotein of the Subcommissural Organ/Reissner's Fiber Complex: Evidence of a Potent Activity on Neuronal Development in Primary Cell Cultures." *Microsc. Res. Tech* 52:484–95. doi: 10.1002/1097-0029.
- Meiniel, Olivier, and Annie Meiniel. 2006. "The Complex Multidomain Organization of SCO-Spondin Protein Is Highly Conserved in Mammals ☆." *Brain Research Reviews* 53. doi: 10.1016/j.brainresrev.2006.09.007.
- Meiniel, Olivier, and Annie Meiniel. 2007. "The Complex Multidomain Organization of SCO-Spondin Protein Is Highly Conserved in Mammals." *Brain Research Reviews* 53(2):321–27. doi: 10.1016/J.BRAINRESREV.2006.09.007.
- Mercurio, S. 2004. "Connective-Tissue Growth Factor Modulates WNT Signalling and Interacts with the WNT Receptor Complex." *Development* 131(9):2137–47. doi: 10.1242/dev.01045.
- Merilahti, Johannes A. M., Veera K. Ojala, Anna M. Knittle, Arto T. Pulliainen, and Klaus Elenius. 2017. "Genome-Wide Screen of Gamma-Secretase-Mediated Intramembrane Cleavage of Receptor Tyrosine Kinases." *Molecular Biology of the Cell* 28(22):3123–31. doi: 10.1091/mbc.E17-04-0261.

- Mongera, Alessandro, Arthur Michaut, Charlène Guillot, Fengzhu Xiong, and Olivier Pourquié. 2019. "Mechanics of Anteroposterior Axis Formation in Vertebrates." *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 35:259. doi: 10.1146/ANNUREV-CELLBIO-100818-125436.
- Monnerie, Hubert, Bernard Dastugue, and Annie Meiniel. 1997. "In Vitro Differentiation of Chick Spinal Cord Neurons in the Presence of Reissner's Fibre, an Ependymal Brain Secretion." *Developmental Brain Research* 102(2):167–76. doi: 10.1016/S0165-3806(97)00094-1.
- Montecinos, H. A., H. Richter, T. Caprile, and E. M. Rodríguez. 2005. "Synthesis of Transthyretin by the Ependymal Cells of the Subcommissural Organ." *Cell and Tissue Research* 320(3):487–99. doi: 10.1007/s00441-004-0997-0.
- Nakamura, Harukazu, Tatsuya Katahira, Eiji Matsunaga, and Tatsuya Sato. 2005. "Isthmus Organizer for Midbrain and Hindbrain Development." *Brain Research Reviews* 49(2):120–26.
- Nürnberg, Frank, and Sandra Schöniger. 2001. "Presence and Functional Significance of Neuropeptide and Neurotransmitter Receptors in Subcommissural Organ Cells." *Microscopy Research and Technique* 52(5):534–40. doi: 10.1002/1097-0029(20010301)52:5<534::AID-JEMT1038>3.0.CO;2-R.
- Ortega, Juan Alberto, and Soledad Alcántara. 2010. "BDNF/MAPK/ERK-Induced BMP7 Expression in the Developing Cerebral Cortex Induces Premature Radial Glia Differentiation and Impairs Neuronal Migration." *Cerebral Cortex* 20(9):2132–44. doi: 10.1093/cercor/bhp275.
- Parada, Carolina, Angel Gato, Mariano Aparicio, and David Bueno. 2006. "Proteome Analysis of Chick Embryonic Cerebrospinal Fluid." *Proteomics* 6(1):312–20. doi: 10.1002/pmic.200500085.
- Parada, Carolina, Ángel Gato, and David Bueno. 2005. "Mammalian Embryonic Cerebrospinal Fluid Proteome Has Greater Apolipoprotein and Enzyme Pattern Complexity than the Avian Proteome." *Journal of Proteome Research* 4(6):2420–28. doi: 10.1021/pr050213t.
- Parada, Carolina, Angel Gato, and David Bueno. 2008. "All-Trans Retinol and Retinol-Binding Protein from Embryonic Cerebrospinal Fluid Exhibit Dynamic Behaviour during Early Central Nervous System Development." *NeuroReport* 19(9):945–50. doi: 10.1097/WNR.0B013E3283021C94.
- Pasini, Andrea, and David G. Wilkinson. 2002. "Stabilizing the Regionalisation of the Developing Vertebrate Central Nervous System." *BioEssays* 24(5):427–38. doi: 10.1002/bies.10085.

- De Pasquale, Valeria, and Luigi Michele Pavone. 2019. "Heparan Sulfate Proteoglycans: The Sweet Side of Development Turns Sour in Mucopolysaccharidoses." *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease* 1865(11):165539.
- Pera, Edgar M., James I. Kim, Sarah L. Martinez, Mariel Brechner, Su Yu Li, Oliver Wessely, and E. M. De Robertis. 2002. "Isthmin Is a Novel Secreted Protein Expressed as Part of the Fgf-8 Synexpression Group in the Xenopus Midbrain–Hindbrain Organizer." *Mechanisms of Development* 116(1–2):169–72. doi: 10.1016/S0925-4773(02)00123-5.
- Pinson, Kathleen I., Jane Brennan, Susan Monkley, Brian J. Avery, and William C. Skarnes. 2000. "An LDL-Receptor-Related Protein Mediates Wnt Signalling in Mice." *Nature* 407(6803):535–38. doi: 10.1038/35035124.
- Plotnikov, Alexander N., Stevan R. Hubbard, Joseph Schlessinger, and Moosa Mohammadi. 2000. "Crystal Structures of Two FGF-FGFR Complexes Reveal the Determinants of Ligand-Receptor Specificity." *Cell* 101(4):413–24. doi: 10.1016/S0092-8674(00)80851-X.
- Poulain, Morgane, Maximilian Fürthauer, Bernard Thisse, Christine Thisse, and Thierry Lepage. 2006. "Zebrafish Endoderm Formation Is Regulated by Combinatorial Nodal, FGF and BMP Signalling." *Development* 133(11):2189–2200. doi: 10.1242/DEV.02387.
- Ringwald, Martin, Joel E. Richardson, Richard M. Baldarelli, Judith A. Blake, James A. Kadin, Cynthia Smith, and Carol J. Bult. 2022. "Mouse Genome Informatics (MGI): Latest News from MGD and GXD." *Mammalian Genome : Official Journal of the International Mammalian Genome Society* 33(1):4–18. doi: 10.1007/S00335-021-09921-0.
- Risso, Davide. 2013. *RUVSeq: Remove Unwanted Variation from RNA-Seq Data*.
- Rodríguez, Esteban M., Andreas Oksche, Silvia Hein, and Carlos R. Yulis. 1992. "Cell Biology of the Subcommissural Organ." Pp. 39–121 in.
- Rodríguez, Esteban M., Sara Rodríguez, and Silvia Hein. 1998. "The Subcommissural Organ." *Microscopy Research and Technique* 41(2):98–123. doi: 10.1002/(SICI)1097-0029(19980415)41:2<98::AID-JEMT2>3.0.CO;2-M.
- Rubenstein, John L. R., Salvador Martinez, Kenji Shimamura, and Luis Puelles Nina. 1994. "The Embryonic Vertebrate Forebrain: The Prosomeric Model." *Science (New York, N.Y.)* 266(5185):578–80. doi: 10.1126/SCIENCE.7939711.
- Sahara, Setsuko, and Dennis D. M. O’Leary. 2009. "Fgf10 Regulates Transition Period of Cortical Stem Cell Differentiation to Radial Glia Controlling

- Generation of Neurons and Basal Progenitors." *Neuron* 63(1):48–62. doi: 10.1016/j.neuron.2009.06.006.
- Sakka, Laurent, Nathalie Delétage, Fabrice Lalloué, Amélie Duval, Jean Chazal, Jean Jacques Lemaire, Annie Meiniel, Hubert Monnerie, and Stéphane Gobron. 2014. "SCO-Spondin Derived Peptide NX210 Induces Neuroprotection in Vitro and Promotes Fiber Regrowth and Functional Recovery after Spinal Cord Injury." *PLoS ONE* 9(3):93179. doi: 10.1371/journal.pone.0093179.
- Saunders, Lauren P., Wenxiang Cao, William C. Chang, Ronald A. Albright, Demetrios T. Braddock, and Enrique M. De La Cruz. 2011. "Kinetic Analysis of Autotaxin Reveals Substrate-Specific Catalytic Pathways and a Mechanism for Lysophosphatidic Acid Distribution." *Journal of Biological Chemistry* 286(34):30130–41. doi: 10.1074/jbc.M111.246884.
- Schaeffer, Julia, David Tannahill, Jean Michel Cioni, Dáire Rowlands, and Roger Keynes. 2018. "Identification of the Extracellular Matrix Protein Fibulin-2 as a Regulator of Spinal Nerve Organization." *Developmental Biology* 442(1):101–14. doi: 10.1016/J.YDBIO.2018.06.014.
- Schilling, Thomas F. 2008. "Anterior-Posterior Patterning and Segmentation of the Vertebrate Head." *Integrative and Comparative Biology* 48(5):658. doi: 10.1093/ICB/ICN081.
- Schlessinger, Joseph, Alexander N. Plotnikov, Omar A. Ibrahimi, Anna V. Eliseenkova, Brian K. Yeh, Avner Yayon, Robert J. Linhardt, and Moosa Mohammadi. 2000a. "Crystal Structure of a Ternary FGF-FGFR-Heparin Complex Reveals a Dual Role for Heparin in FGFR Binding and Dimerization." *Molecular Cell* 6(3):743–50. doi: 10.1016/S1097-2765(00)00073-3.
- Schlessinger, Joseph, Alexander N. Plotnikov, Omar A. Ibrahimi, Anna V. Eliseenkova, Brian K. Yeh, Avner Yayon, Robert J. Linhardt, and Moosa Mohammadi. 2000b. "Crystal Structure of a Ternary FGF-FGFR-Heparin Complex Reveals a Dual Role for Heparin in FGFR Binding and Dimerization." *Molecular Cell* 6(3):743–50. doi: 10.1016/S1097-2765(00)00073-3.
- Schoenwolf, G. C., and J. L. Smith. 1990. "Mechanisms of Neurulation: Traditional Viewpoint and Recent Advances." *Development (Cambridge, England)* 109(2):243–70. doi: 10.1242/DEV.109.2.243.
- Schoenwolf, Gary C. 2018. "Contributions of the Chick Embryo and Experimental Embryology to Understanding the Cellular Mechanisms of Neurulation." *International Journal of Developmental Biology* 62(1–3):49–55. doi: 10.1387/ijdb.170288gs.

- Segkilia, Aikaterini, Eve Seuntjens, Maximilianos Elkouris, Sotiris Tsalavos, Elke Stappers, Thimios A. Mitsiadis, Danny Huylebroeck, Eumorphia Remboutsika, and Daniel Graf. 2012. "Bmp7 Regulates the Survival, Proliferation, and Neurogenic Properties of Neural Progenitor Cells during Corticogenesis in the Mouse." *PLoS ONE* 7(3). doi: 10.1371/journal.pone.0034088.
- Sepúlveda, Vania, Felipe Maurelia, Maryori González, Jaime Aguayo, and Teresa Caprile. 2021. "SCO-Spondin, a Giant Matricellular Protein That Regulates Cerebrospinal Fluid Activity." *Fluids and Barriers of the CNS* 2021 18:1 18(1):1–24. doi: 10.1186/S12987-021-00277-W.
- Sheeba, Caroline J., Raquel P. Andrade, Delphine Duprez, and Isabel Palmeirim. 2010a. "Comprehensive Analysis of Fibroblast Growth Factor Receptor Expression Patterns during Chick Forelimb Development." *The International Journal of Developmental Biology* 54(10):1515–24. doi: 10.1387/IJDB.092887CS.
- Sheeba, Caroline J., Raquel P. Andrade, Delphine Duprez, and Isabel Palmeirim. 2010b. "Comprehensive Analysis of Fibroblast Growth Factor Receptor Expression Patterns during Chick Forelimb Development." *International Journal of Developmental Biology* 54(10):1515–24. doi: 10.1387/ijdb.092887cs.
- Shirasaki, Ryuichi, Joseph W. Lewcock, Karen Lettieri, and Samuel L. Pfaff. 2006. "FGF as a Target-Derived Chemoattractant for Developing Motor Axons Genetically Programmed by the LIM Code." *Neuron* 50(6):841–53. doi: 10.1016/j.neuron.2006.04.030.
- Sicot, Francois-Xavier, Takeshi Tsuda, Dessislava Markova, John F. Klement, Machiko Arita, Rui-Zhu Zhang, Te-Cheng Pan, Robert P. Mecham, David E. Birk, and Mon-Li Chu. 2023. "Fibulin-2 Is Dispensable for Mouse Development and Elastic Fiber Formation." <https://doi.org/10.1128/MCB.01876-07> 28(3):1061–67. doi: 10.1128/MCB.01876-07.
- Simon, Claire S., and Anna Katerina Hadjantonakis. 2018. "Top to Tail: Anterior-Posterior Patterning Precedes Regional Nervous System Identity." *Cell* 175(4):905–7.
- Smith, Jodi L., and Gary C. Schoenwolf. 1997. "Neurulation: Coming to Closure." *Trends in Neurosciences* 20(11):510–17. doi: 10.1016/S0166-2236(97)01121-1.
- Stanic, Karen, Hernan Montecinos, Teresa Caprile, A. Vera, M. González, A. Recabal, A. Astuya, and Marcela Torrejón. 2014. "Complementary Expression of EphA7 and SCO-Spondin during Posterior Commissure Development." *Frontiers in Neuroanatomy* 8(JUN). doi: 10.3389/FNANA.2014.00049.

- Stanley, Sarah, and Christoph Buettner. 2014. "FGF19: How Gut Talks to Brain to Keep Your Sugar Down." *Molecular Metabolism* 3(1):3. doi: 10.1016/J.MOLMET.2013.10.008.
- Storey, Kate G., Anne Goriely, Catherine M. Sargent, Jennifer M. Brown, Helen D. Burns, Helen M. Abud, and John K. Heath. 1998. "Early Posterior Neural Tissue Is Induced by FGF in the Chick Embryo." *Development* 125(3):473–84. doi: 10.1242/dev.125.3.473.
- Storm, Elaine E., Sonia Garel, Ugo Borello, Jean M. Hebert, Salvador Martinez, Susan K. McConnel, Gail R. Martin, and John L. R. Rubenstein. 2006. "Dose-Dependent Functions of Fgf8 in Regulating Telencephalic Patterning Centers." *Development* 133(9):1831–44. doi: 10.1242/DEV.02324.
- Streit, Andrea, Alyson J. Berliner, Costis Papanayotou, Andrés Slrulnik, and Claudio D. Stern. 2000. "Initiation of Neural Induction by FGF Signalling before Gastrulation." *Nature* 2000 406:6791 406(6791):74–78. doi: 10.1038/35017617.
- Thawani, Ankita, Devika Sirohi, Richard J. Kuhn, and Donna M. Fekete. 2018. "Zika Virus Can Strongly Infect and Disrupt Secondary Organizers in the Ventricular Zone of the Embryonic Chicken Brain." *Cell Reports* 23(3):692–700. doi: 10.1016/j.celrep.2018.03.080.
- Theil, Thomas, Elena Dominguez-Frutos, and Thomas Schimmang. 2008. "Differential Requirements for Fgf3 and Fgf8 during Mouse Forebrain Development." *Developmental Dynamics* 237(11):3417–23. doi: 10.1002/DVDY.21765.
- Tole, Shubha, Grigoriy Gutin, Lahar Bhatnagar, Ryan Remedios, and Jean M. Hébert. 2006. "Development of Midline Cell Types and Commissural Axon Tracts Requires Fgfr1 in the Cerebrum." *Developmental Biology* 289(1):141–51. doi: 10.1016/J.YDBIO.2005.10.020.
- Touat, Mehdi, Ecaterina Ileana, Sophie Postel-Vinay, Fabrice André, and Jean Charles Soria. 2015. "Targeting FGFR Signaling in Cancer." *Clinical Cancer Research* 21(12):2684–94. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-14-2329.
- Toyoda, Reiko, Stavroula Assimacopoulos, Jennifer Wilcoxon, Albert Taylor, Polina Feldman, Asuka Suzuki-Hirano, Tomomi Shimogori, and Elizabeth A. Grove. 2010. "FGF8 Acts as a Classic Diffusible Morphogen to Pattern the Neocortex." *Development* 137(20):3439–48. doi: 10.1242/DEV.055392/-/DC1.
- Turner, Courtney A., Robert C. Thompson, William E. Bunney, Alan F. Schatzberg, Jack D. Barchas, Richard M. Myers, Huda Akil, and Stanley J. Watson. 2014. "Altered Choroid Plexus Gene Expression in Major Depressive Disorder."

*Frontiers in Human Neuroscience* 8(1 APR):81588. doi:  
10.3389/FNHUM.2014.00238/ABSTRACT.

Ulloa, Fausto, and Elisa Martí. 2010. "Wnt Won the War: Antagonistic Role of Wnt over Shh Controls Dorso-Ventral Patterning of the Vertebrate Neural Tube." *Developmental Dynamics* 239(1):69–76.

Vera, A., K. Stanic, H. Montecinos, M. Torrejón, S. Marcellini, and T. Caprile. 2013. "SCO-Spondin from Embryonic Cerebrospinal Fluid Is Required for Neurogenesis during Early Brain Development." *Frontiers in Cellular Neuroscience* 7(MAY):1–14. doi: 10.3389/fncel.2013.00080.

Vera, America, Antonia Recabal, Natalia Saldivia, Karen Stanic, Marcela Torrejon, Hernán Montecinos, and Teresa Caprile. 2015. "Interaction between Sco-Spondin and Low Density Lipoproteins from Embryonic Cerebrospinal Fluid Modulates Their Roles in Early Neurogenesis." *Frontiers in Neuroanatomy* 9(May):1–12. doi: 10.3389/fnana.2015.00072.

Vieira, Claudia, Ana Pombero, Raquel García-Lopez, Lourdes Gimeno, Diego Echevarria, and Salvador Martínez. 2010. "Molecular Mechanisms Controlling Brain Development: An Overview of Neuroepithelial Secondary Organizers." *International Journal of Developmental Biology* 54(1):7–20. doi: 10.1387/ijdb.092853cv.

Walshe, Jennifer, and Ivor Mason. 2000a. "Expression of FGFR1, FGFR2 and FGFR3 during Early Neural Development in the Chick Embryo." *Mechanisms of Development* 90(1):103–10. doi: 10.1016/S0925-4773(99)00225-7.

Walshe, Jennifer, and Ivor Mason. 2000b. "Expression of FGFR1, FGFR2 and FGFR3 during Early Neural Development in the Chick Embryo." *Mechanisms of Development* 90(1):103–10. doi: 10.1016/S0925-4773(99)00225-7.

Wartlick, Ortrud, Anna Kicheva, and Marcos González-Gaitán. 2009. "Morphogen Gradient Formation." *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 1(3):a001255. doi: 10.1101/cshperspect.a001255.

Wilde, Jonathan J., Juliette R. Petersen, and Lee Niswander. 2014. "Genetic, Epigenetic, and Environmental Contributions to Neural Tube Closure." *Annual Review of Genetics* 48(1):583–611. doi: 10.1146/annurev-genet-120213-092208.

WJ, Kuo, Digman MA, and Lander AD. 2010. "Heparan Sulfate Acts as a Bone Morphogenetic Protein Coreceptor by Facilitating Ligand-Induced Receptor Hetero-Oligomerization." *Molecular Biology of the Cell* 21(22):4028–41. doi: 10.1091/MBE.10-04-0348.

Wu, Tianzhi, Erqiang Hu, Shuangbin Xu, Meijun Chen, Pingfan Guo, Zehan Dai, Tingze Feng, Lang Zhou, Wenli Tang, Li Zhan, Xiaocong Fu, Shanshan Liu,

- Xiaochen Bo, and Guangchuang Yu. 2021. "ClusterProfiler 4.0: A Universal Enrichment Tool for Interpreting Omics Data." *Innovation* 2(3):100141. doi: 10.1016/j.xinn.2021.100141.
- Yamanaka, Yojiro, Fredrik Lanner, and Janet Rossant. 2010. "FGF Signal-Dependent Segregation of Primitive Endoderm and Epiblast in the Mouse Blastocyst." *Development* 137(5):715–24. doi: 10.1242/DEV.043471.
- Yan, Dong, and Xinhua Lin. 2009. "Shaping Morphogen Gradients by Proteoglycans." *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 1(3). doi: 10.1101/cshperspect.a002493.
- Yang, Jung Lynn Jonathan, Gabriel E. Bertolesi, Carrie L. Hehr, Jillian Johnston, and Sarah McFarlane. 2018. "Fibroblast Growth Factor Receptor 1 Signaling Transcriptionally Regulates the Axon Guidance Cue Slit1." *Cellular and Molecular Life Sciences* 75(19):3649–61. doi: 10.1007/s00018-018-2824-x.
- Yeh, Brian K., Makoto Igarashi, Anna V. Eliseenkova, Alexander N. Plotnikov, Ifat Sher, Dina Ron, Stuart A. Aaronson, and Moosa Mohammadi. 2003. "Structural Basis by Which Alternative Splicing Confers Specificity in Fibroblast Growth Factor Receptors." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100(5):2266–71. doi: 10.1073/PNAS.0436500100/ASSET/15A5A741-E59E-4A26-B5CE-64FE017F7AF6/ASSETS/GRAPHIC/PQ0436500006.JPEG.
- Yu, Chien-Hung, Yunkun Dang, Zhipeng Zhou, Cheng Wu, Fangzhou Zhao, Matthew S. Sachs, and Yi Liu. 2015. "Codon Usage Influences the Local Rate of Translation Elongation to Regulate Co-Translational Protein Folding." *Molecular Cell* 59(5):744–54. doi: 10.1016/j.molcel.2015.07.018.
- Yuelling, Larra W., Christopher T. Waggener, Fatemah S. Afshari, James A. Lister, and Babette Fuss. 2012. "Autotaxin/ENPP2 Regulates Oligodendrocyte Differentiation in Vivo in the Developing Zebrafish Hindbrain." *Glia* 60(10):1605. doi: 10.1002/GLIA.22381.
- Zappaterra, Mauro W., and Maria K. Lehtinen. 2012. "The Cerebrospinal Fluid: Regulator of Neurogenesis, Behavior, and Beyond." *Cellular and Molecular Life Sciences* 69(17):2863–78. doi: 10.1007/s00018-012-0957-x.
- Zhang, Xiuqin, Omar A. Ibrahimi, Shaun K. Olsen, Hisashi Umemori, Moosa Mohammadi, and David M. Ornitz. 2006. "Receptor Specificity of the Fibroblast Growth Factor Family: THE COMPLETE MAMMALIAN FGF FAMILY." *Journal of Biological Chemistry* 281(23):15694–700. doi: 10.1074/JBC.M601252200.
- Zhao, Yingdong, Ming Chung Li, Mariam M. Konaté, Li Chen, Biswajit Das, Chris Karlovich, P. Mickey Williams, Yvonne A. Evrard, James H. Doroshov, and

Lisa M. McShane. 2021. "TPM, FPKM, or Normalized Counts? A Comparative Study of Quantification Measures for the Analysis of RNA-Seq Data from the NCI Patient-Derived Models Repository." *Journal of Translational Medicine* 19(1):1–15. doi: 10.1186/S12967-021-02936-W/FIGURES/5.

Zhou, C. J., U. Borello, J. L. R. Rubenstein, and S. J. Pleasure. 2006. "Neuronal Production and Precursor Proliferation Defects in the Neocortex of Mice with Loss of Function in the Canonical Wnt Signaling Pathway." *Neuroscience* 142(4):1119–31. doi: 10.1016/J.NEUROSCIENCE.2006.07.007.