



Universidad Austral de Chile

Facultad de Ciencias

Profesor Patrocinante
Dra. Karin Vío Asenjo
Instituto de Anatomía, Histología y
Patología
Facultad de Medicina

**ANÁLISIS DE GLICOPROTEÍNAS SECRETADAS POR EL
ÓRGANO SUBCOMISURAL (OSC) HACIA EL LÍQUIDO
CEFALORRAQUÍDEO (LCR) EN RATAS MUTANTES
HIDROCEFÁLICAS H-TX Y DE SU EFECTO SOBRE EL
DESARROLLO DE LA CORTEZA CEREBRAL**

**Tesis de Grado presentada como parte
de los requisitos para optar al grado de
Licenciado en Bioquímica y **Título
Profesional de Bioquímico****

CATHERINNE ALEJANDRA JARAMILLO BELLAZZI

VALDIVIA – CHILE

2009

*A mi familia, la que ha estado
constantemente a mi lado, apoyándome
y siendo fuente de paz.*

Esta Tesis fue realizada en el Instituto de Anatomía, Histología y Patología, Facultad de Medicina, Universidad Austral de Chile, y fue financiada a través de subsidios otorgados por la Dirección de Investigación y Desarrollo de la Universidad Austral de Chile (DID-UACH S-2006-72/S-2006-74), el Fondo Nacional de Desarrollo Científico y Tecnológico a través de los proyectos FONDECYT 107241 y BICENTENARIO IPA 004, a nuestro grupo de trabajo.

Agradecimientos

A quienes componen mi familia, papá, mamá, Yosi y Rayén quienes siempre me han apoyado y no han permitido que decaiga.

A quienes me brindaron su confianza, apoyo y consejos en la realización de esta Tesis, a Dra. Karin Vío, Dr. Esteban Rodríguez y Dra. Rosa Muñoz.

A quienes colaboraron conmigo en los diferentes métodos empleados en esta Tesis, a Don Genaro Alvial, Dr. Andrés Carvajal, Dr. César González y Dr. Carlos Yulis.

A quienes me apoyaron con sus consejos e hicieron de mi estadía en el laboratorio un grato momento, Dra. Montserrat Guerra, Dr. Federico Bátiz y a una nueva amiga Alejandra Aguilar.

A mis amigos, que me acompañaron cada vez que los necesité, Ella Matamala, Natalia Costa, John Córdova, Lorena Abarzúa.

En general a quienes componen el Instituto de Histología.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

| | Página |
|---|---------------|
| 1. RESUMEN | 1 |
| 1.1 SUMMARY | 3 |
| 2. INTRODUCCIÓN | 5 |
| 2.1 Líquido cefalorraquídeo | 5 |
| 2.2 LCR e hidrocefalia | 8 |
| 2.3 Órgano subcomisural | 10 |
| 3. MATERIALES Y MÉTODOS | 17 |
| 3.1 Reactivos químicos | 17 |
| 3.2 Animales de experimentación | 18 |
| 3.3 Extracción LCR | 19 |
| 3.4 Extractos OSC | 20 |
| 3.5 Cuantificación de proteínas | 20 |
| 3.6 Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones denaturantes (SDS-PAGE) | 21 |
| 3.7 Electrotransferencia | 22 |
| 3.8 Inmunodetección | 22 |
| 3.9 Electroforesis bidimensional (2D-PAGE) | 23 |
| 3.9.1 Preparación de la muestra | 24 |
| 3.9.2 Primera dimensión | 24 |

| | Página |
|---|---------------|
| 3.9.3 Segunda dimensión | 25 |
| 3.9.4 Electrotransferencia 2D-PAGE | 26 |
| 3.10 Tinción con plata | 27 |
| 3.11 Medios para los cultivo de células troncales | 27 |
| 3.11.1 Soluciones madre | 27 |
| 3.11.2 Medio control | 28 |
| 3.11.3 Medio de crecimiento | 28 |
| 3.11.4 Medio de diferenciación | 28 |
| 3.12 Cultivo de células troncales nerviosas | 29 |
| 3.13 Inmunocitoquímica | 30 |
| 3.14 Adquisición de imágenes | 31 |
| 3.15 Análisis geles unidimensionales | 32 |
| 3.16 Análisis geles 2D-PAGE | 32 |
| 3.17 Estandarización para cuantificar <i>spots</i> a través del programa UN-SCAN-IT gel | 33 |
| 4. RESULTADOS | 35 |
| 4.1 Análisis del órgano subcomisural | 35 |
| 4.1.1 Inmunocitoquímica del OSC | 35 |
| 4.1.2 Inmunoblot de extractos de OSC | 41 |
| 4.2 Variación de la concentración de proteínas en LCR | 43 |
| 4.3 Análisis inmunoquímico de la secreción del OSC LCR-soluble | 45 |

| | Página |
|--|---------------|
| 4.3.1 AFRU | 45 |
| 4.3.2 Anti-p15 | 53 |
| 4.4 Análisis comparativo entre muestras de LCR de ratas H-Tx normal e hidrocefálico a través de electroforesis bidimensional | 56 |
| 4.4.1 Electroforesis bidimensional. Análisis de la proteómica del LCR de ratas H-Tx normal e hidrocefálico a través de tinción con plata | 56 |
| 4.4.1.1 Proteínas presentes sólo en LCR de ratas H-Tx normal | 60 |
| 4.4.1.2 Proteínas presentes sólo en LCR de ratas H-Tx hidrocefálica | 60 |
| 4.4.1.3 Proteínas en mayor concentración en LCR de ratas H-Tx normal | 63 |
| 4.4.1.4 Proteínas en mayor concentración en LCR de ratas H-Tx hidrocefálico | 63 |
| 4.4.2 Análisis a través de inmunoblot de geles 2D-PAGE | 72 |
| 4.4.2.1 Análisis utilizando AFRU | 72 |
| 4.4.2.2 Análisis de muestras de LCR utilizando el anticuerpo anti-transtirretina | 79 |
| 4.5 Estudio preliminar del efecto del LCR sobre cultivo de neuroesferas | 81 |
| 5 DISCUSIÓN | 88 |
| 5.1 La rata H-Tx como modelo de estudio para hidrocefalia | 89 |
| 5.2 Hidrocefalia en ratas H-Tx asociada a la agenesia del OSC | 90 |
| 5.2.1 Una alteración primaria del complejo OSC-FR sería parte del mecanismo que conduciría al desarrollo de hidrocefalia en las ratas H-Tx | 91 |

| | Página |
|--|---------------|
| 5.2.2 Alteración de la actividad secretoria del OSC de ratas H-Tx hidrocefálicas | 92 |
| 5.3 Análisis proteómico del LCR de ratas H-Tx hidrocefálicas en investigación. | 94 |
| 5.3.1 Reproducibilidad de geles 2D-PAGE de LCR | 95 |
| 5.3.2 Cambios en la proteómica del LCR de ratas H-Tx hidrocefálicas | 96 |
| 5.4 La variación en la composición proteica del LCR hidrocefálico estaría asociada a cambios en las glicoproteínas secretadas por el OSC | 97 |
| 5.5 ¿Existe una vía compensatoria de circulación del LCR en la rata H-Tx hidrocefálicas? | 100 |
| 5.6 ¿Existen otras proteínas candidatas que alteran la composición del LCR hidrocefálico? | 102 |
| 5.7 Desarrollo cortical en ratas H-Tx. Aproximación a través del cultivo de neuroesferas | 103 |
| 6 BIBLIOGRAFÍA | 108 |
| 7 ANEXO | 123 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | Página |
|---|---------------|
| Tabla 1: Expresión de péptidos inmunorreactivos con anti-p15 en diferentes etapas del desarrollo, en LCR de ratas H-Tx normales e hidrocefálicas | 55 |
| Tabla 2: <i>Spots</i> AFRU positivos en 2D-PAGE | 75 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1: Circulación LCR | 7 |
| Figura 2: Ubicación del OSC | 11 |
| Figura 3: Inmunocitoquímica de cerebro de rata H-Tx en PN1 con AFRU | 38 |
| Figura 4: Inmunocitoquímica de cerebro de rata H-Tx en PN30 con AFRU | 40 |
| Figura 5: Inmunoblot de extractos de OSC | 42 |
| Figura 6: Concentración de proteínas totales en LCR | 44 |
| Figura 7: Análisis por inmunoblot de LCR de fetos al E20 utilizando AFRU | 47 |
| Figura 8: Inmunoblot de LCR ratas H-Tx normales e hidrocefálicas en etapas postnatal con AFRU | 50 |
| Figura 9: Análisis densitométrico del péptido de 200 kDa en muestras de LCR de PN7 | 51 |
| Figura 10: Evaluación LCR de acuerdo al grado de hidrocefalia en rata H-Tx | 52 |
| Figura 11: Inmunoblot con anti-p15, de LCR de ratas H-Tx normales e hidrocefálicas en etapa postnatal | 54 |
| Figura 12: Proteoma LCR de rata H-Tx normal | 58 |

| | Página |
|---|---------------|
| Figura 13: Proteoma LCR de rata H-Tx hidrocefálico | 59 |
| Figura 14: <i>Spots</i> presentes sólo en LCR de ratas H-Tx normal o hidrocefálico | 62 |
| Figura 15: <i>Spot</i> 3 en mayor concentración en el LCR de ratas H-Tx normal de PN1 | 64 |
| Figura 16: <i>Spot</i> 2 en alta concentración en el LCR de rata H-Tx hidrocefálico | 65 |
| Figura 17: Estudio de <i>spots</i> que muestran mayor concentración en LCR de ratas H-Tx hidrocefálicas | 67 |
| Figura 18: Análisis densitométrico de los <i>spots</i> 32 y 33 en muestras de LCR | 68 |
| Figura 19: Análisis densitométrico del <i>spot</i> 37, en LCR de rata H-Tx de PN7 | 70 |
| Figura 20: Análisis densitométrico del <i>spot</i> 37, en LCR de rata H-Tx de PN30 | 71 |
| Figura 21: Análisis en geles 2D-PAGE de muestras de LCR de ratas H-Tx en PN1 mediante inmunoblot utilizando AFRU | 74 |
| Figura 22: Análisis de LCR de ratas H-Tx en PN7 en 2D-PAGE mediante inmunoblot utilizando AFRU | 77 |
| Figura 23: Inmunoblot LCR de ratas H-Tx en PN30 en 2D-PAGE utilizando AFRU | 78 |
| Figura 24: Estudio mediante inmunoblot de muestras de LCR de ratas H-Tx en PN1 con anti TTR | 80 |
| Figura 25: Obtención de neuroesferas a partir de la pared de los VL de rata H-Tx normales e hidrocefálicas | 84 |
| Figura 26: Neuroesferas de ratas H-Tx (4DIV) tratadas con LCR de ratas normales e hidrocefálicas por dos días | 85 |

| | Página |
|---|---------------|
| Figura 27: Análisis de las células originadas a partir de las neuroesferas tratadas con LCR | 86 |
| Figura 28: Evaluación de génesis de neuritas a partir de cultivos de neuroesferas diferenciadas | 87 |

ÍNDICE DE ABREVIACIONES

| | |
|-------|--|
| AFRU | anticuerpo anti-FR |
| AS | acueducto de Silvio |
| BSA | albúmina de suero bovino |
| CHAPS | 3-[(3-colamidopropil) dimetil amonio]-1-propanosulfonato |
| CM | cisterna Magna |
| DTT | ditiotreitól |
| E | embrionario |
| EBBS | solución salina balanceada de Earle |
| EGF | factor de crecimiento epidermal |
| FR | fibra de Reissner |
| GD | giro dentado |
| H-Tx | <i>hydrocephalyc</i> Texas |
| IEF | isoelectroenfoque |
| IPG | gradiente de pH inmovilizado |
| LCR | líquido cefalorraquídeo |
| LCR-E | líquido cefalorraquídeo embrionario |
| OSC | órgano subcomisural |
| PBS | tampón fosfato salino |
| PC | plexos coroideos |
| pI | punto isoelectrico |
| PMSF | fenilmetilsulfonil fluoruro |

| | |
|---------|---------------------------------------|
| PN | postnatal |
| SBF | suero de bovino fetal |
| SDS | dodecil sulfato de sodio |
| SNC | sistema nervioso central |
| TEMED | N-N,N',N'-tetrametilendiamina |
| Tris | Tris-(hidroximetil)-aminometano |
| Tween20 | monolaurato de polioxietilen sorbitan |
| VL | ventrículo lateral |
| ZSV | zona subventricular |
| 2D-PAGE | electroforesis bidimensional |
| III v | tercer ventrículo |

1. RESUMEN

Durante el desarrollo fetal, el líquido cefalorraquídeo (LCR) circula a través del sistema ventricular hacia el espacio subaracnoideo, bañando el epitelio germinal de la corteza cerebral. El bloqueo en la circulación del LCR resulta en el desarrollo de hidrocefalia. En algunos modelos animales, como la rata H-Tx, está asociado con (1) un mal desarrollo del órgano subcomisural (OSC), glándula que secreta glicoproteínas hacia el LCR y (2) una disminución del grosor de la corteza cerebral. Considerando que algunas proteínas secretadas por el OSC participan en los procesos de diferenciación neuronal; variaciones en la proteómica del LCR de ratas H-Tx hidrocefálicas, incluyendo alteraciones de proteínas secretadas por el OSC, podrían explicar uno de los mecanismos involucrados en la patogénesis de los defectos corticales observados en este modelo. Usando técnicas de análisis proteómico (electroforesis unidimensional, 2D-PAGE, tinción con plata e Inmunoblot), nosotros identificamos cambios en la proteómica del LCR de ratas H-Tx hidrocefálicas. Nosotros encontramos diferencias cuantitativas y/o cualitativas entre LCR normal e hidrocefálico en al menos diez proteínas. Cuatro de estas proteínas corresponden a proteínas secretadas por el OSC. Para evaluar el efecto de tales variaciones sobre la biología de las células *stem* neurales, nosotros realizamos estudios *in vitro* usando el sistema de cultivo de neuroesferas (NE). El ensayo de diferenciación demostró que las neuronas derivadas desde las NE tratadas con LCR de ratas H-Tx hidrocefálicas mostró un incremento en el número y largo de neuritas comparado con las neuronas derivadas de NE tratadas con LCR de ratas H-Tx normal. Nosotros concluimos que (1) la proteómica del LCR de ratas H-Tx

hidrocefálicas está alterada, (2) la alteración en la composición proteica del LCR hidrocefálico incluye modificaciones de las proteínas secretadas por el OSC, y (3) las alteraciones en el proteoma del LCR podrían participar en la patogénesis del mal desarrollo cortical de ratas H-Tx hidrocefálicas. Aún queda por investigar si las proteínas secretadas por el OSC tienen algún rol en las diferencias observadas en los experimentos con NE.

1.1 SUMMARY

During fetal development, the cerebrospinal fluid (CSF) flows through the ventricular system to the subarchnoid space, bathing the germinal epithelium of the cerebral cortex. A disturb in the CSF flow results in the development of hydrocephalus. In some animal models, like H-Tx rat, congenital hydrocephalus is associated with (1) a poor development of the subcommissural organ (SCO), gland secreting glycoproteins into the CSF and (2) a decrease in the thickness of the cerebral cortex. Considering that some proteins secreted by the SCO participate in neuronal differentiation precesses; changes in the proteomics of HTx-hydrocephalic CSF, including alterations of SCO-derived proteins, could explain one of the mechanisms involved in the pathogenesis of the cortical defects observed in this model. Using proteomic analysis techniques (one-dimensional electrophoresis, 2D-PAGE, silver stain and Western blot), we identified changes in the proteomics of hydrocephalyc-H-Tx rat CSF. We found cuantitative and/or cualitative differences between normal and hydrocephalic CSF in at least ten proteins. Four of these proteins were SCO-derived proteins. To evaluate the effect of such changes on neural stem biology, we performed in vitro studies using the neurosphere (NS) culture system. Differentiation assays demostrated that neurons derived from NS treated with hydrocephalic-HTx rat CSF showed an increase in number and lenght of neurites comparing with neurons derived from NS treated with normal-HTx rat CSF. We conclude that (1) the proteomics of hydrocephalic HT-X rat CSF is altered, (2) the alteration in hydrocephalic CSF protein composition includes modifications of SCO-derived proteins, and (3) the alterations in the CSF proteome could participate in the

pathogenesis of the cortical maldevelopment of hydrocephalic HT-x rats. It remains to be investigated whether the glycoproteins secreted by the SCO have a role in the differences observed in the neurospheres experiments.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Líquido cefalorraquídeo

El líquido cefalorraquídeo (LCR) ha sido estudiado históricamente en el contexto del cerebro adulto, atribuyéndole algunas funciones mecánicas tales como proteger y amortiguar el cerebro contra cambios en la presión sanguínea y traumas además de ayudar a mantener la homeostasis del cerebro con su medio. Pese a esto, son cada vez más las investigaciones que confieren al LCR un rol clave en etapas tempranas del desarrollo del sistema nervioso central (SNC) (Owen-Lynch *et al.*, 2003; Mashayekhi *et al.*, 2002; Miyan *et al.*, 2001).

El LCR es producido principalmente por los plexos coroideos (PC), los que incluyen epitelio coroidal, vasos sanguíneos y tejido conectivo intersticial. Estos plexos se forman como resultado de la invaginación del epéndimo hacia las cavidades ventriculares por vasos sanguíneos de la pía madre (Fishman *et al.*, 1992). Aproximadamente un 70-80% del LCR es producido por los PC de los ventrículos laterales (VL) y tercer ventrículo y un 10% por el cuarto ventrículo. Además de los PC, el LCR es producido por fuentes extracoroideas como el epéndimo ventricular y el parénquima cerebral (Oi y Rocco, 2006; Fishman *et al.*, 1992; Miyan *et al.*, 2003).

La circulación del LCR comienza desde los VL, bañando el epitelio germinal de la corteza cerebral, y pasa hacia el tercer ventrículo a través de los forámenes de Monro y desde aquí al cuarto ventrículo por el acueducto de Silvio (AS) (**Figura 1**). Durante el desarrollo temprano del SNC, el LCR circula dentro del canal central de la médula espinal, no existiendo un componente externo en su circulación. Sin embargo, en

etapas posteriores del desarrollo, la circulación del LCR se externaliza, pasando así desde el cuarto ventrículo hacia la cisterna Magna (CM) a través de los forámenes de Luschka y Magendie, para después seguir hacia el espacio subaracnoideo, donde una fracción del LCR asciende por sobre los hemisferios cerebrales y otra baña la médula espinal. Finalmente el LCR es reabsorbido a través de las vellosidades aracnoideas y el sistema linfático a nivel del bulbo olfatorio (**Figura 1**) (Miyan *et al*, 2003).

El LCR esta compuesto principalmente por proteínas e iones, la fracción proteica del LCR durante la etapa embrionaria es mucho más compleja y tiene una concentración mayor que en el LCR adulto (Miyan *et al*, 2003). En la rata el LCR obtenido en E18-E19, es capaz de mantener la viabilidad de células corticales y estimular su proliferación *in vitro*, aún más que el LCR obtenido en otras etapas del desarrollo. Estos datos han conducido a algunos investigadores a sugerir que el LCR embrionario (LCR-E) está involucrado en la regulación del comportamiento de las células neuroepiteliales (Dziegielewska *et al*, 2000; Miyan *et al*, 2003; Gato *et al*, 2004).

El neuroepitelio requiere de factores tróficos, los que son aportados por el LCR-E ayudando a mantener la sobrevivencia, proliferación y neurogénesis de las células madres neuroectodermales *in vitro* (Gato *et al*, 2005).

La importancia del LCR durante el desarrollo del SNC queda de manifiesto cuando existe alguna anomalía en el flujo del LCR, como pérdida (espina bífida) o bloqueo (hidrocefalia) de su circulación. Estas alteraciones se ven asociadas a anomalías en el desarrollo del SNC (mal desarrollo o alteración en la corteza cerebral) (Miyan *et al*, 2001; 2003).

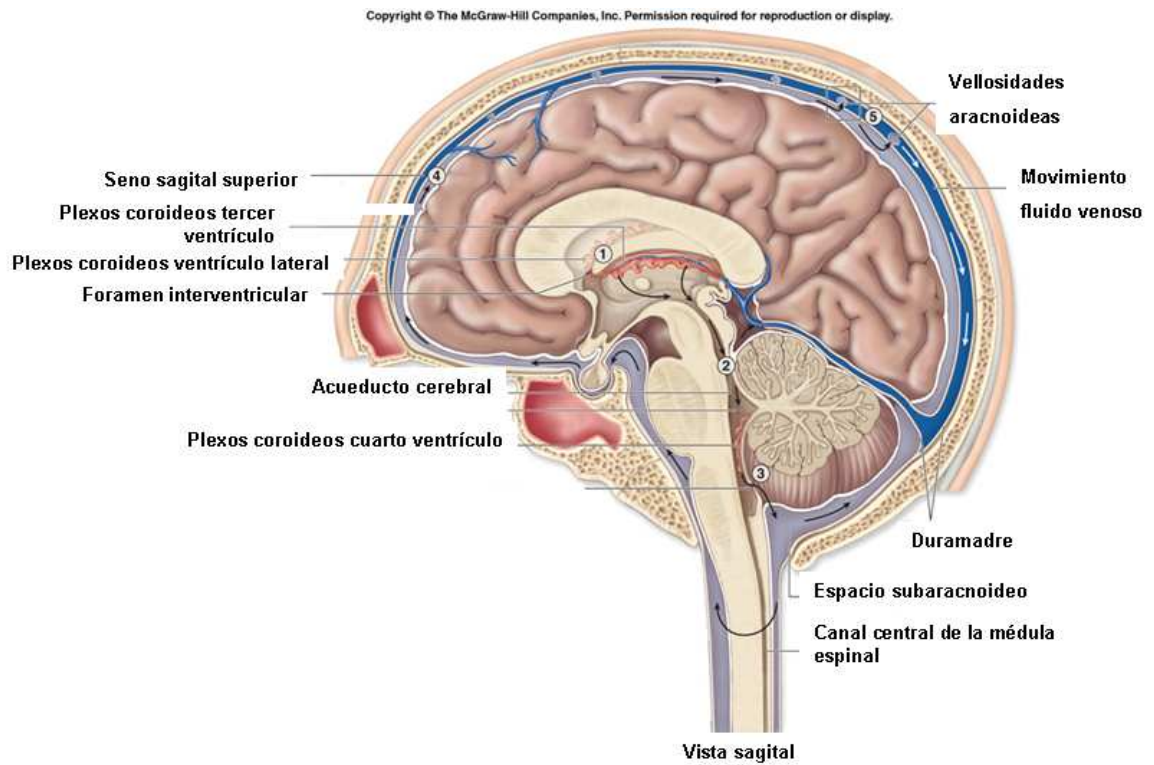


Figura 1. Circulación LCR. Esquema de una corte sagital de cerebro humano adulto, donde a través de flechas negras se indica la dirección de la circulación del LCR. (1) VL; (2) AS; (3) paso del LCR hacia la CM; (4) espacio subaracnoideo; (5) vellosidades aracnoideas.

2.2 LCR e hidrocefalia

La hidrocefalia es un desorden neurológico caracterizado por la acumulación de LCR dentro del cráneo y dilatación de los VL. En esta patología se produce un desequilibrio entre producción y absorción del LCR. Si consideramos que la producción de LCR es un proceso activo, mientras la absorción es un proceso pasivo, el desequilibrio generado en la hidrocefalia se debe principalmente a problemas en la absorción del LCR, pudiendo ser ésta por deficiencias en el propio mecanismo de absorción o por problemas en la circulación del LCR (más frecuente).

La clasificación clásica de la hidrocefalia la define como congénita o adquirida; la hidrocefalia congénita se halla presente al nacer y puede ser ocasionada por la influencia de factores ambientales durante el desarrollo fetal o por predisposición genética; la hidrocefalia adquirida se desarrolla en el momento del nacimiento o posterior a este (en cualquier época de la vida postnatal) debido por ejemplo a hemorragias intraventriculares, meningitis o tumores.

En humanos, la hidrocefalia congénita afecta a 1-3 por cada mil nacidos vivos, alcanzando una tasa de mortalidad de un 50% si estos casos no son atendidos (tratamientos derivativos).

La hidrocefalia también puede ser clasificada como comunicante o no comunicante (McComb, 1997), esto quiere decir si hay o no interrupción en el flujo del LCR. Es así como en la hidrocefalia comunicante la deficiencia en la circulación del LCR es distal a los ventrículos, principalmente a nivel del espacio subaracnoideo, sin embargo, en la hidrocefalia no comunicante algún tipo de lesiones, tales como oclusión del acueducto, obstrucción en la salida del cuarto ventrículo, tumores adyacentes a la

pared ventricular, hemorragias e infecciones del sistema ventricular impiden un flujo normal de LCR. El AS es el sitio más frecuente de obstrucción, los mecanismos por los cuales surge el daño o deterioro del AS y la pérdida de circulación del LCR no están claros.

Una de las interrogantes que surgen con respecto a la hidrocefalia congénita es si el cierre del AS es origen o consecuencia de la hidrocefalia o es sólo un evento coincidente. La alteración en la circulación del LCR y la consecuente o coincidente hidrocefalia, llevan a cambios o alteraciones en el desarrollo cortical, lo cual ha sido descrito en la mayoría de los modelos animales experimentales estudiados y también en algunos casos de hidrocefalia en humanos en los cuales la hidrocefalia es de inicio temprano (Rekate *et al*, 1997; Bannister *et al*, 2000).

Existen estudios en un animal mutante espontáneo para esta patología, la rata mutante *hydrocephalic Texas* (H-Tx), estos han dejado en evidencia que esta mutante presenta alteraciones en el desarrollo de su corteza cerebral. Este defecto aparece después de que el flujo del LCR es obstruido en el día E18 durante el desarrollo de fetos hidrocefálicos (Mashayekhi *et al*, 2002).

Si bien se creía que esta disminución en el tamaño de la corteza cerebral se debía a la presión que ejerce el LCR sobre las paredes de los VL, en este modelo de ratas la presión intracraneal no aumenta sino hasta el día 10 después del nacimiento (Jones *et al*, 1998; Kaiser y Jones, 1991). En investigaciones recientes se ha planteado que un anormal funcionamiento de las células *stem* de la matriz germinal y de las células progenitoras, podría ocurrir luego de la obstrucción del LCR en la hidrocefalia, con el consecuente daño cortical (Mashayekhi *et al*, 2002).

2.3 Órgano subcomisural

El órgano subcomisural (OSC) es una estructura antigua y filogenéticamente conservada, presente en todo el *phylum* vertebrado (Oksche, 1993). Durante la ontogenia es una de las primeras estructuras cerebrales en diferenciarse y alcanza su máximo desarrollo durante la etapa embrionaria, representando una de las primeras estructuras secretoras (Rodríguez *et al*, 1998). Permanece activo por toda la vida con excepción de humanos y murciélagos, donde involuciona luego del nacimiento (Rodríguez *et al*, 2001).

El OSC es una pequeña glándula cerebral, compuesta por un epéndimo altamente diferenciado que cubre la región dorsal de la comisura posterior. Está compuesto de dos tipos celulares, las endodimales e hipendimales. Las primeras liberan su secreción hacia el LCR y las hipendimales proyectan procesos hacia los vasos sanguíneos y hacia el espacio subaracnoideo. (Leonhardt *et al*, 1980; Rodríguez *et al*, 1992). Esta glándula se encuentra ubicada en la región dorso-caudal del tercer ventrículo, en la entrada del AS (**Figura 2**).

Las células endodimales del OSC secretan hacia el LCR ventricular glicoproteínas de alto peso molecular (precursores de 540 y 320 kDa), las cuales se agregan para formar una estructura filamentosa conocida como fibra de Reissner (FR). La FR es una estructura dinámica que crece caudalmente desde el OSC, por lo largo del acueducto cerebelar, cuarto ventrículo y canal central del cordón espinal (Rodríguez *et al*, 1998). La FR es renovada continuamente en su extremo cefálico por adición de material secretado por el OSC, y es degradada a nivel de la *ampulla caudalis*, principal sitio de escape del LCR hacia la sangre, esto al menos en vertebrados inferiores,

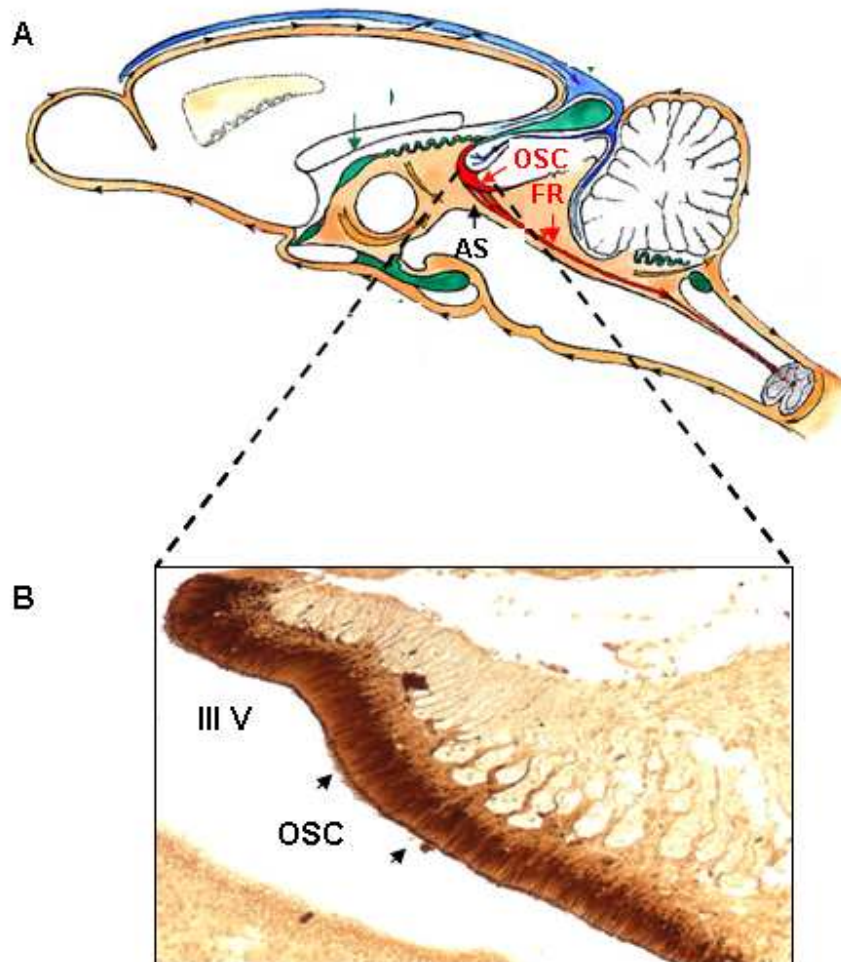


Figura 2. Ubicación del OSC. En A, se muestran un esquema de un corte sagital de cerebro de rata adulta, en donde con flechas rojas se indican la ubicación del OSC y FR. En B, inmunocitoquímica usando AFRU como primer anticuerpo, se observa la tinción del OSC (indicado con flechas negras). OSC: órgano subcomisural; III V: tercer ventrículo; AS: acueducto de Silvio; FR: fibra de Reissner.

mientras en mamíferos la ruta predominante es a través de las vellosidades aracnoideas (Meinzel *et al*, 2007). La función de la FR estaría relacionada con la depuración de ciertas monoaminas desde el LCR, a través del complejo OSC-FR (Rodríguez *et al*, 1999).

Al parecer el OSC también estaría secretando material soluble hacia el LCR (Rodríguez *et al*, 1993). Estudios realizados en embriones de pollo, confirman que el OSC comienza a liberar material secretorio varios días antes de la formación de la FR, lo que indica que la primera secreción del OSC permanece soluble en el LCR (Schoebitz *et al*, 1986). Una situación similar ha sido reportada en ratas, en donde la liberación ventricular ha sido observada en fetos de 21 días y donde la FR no es formada sino hasta el día postnatal 6 (Schoebitz *et al*, 1993). Además de las glicoproteínas tipo FR, el OSC secreta otras proteínas que no son AFRU-positivas y se mantienen solubles en LCR. Una de las proteínas secretadas por el OSC y soluble en LCR ha sido identificada como transtirretina (Montecinos *et al*, 2005), proteína que está involucrada en el transporte de hormonas tiroideas y que es producida también por los plexos coroideos.

De acuerdo a Hoyo-Becerra *et al* (2006), el material soluble en LCR de embriones de pollo e inmunorreactivo con anticuerpos contra las proteínas secretorias del OSC, sería producido además por las células de la placa del piso (PP), al menos durante la etapa embrionaria. Vio *et al* (2008), ha identificado en LCR de ratas Sprague-Dawley al menos ocho compuestos LCR-solubles con peso molecular que va desde los 200 a 25 kDa y que son inmunorreactivos a anticuerpos contra las glicoproteínas del OSC.

Varios autores han presentado evidencias significativas de que proteínas secretadas por el OSC tendrían un rol importante sobre diferentes eventos en el desarrollo del SNC (Monnerie *et al*, 1998; Gobron *et al*, 1999; Creveaux *et al*, 1998; Meiniel *et al*, 2003). Se ha detectado la presencia de material reactivo a anticuerpos dirigidos contra la secreción del OSC, sobre la superficie apical del primordio de los plexos coroideos en embriones de pollo, el cual podría estar participando en la diferenciación de los plexos coroideos. De forma similar, la unión de material secretorio del OSC ha sido encontrado en embriones de pollo de mayor edad (Hoyo-Becerra *et al*, 2005, 2006). Estas evidencias sugieren que compuestos secretados por el OSC al LCR, que permanecen solubles en él podrían estar involucrados en la diferenciación de los plexos coroideos en etapas tempranas del desarrollo embrionario y en etapas más tardías podrían regular la secreción de estos.

Existen evidencias de la participación del complejo OSC-FR en la sobrevivencia, agregación neuronal y desarrollo en extensión de neuritas en cultivos de células neuronales corticales y de cordón espinal. Compuestos presentes en la FR parecen incrementar la sobrevivencia neuronal y modificar el comportamiento de neuronas corticales, modulando las interacciones entre células (Meiniel *et al*, 2001). Estudios *in vitro* han demostrado que OSC-espondina, proteína secretada por el OSC y principal constituyente de la FR, favorece el desarrollo de neuritas y podría participar de este modo en la diferenciación de la médula espinal y en la formación de la comisura posterior durante la ontogénesis del SNC (Gobron *et al*, 2000).

En modelos de animales mutantes, como el ratón *hyh* y la rata H-Tx que desarrollan hidrocefalia congénita, se han observado anomalías del AS y una

reducción en el tamaño del OSC (Blackshear *et al*, 2003; Jones, 1993; Pérez-Fígares *et al*, 2001). Estudios en modelos de ratones mutantes para factores que regulan el desarrollo del OSC, como Pax6, Msx1, Rfx3 y Pac1 se ha observado desarrollo de hidrocefalia con agenesia del OSC (Baas *et al*, 2006; Lang *et al*, 2006; Casto *et al*, 2004; Fernández-Llébrez *et al*, 2004; Estivill-Torrús *et al*, 2001).

Overholzer (1954) fue uno de los primeros investigadores en proponer que una deficiencia en la secreción del OSC podría estar involucrada directamente con la patogénesis de la hidrocefalia, basado principalmente en observaciones histológicas en cerebros de fetos y recién nacidos de ratas con déficit de vitamina B₁₂ o ácido fólico.

Estas evidencias sugieren fuertemente que una alteración del OSC podría llevar al desarrollo de hidrocefalia.

Trabajos realizados por Somera y Jones (2004) establecen una relación entre la alteración del desarrollo del OSC, su secreción de glicoproteínas y el cierre del AS en las ratas H-Tx hidrocefálicas. A partir del día 16 de gestación, las ratas H-Tx hidrocefálicas mantienen una población de células endodiales normales, sin embargo, se ha detectado que estas células reaccionan escasamente a anticuerpos dirigidos contra glicoproteínas del OSC lo cual lleva a pensar que la cantidad de glicoproteínas producidas por estas células disminuye. Esto varía en E17, etapa en la que junto con detectar una menor producción de glicoproteínas, existe una disminución en la población de células endodiales del OSC, observándose también el acercamiento de las paredes del AS, lo que sugiere que el estado del acueducto estaría en directa relación con la presencia de células endodiales del OSC. Así, coincide que la disminución en la producción de glicoproteínas por las células endodiales del OSC

precede a la reducción de éstas, al cierre del AS y a la dilatación de los VL, en este modelo de ratas (Somera y Jones, 2004)

De acuerdo a los antecedentes presentados, y considerando que el OSC es una de las primeras estructuras cerebrales secretorias en diferenciarse, que su material secretorio estaría asociado a la sobrevivencia neuronal (Monnerie *et al*, 1998) y que la alteración de su actividad secretoria está asociada al desarrollo de hidrocefalia (Vío *et al*, 2000), un análisis de las proteínas en LCR nos permitiría establecer diferencias en el perfil proteico del LCR normal versus hidrocefálico y así entender el mecanismo y los factores involucrados en el desarrollo de hidrocefalia y alteración cortical en esta patología.

En este contexto, se plantean dos hipótesis de trabajo:

“El líquido cefalorraquídeo de ratas H-Tx hidrocefálicas presenta cambios en su composición proteica”

“Los cambios en la proteómica del líquido cefalorraquídeo de las ratas H-Tx hidrocefálicas involucran modificaciones en las glicoproteínas solubles secretadas por el órgano subcomisural al LCR”

Para evaluar estas hipótesis, se plantearon los siguientes objetivos generales y específicos:

Objetivos generales

- 1.- Analizar la proteómica del LCR normal e hidrocefálico de ratas H-Tx.
- 2.- Analizar la actividad secretoria del OSC en ratas H-Tx normales e hidrocefálicas.

Objetivos específicos

- 1.- Estudiar la composición del LCR normal e hidrocefálico de ratas H-Tx a diferentes edades (PN1, 7 y 30), mediante electroforesis 2D y tinción con plata.
- 2.- Investigar las proteínas secretorias presentes en el OSC de ratas H-Tx normales e hidrocefálicas a diferentes edades. Mediante inmunocitoquímica e inmunoblot.
- 3.- Analizar las proteínas secretorias del OSC presentes en el LCR de ratas H-Tx normales e hidrocefálicas a diferentes edades (E19-E20 y PN1, 7 y 30). Mediante inmunoblot y electroforesis 2D.
- 4.- Estudiar *in vitro* mediante cultivo de neuroesferas, el efecto del LCR normal y LCR hidrocefálico de ratas H-Tx en la sobrevivencia y diferenciación de las células troncales neurales.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Reactivos químicos

En Sigma Chemical Co. se adquirieron los siguientes reactivos: N-N'-methylene-bisacrilamida, N-N,N',N'-tetrametilendiamina (TEMED), persulfato, dodecil sulfato de sodio (SDS), urea, formalito 2D (anfolitos pH 3-10), 3-[(3-colamidopropil) dimetil amonio]-1-propanosulfonato (CHAPS), Ditiotreitól (DTT), Iodoacetamida, HCl, solución salina balanceada de Earl (ESSB), L-glutamina, heparina, D(+)-glucosa, Hepes, NaHCO₃, EGF, insulina, transferrina, putrescina, progesterona, selenito de sodio, agua grado cultivo, medio de Eagle modificado de Dubelco (DMEM), mezcla de nutrientes F12, penicilina G sódica, estreptomycin, kanamicina, anfotericina B.

En Bio-Rad se adquirieron los siguientes reactivos: Acrilamida, Tris(hidroximetil)-aminoetano, glicina, estándar de peso molecular de proteínas, membrana de nitrocelulosa Trans-blot de 0,2 µm, aceite mineral, agarosa overlay, gradientes de pH inmovilizados (IPG *strips* pH 3-10, 17 cm) ,

En Merck se adquirieron los siguientes productos: NaCl, Na₂HPO₄ x 2H₂O, KH₂PO₄, β-mercaptoetanol, azul de bromofenol, AgNO₃, Na₂CO₃ , y los siguientes productos con grado analítico: acetona, etanol, ácido acético glacial, glutaraldehído, PMSF, formaldehído 37%.

De Winkler Ltda. se adquirieron los siguientes reactivos: metanol, isopropanol, reactivo de Bradford 5x.

De Pierce se adquirieron los siguientes reactivos: *kit* de quimioluminiscencia *Super Signal West Dura Extended Duration Substrate*

En Riedel-de-Haën fueron adquiridos Tween 20 y NH₄HCO₃

En Sigma-Aldrich se adquirieron los siguientes productos: Kodak BioMax MR Film, Glicerol.

3.2 Animales de experimentación

Se utilizaron ratas mutantes *hydrocephalic Texas* (H-Tx), que desarrollan hidrocefalia congénita. Como aún no se ha establecido cual o cuales son los genes involucrados en el desarrollo de hidrocefalia de estas ratas, no se puede hacer un *screening* para clasificarlas como normales o hidrocefálicas, por lo tanto sólo a través de características físicas, como el tamaño del cráneo, o por análisis inmunocitoquímicos posteriores, es posible referirse a ellas como no hidrocefálicas (en adelante normal), en caso de que no presenten características atribuibles a hidrocefalia, o como hidrocefálicas.

Las ratas fueron sacrificadas por una sobredosis de anestésico en el caso de ser utilizados para la extracción de LCR. Los animales que fueron utilizados para la preparación de cultivos corticales o extractos de OSC, fueron sacrificados mediante decapitación. Finalmente todos los residuos biológicos fueron eliminados siguiendo el manual de procedimiento de manejo de residuos de la Universidad Austral de Chile.

Se utilizaron ratas de 1, 7 y 30 días después del nacimiento y en el caso de las muestras provenientes de embriones, estas eran de 19-20 días. La edad de los embriones fue determinada a través de frotis vaginal, realizado a la rata en cruza, estableciendo como día 1 el día en que el frotis era positivo frente a la presencia de espermios.

Las ratas eran mantenidas desde el nacimiento con un ciclo de luz/oscuridad de 12/12, en una habitación con temperatura controlada (18-20°C), con alimento y agua *ad libitum* en el bioterio del Instituto de Histología y Patología, Facultad de Medicina, Universidad Austral de Chile (Valdivia, Chile)

3.3 Extracción LCR

Previo a la extracción de LCR las ratas fueron anestesiadas con Ketamina (Ketostop) y Acepromazina maleato (Pacifor). Luego se instalaron en un estereotáxico de rata de tal forma que el cuerpo quedó en posición vertical y la cabeza inclinada en un ángulo de 90° con respecto al cuerpo. Se realizó una incisión en la región dorsal de la cabeza y se ubicó la cresta occipital, altura a la cual se alineó la cánula de extracción, que consiste en una aguja de 27 gauge conectada por su extremo proximal a una cánula de polietileno unida a su vez, a una jeringa de 3 ml para aspirar. A partir de la cresta occipital se bajó la cánula siguiendo la línea media, para posteriormente atravesar lentamente los planos musculares y la membrana meníngea que cubre la cisterna Magna. Finalmente, se ejerce presión negativa al sistema de extracción para obtener el LCR. Para la obtención de las muestras de LCR de los ventrículos laterales se utilizó el mismo sistema pero la ubicación de la cánula fue cercana a Bregma. Las muestras fueron centrifugadas por 2 minutos a 2.000 x g para sedimentar detritus celulares y fueron almacenadas en tubos eppendorf a -70°C. Las muestras de LCR contaminadas con sangre fueron descartadas.

3.4 Extractos OSC

Los OSC de ratas normales e hidrocefálicas fueron disecados bajo lupa estereoscópica. Los OSC disecados fueron extraídos en una solución de bicarbonato de amonio 50 mM, pH 7,5 y PMSF 0,5 mM y posteriormente sonicado durante 10 seg, por tres veces y finalmente centrifugado a 12.000 x g por 45 min a 4°C. El sobrenadante obtenido en este paso contenía el extracto de proteínas de OSC, el cual se guardó a -70 °C hasta su utilización.

3.5 Cuantificación proteínas

Para determinar la concentración de proteínas de LCR y extractos de OSC se utilizó el método de Bradford (1976), el cual se basa en la afinidad de las proteínas por el colorante azul de Coomassie. Como estándar se utilizó albúmina de suero bovino (BSA).

Para los extractos y muestras de LCR, se midió un volumen de 5 µl al cual se agregaron 95 µl de agua destilada y finalmente 1000 µl de reactivo de Bradford 1x, usando como blanco agua destilada. Se incubó por 15 min y se leyó absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro *UV-1203 UV-VIS Spectrophotometer* (Shimadzu). Todas las muestras fueron medidas en duplicado. En el caso de extractos con alta concentración de proteínas se realizó una dilución previa a la adición del reactivo de Bradford, para que los valores de absorbancia estuviesen dentro de la curva de BSA.

3.6 Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones denaturantes (SDS-PAGE)

El dodecil sulfato de sodio (SDS) es un detergente aniónico cuya función es desnaturalizar proteínas mediante su unión alrededor de la cadena de aminoácidos, confiriéndole una carga negativa proporcional a su longitud. En su presencia la migración de las proteínas está determinada por su peso molecular.

La separación electroforética de proteínas se realizó en geles de poliacrilamida al 8%, en el sistema de electroforesis *Mini Protean III*, siguiendo el procedimiento descrito por Laemmli (1970). Los geles separador y espaciador de 0,75 mm de espesor, se prepararon a partir de una solución de acrilamida:bisacrilamida al 30%. El gel separador se preparó a una concentración final de poliacrilamida del 8% conteniendo Tris-HCl 375 mM pH 8,8, SDS 0,1%, persulfato de amonio 0,05% y TEMED 0,198%. El gel espaciador se preparó a una concentración final de poliacrilamida del 4%, conteniendo Tris-HCl 125 mM pH 6,8, SDS 0,1%, persulfato de amonio 0,05% y TEMED 0,198%. Se sembraron por surco 10 µl de muestra en el caso de LCR y para extractos de OSC se sembró el equivalente a 2 OSC. Las muestras de proteínas fueron mezcladas con tampón de carga 2x (Tris-HCl 133 mM pH 6,8, β-mercaptoetanol 4%, glicerol 20%, azul de bromofenol 0,2%, SDS 4,4%) en relación 1/1 y calentadas a 100°C por 2 min. Posteriormente las muestras fueron cargadas en el gel, realizándose la electroforesis en tampón de corrida 1x (Tris 0,1 M, glicina 0,192 M, SDS 0,1%) a 17mA por un tiempo aproximado de 2,5 h. Se utilizó el marcador de peso molecular de amplio rango para proteínas preteñido *Precision Plus Protein Standards Dual Stain* de Bio-Rad

3.7 Electrotransferencia

Una vez concluida la separación electroforética, las muestras de proteínas fueron electrotransferidas a una membrana de nitrocelulosa de tamaño de poro de 2 μ m, y equilibrada en tampón de transferencia 1x (Tris 0,121 M, glicina 0,24 M, SDS 0,1%, metanol 20%). La electrotransferencia se realizó en el sistema *Mini Trans Blot*, para lo cual, sobre una esponja embebida en tampón de transferencia 1x se depositaron secuencialmente: un trozo de papel filtro Whatman N° 1, el gel a transferir, la membrana de nitrocelulosa y luego otro papel filtro, todo lo cual fue cubierto con otra esponja embebida en la misma solución. El “sandwich” se colocó en la cámara de electrotransferencia conteniendo tampón de transferencia. Las condiciones de transferencia fueron 6 h a 150 mA o bien 15 h a 60 mA. Transcurrido este tiempo, la membrana se sumergió en PBS para el análisis inmunoquímico posterior.

3.8 Inmunodetección

Para el análisis inmunoquímico las membranas se saturaron con solución de bloqueo (PBS 1x, leche descremada 5%, Tween 20 0,05%) por 1 h. Luego se incubó con primer anticuerpo en sus respectivas diluciones (AFRU 1:1000, anti-p15 1:800; anti-TTR 1:3000) por 2 h. Finalizado este tiempo se lavó durante 30 min con PBS-leche-Tween y 30 min con PBS-leche. Posteriormente se incubó con segundo anticuerpo (anti-IgG conejo 1:50000-1:65000) por 30 min. Una vez finalizada esta etapa, se lavó con PBS 5 min por tres veces. En este momento se utilizó el kit comercial *Super Signal West Dura Extended Duration Substrate*, en el cual se mezclaron partes iguales de los dos reactivos (Luminol: *Enhancer*) y se vertieron sobre la membrana, dejándolo actuar

por 10 min a temperatura ambiente. Luego de este tiempo se descartó el exceso de solución y la membrana fue expuesta a película Kodak Biomax MR, la cual registró la emisión del Luminol. La reacción se detuvo retirando la película de la membrana y enseguida se reveló con reactivo D-72 y se fijó con reactivo U-3 (Kodak). Esta parte final del procedimiento se realizó en condiciones de oscuridad (cuarto de revelado fotográfico).

Dos anticuerpos dirigidos contra las glicoproteínas constitutivas de la FR fueron utilizados. El primero, AFRU, fue obtenido de acuerdo al protocolo de Rodríguez *et al* (1984). Este anticuerpo es generado a partir de extractos de FR del canal central de médula espinal de bovino. El segundo anticuerpo, denominado anti p15, es un anticuerpo dirigido contra una secuencia de 15 aminoácidos de la proteína OSC-espondina, principal constituyente de la FR.

3.9 Electroforesis bidimensional (2D-PAGE)

Una herramienta útil en proteómica para el análisis de muestras complejas es la electroforesis bidimensional (2D), descrita por primera vez en el año 1974 por O'Farrel. Esta técnica básicamente consiste en separar proteínas en una primera dimensión, a través de su punto isoeléctrico (pI, carga eléctrica de la proteína) y luego, en una segunda dimensión, a través del tamaño de éstas (peso molecular). A través de la electroforesis 2D es posible identificar nuevos componentes celulares o alteraciones en su expresión, utilizando comparaciones cualitativas y cuantitativas. El análisis permite la resolución de aproximadamente 750 *spots*.

3.9.1 Preparación de la muestra

Se tomó un volumen de LCR correspondiente a 100 µg de proteínas totales las que fueron precipitadas con acetona pura (grado análisis). Se mezclaron un volumen de muestra por tres volúmenes de acetona. Las muestras fueron precipitadas por toda la noche a 4°C. Luego de este período, las muestras fueron centrifugadas a 12000 x g por 10 min a 4°C, descartándose el sobrenadante y lavando el pellet dos veces con 1 ml de acetona fría, centrifugando a 12000 x g por 5 min a 4°C después de cada lavado. Antes de resuspender el pellet se retiró la acetona remanente del tubo que contenía la muestra. A este pellet se le agregaron 10 µl de una solución SDS 10%-DTT 2% y se calentaron por 5 min a baño María a 95°C. Una vez fría la muestra, se agregaron 600 µl de buffer de rehidratación (Urea 8M, CHAPS 2%, IPG buffer 0,5% y azul de bromofenol 0,002%). Se dejó entre 30 min y 1 h a temperatura ambiente, para asegurar una completa resuspensión.

3.9.2 Primera dimensión

La muestra resuspendida fue directamente cargada sobre el gel de isoelectroenfoque con gradiente de pH inmovilizado (IPG *strip*) de 17 cm de longitud y gradiente amplio de pH 3-10 y migrada en la cámara de isoelectroenfoque (IEF *focusing tray*) del sistema PROTEAN IEF CELL (Bio-Rad). En cada carril se agregaron 3 ml de aceite mineral para cubrir los *strips* y así evitar la evaporación de la muestra durante el IEF. Una vez terminado el IEF los *strips* fueron guardados a -80°C.

El protocolo de separación por isoelectroenfoque fue determinado según parámetros e instrucciones indicadas en el manual del fabricante (Bio-Rad, USA). El

diseño del programa empleado tomó en consideración el número, tamaño y gradiente de pH de los IPG *strips* empleados. Los tiempos y los voltajes aplicados en los pasos de hidratación, precorrida y corrida de isoelectroenfoque fueron programados según se describe a continuación:

| | | |
|-----------------|----------------------------------|--------|
| - rehidratación | 50V | 14 hrs |
| - precorrida | 500V | 30 min |
| | 1000V | 1 hr |
| | 4000V | 1 hr |
| - corrida | 8000V hasta completar 64000 V/hr | |

La separación electroforética se realizó a 20°C , con pendiente de la diferencia de potencial (ΔV) en modo rápido y con intensidad de corriente límite de 50 $\mu A/gel$.

3.9.3 Segunda dimensión

Antes de comenzar la corrida electroforética en segunda dimensión, fue necesario equilibrar los IPG *strips*. El primer paso de equilibrio consistió en reducir los grupos sulfhidrilos de las proteínas. Para esto el gel se incubó con 3 ml de tampón de equilibrio I (Urea 6M, Tris-HCl pH 8,8 75 mM, glicerol 30%, SDS 2%, azul de bromofenol 0,002% y DTT 0,2%) por 10 min a temperatura ambiente y agitación constante. Luego, se realizó un segundo paso de equilibrio, necesario para alquilar los grupos sulfhidrilos reducidos, sumergiendo los *strip* en tampón de equilibrio II (Urea 6M, Tris-HCl pH 8,8 75 mM, glicerol 30%, SDS 2%, azul de bromofenol 0,002% y Iodoacetamida 2,5%). En un último paso, los *strips* fueron lavados con tampón de

corrida por 10 min. Luego los strips se depositaron sobre los geles SDS-PAGE en un gradiente de 4-20% para la segunda dimensión. Para evitar el desplazamiento de los IPG strips durante la corrida y para tener un gel continuo, sobre el gel espaciador se agregó agarosa overlay (agarosa 0,5%, Tris 25 mM, glicina 192 mM, SDS 0,1%, azul de bromofenol 0,002%), en la cual se sumergió el strip. Además se cargaron 10µl de estándar de peso molecular para proteínas. El fraccionamiento se llevó a cabo utilizando el sistema PROTEAN[®] II Cell (Bio-Rad, USA) que permite correr simultáneamente hasta dos geles. En primer lugar se realizó una pre-corrida electrofóretica de 1h a 60mA para luego continuar con una corrida de aproximadamente 12 h a 10 mA. Una vez terminada la corrida electroforética, los geles fueron electrotransferidos o bien, fueron teñidos a través de tinción con plata.

3.9.4 Electrotransferencia 2D-PAGE

La electrotransferencia de los geles 2D-PAGE consideró las mismas características que las ocupadas para los geles en una dimensión, variando la cámara de transferencia por el sistema Trans blot Cell (Bio-Rad, USA). Las condiciones de transferencia fueron 15 h a 60 mA. Al final de este tiempo, la membrana se sumergió en PBS para el análisis inmunológico posterior.

3.10 Tinción con plata

Una vez terminada la corrida electroforética, los geles fueron fijados y teñidos de acuerdo al siguiente protocolo:

- fijación del gel en una solución que contenía etanol 50% (V/V) y ácido acético 10% (V/V) por 30 min
- fijación del gel en una solución que contenía etanol 5% (V/V) y ácido acético 7% (V/V) por 30 min
- fijación (*cross linked*) con glutaraldehído 10% (V/V) por 30 min
- lavado del gel con agua destilada 4 veces, 15 min cada una
- se incubó con una solución de DTT 5mg/L por 30 min
- en oscuridad, el gel se incubó con solución de AgNO_3 0,1% por 30 min
- la tinción se reveló incubando con solución de Na_2CO_3 3% y formaldehído 37% por 5 min aproximadamente o hasta la aparición de los *spots* y se detuvo la reacción con una solución de ácido acético 10%.

Los geles fueron lavados y guardados con agua destilada.

3.11 Medios para los cultivos de células troncales

3.11.1 Soluciones madre

Para los cultivos de células troncales se prepararon las siguientes soluciones madres: glucosa 30%, bicarbonato de sodio 7,5%, tampón Heppes 1M, heparina 0,2%, medio Dubelcco modificado (DMEM) y mezcla de nutrientes F-12 1:1 (DMEM/F12) 10x, solución de antibióticos/antimicóticos 10x (penicilina G sódica 5 mg/ml, estreptomicina 2,5 mg/ml, kanamicina 1,25 mg/ml y 250 μl de una solución madre de anfotericina de 1

mg/ml), L-glutamina 200 mM. Todas estas soluciones se prepararon en agua destilada grado cultivo de tejidos (Sigma), se esterilizaron mediante filtración (0,2 µm) y se guardaron a 4°C, excepto glutamina que se guardó a temperatura ambiente. También se prepararon soluciones de selenito de sodio 3 mM, progesterona 2 mM y factor de crecimiento epidérmico (EGF) 500 µg/ml en DMEM/F12. Todas estas soluciones se alicuotaron y se almacenaron a -20°C. Se preparó una mezcla de hormonas 10x (DMEM/F12 1x, glucosa 0,6%, NaHCO₃ 0,112%, Hepes 5mM, apotransferrina 1 mg/ml, 25 mg de insulina disuelto en 1ml de 0,1 N de HCl más 9 ml de agua, putrescina 0,0965 mg/ml, progesterona 0,02 mM y selenito 0,03mM). Las alicuotas se almacenaron a -20°C.

3.11.2 Medio control

Medio DMEM/F12 1x, glucosa 0,6%, NaHCO₃ 0,112%, Hepes 5 mM, L-glutamina 2 mM, mezcla de hormonas 1x, heparina 0,0004% y solución de antibióticos/antimicóticos 1x.

3.11.3 Medio de crecimiento

Medio control más 20 ng/ml EGF.

3.11.4 Medio de diferenciación

Medio control suplementado con 5% de suero de bovino fetal (SBF).

3.12 Cultivo de células troncales nerviosas

Para el cultivo de neuroesferas, en cada sesión de cultivo se decapitaron 4 ratas H-Tx en PN7. Se lavaron las cabezas con etanol 70° y se extrajo el cerebro. De este se obtuvo una rebanada realizando dos cortes: uno en el quiasma óptico y otro aproximadamente 1 mm por delante de él. Posteriormente se disecaron las paredes latero-externas de ambos VL (zona subventricular, ZSB). Entre cada paso se realizaron lavados con EBBS. Los trozos de tejido se transfirieron luego a un tubo Falcon con 10 ml de medio control y se procedió a disociar el tejido de manera mecánica con la ayuda de una pipeta Pasteur enangostada a la llama. La disociación del tejido se realizó aspirando el tejido con la pipeta (previamente cebada con el medio) y luego lanzándolo con fuerza contra las paredes del tubo, hasta que la suspensión queda turbia sin ningún trozo de tejido visible. La suspensión celular resultante se centrifugó a 110 x g durante 10 min. Se removió el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 2 ml de medio control y se disgregó el pellet 50 veces con una micropipeta p1000 ajustada a 500 µl. Luego se agregaron 8 ml de medio control y se centrifugó por 150 x g durante 15 min. El pellet se resuspendió nuevamente en 2 ml de medio control y se disoció aproximadamente 25 veces con una micropipeta p100 ajustada a 500 µl. Se realizó el conteo de células viables por el método de exclusión de azul tripano en un hemocitómetro. En el caso de que la disgregación del tejido no fuese óptima se repitió el último procedimiento de disgregación 1-2 veces. Las células se sembraron a una densidad de 20 células viables/µl en placas de cultivo de 24 pocillos (1500 µl por pocillo, 30.000 células/pocillo). El factor de crecimiento se agregó de manera adicional cada 2 días (utilizando una solución madre de EGF de 20 ng/ml 100x).

La diferenciación de las neuroesferas se realizó usando polilisina como sustrato. El procedimiento consistió en tratar los cubreobjetos (250 x 250 mm) con polilisina (1 mg/ml) durante toda la noche en la estufa de cultivo. Luego se dejaron secar bajo la cámara de flujo laminar y previo a su uso, se lavaron con medio control. Se recolectaron las neuroesferas (de 4 días *in vitro*, DIV) mediante centrifugación a 25 x g durante 5 min. Luego se resuspendieron suavemente en medio de diferenciación (medio control más 5% de SFB y sin EGF) y posteriormente se depositaron cuidadosamente en cubreobjetos recubiertos con polilisina sobre placas de cultivo. Las neuroesferas se recolectaron a los 4 días de cultivo (DIV) y fueron tratadas con 10% de LCR normal e hidrocefálico provenientes de ratas en PN7, durante dos días. La evolución del cultivo fue fotografiada. Finalmente los cultivos fueron fijados y procesados para inmunocitoquímica.

3.13 Inmunocitoquímica

Los animales experimentales en el día del sacrificio fueron fijados con Bouin, incluidos en Paraplast y se obtuvieron cortes de 8 µm de espesor. Los cortes se inmunotñeron mediante el método peroxidada-antiperoxidasa de acuerdo a lo descrito por Sternberger *et al* (1970).

Luego de desparafinar los cortes, se inactivaron las peroxidasas endógenas incubando 10 min con solución 1:1 metanol: agua oxigenada a temperatura ambiente. Se lavó 3 veces con Tris-HCl (Tris-HCl 0,01M pH 7,8, Na₂HPO₄ 8,3 mM, KH₂PO₄ 3,5 mM y NaCl 0,12 M) por 5 min cada vez. Como anticuerpo primario se utilizó AFRU (anticuerpo anti-FR). Se incubaron durante 18 horas con AFRU (Rodríguez *et al*, 1984)

en una dilución 1:1000. Como segundo anticuerpo se utilizó anti-IgG de conejo (producido en oveja; dilución 1:15, 30min). Posteriormente se incubó con complejo peroxidasa-antiperoxidas (PAP) de conejo diluido 1:75 por 30 min. Después de cada incubación los cortes fueron lavados con Tris-HCl (3 veces por 5 min). La peroxidada se visualizó incubando los cortes en oscuridad durante 15 min en tampón Tris-HCl conteniendo 3,3'-diaminobenzidina 0,2% (p/v) y peróxido de hidrógeno 0,007% (p/v). Después de esta incubación los cortes se lavaron en agua destilada, se deshidrataron y montaron. El control de la inmunotinción se realizó omitiendo la incubación con el primer anticuerpo. Todas las incubaciones fueron a temperatura ambiente.

Las NE, previo a aplicar la técnica de inmunocitoquímica, fueron permeabilizadas con metanol frío (-20°C) por 20 min, luego se procedió a tratar los cortes como se describió en el párrafo anterior, cambiando el anticuerpo primario por anti- β III-tubulina (marcador neuronal). La cuantificación de las neuritas generadas en los cultivos de NE, fueron realizadas mediante el procedimiento descrito por Rønn (2000).

3.14 Adquisición de imágenes

Las placas fotográficas de los inmunoblot fueron digitalizadas a través del escáner Epson *Perfection* 3490.

Las imágenes en 2D-PAGE de los geles teñidos con plata fueron obtenidos a través de la cámara digital *Sony Cyber-shot* DSC-R1.

Los cortes inmunoteñidos fueron fotografiados utilizando un sistema digital de captación de imagen usando el *software AxioVision 4* conectado a una cámara digital (Zeiss).

3.15 Análisis geles unidimensionales

El análisis de los inmunoblot de geles unidimensionales fueron realizado con el programa UN SCAN IT gel. Se calculó siempre la razón entre muestras hidrocefálica vs. normal, asumiendo como 100% el valor normal.

$$\frac{\text{Píxeles LCR hidrocefálico}}{\text{Píxeles LCR normal}} \times 100 = \% \text{ Variación LCR normal versus hidrocefálico}$$

ANOVA y Newman-Keuls como análisis post-hoc, fueron utilizados para los análisis estadísticos, con el programa computacional *GraphPadPrism* (versión 5.01; *GraphPad Software Inc.*, San Diego 43 CA, USA). Los resultados fueron considerados significativos cuando los valores p fueron < 0,05.

3.16 Análisis geles 2D-PAGE

Los geles 2D-PAGE, fueron analizados a través de plantillas cuadrículadas, que proporcionaron una primera aproximación para reconocer puntos de referencia para un análisis posterior en un grado más de detalle. Primero se compararon los resultados de los tres geles de la misma edad y condición. Por ser PN1 la edad donde el proteoma de LCR presentaba mayor complejidad, fue escogido como punto de partida para los siguientes análisis (LCR normal). De esta forma, si en las otras edades o condición mostraban de manera consistente la presencia de *spots* extra, estos eran agregados al proteoma establecido en PN1. Así se generó un mapa proteómico con tan sólo 40 *spots*

caracterizados, a partir de los cuales se estudiaron los cambios más evidentes que ocurrían en el patrón de expresión entre edades y condición. Luego, en el caso de aquellos *spot* con diferencia en intensidad, fueron analizados de la misma forma descrita para geles unidimensionales, detallándose en el siguiente párrafo cómo fueron realizadas las mediciones.

3.17 Estandarización para cuantificar *spots* a través del programa UN-SCAN-IT gel

Al no tener acceso a un software apropiado para el análisis cuantitativo de los *spots* que mostraron variaciones en intensidad, fue necesario recurrir al programa UN-SCAN-IT gel, el cual entrega información acerca de intensidad a través de los pixeles de cada banda. Debido a que en la segunda dimensión es posible correr hasta dos geles de forma paralela, estos son teñidos con las mismas soluciones y mantenidos por la misma cantidad de tiempo en cada una. Un paso crítico en esto es el tiempo de revelado, intentándose siempre manejar el mismo tiempo para ambas muestras. Pese a estos cuidados, siempre existe la posibilidad de que la tinción no sea pareja, por lo que es necesario buscar un control interno que permita normalizar los valores encontrados para los *spot* que presentan diferencias en intensidad y que estos no sean atribuidos a diferencias en la tinción.

Para encontrar un *spot* que nos sirviera de control de tinción fue necesario hacer que este cumpliera tres requisitos que son: i) estar presente en las tres edades analizadas y en ambas condiciones, ii) ser persistente su presencia en todos los geles y iii) no variar en intensidad, este último requisito fue establecido a través de un examen visual de los geles.

El *spot* 35 cumplió con todos estos requisitos, por lo que fue elegido como control de tinción. Como este corresponde a un grupo de *spot*, se eligió el segundo, de derecha hacia izquierda (como se indica en la **Anexo 1**), para las mediciones.

En cada medición se calculó el porcentaje de diferencia en intensidad entre el *spot* 35 de muestras normal e hidrocefálica (corridas en paralelo) el que fue restado a las mediciones de los *spots* de interés. A continuación se muestra la fórmula utilizada, donde X indica el *spot* que nos interesa medir.

$$\left(1 - \frac{\text{Píxeles LCR hidrocefálico } \textit{spot} 37}{\text{Píxeles LCR normal } \textit{spot} 37} \right) \times 100 = \% \text{ Variación 1}$$

$$\frac{\text{Píxeles LCR hidrocefálico } \textit{spot} X}{\text{Píxeles LCR hidrocefálico } \textit{spot} 37} \times 100 = \% \text{ Variación 2}$$

% Variación 2 - % Variación 1 = Expresión relativa del *spot* X (en %)

En el caso de las muestras normales, el %Variación 1 fue sumado al %Variación 2, para tener ambos valores corregidos de igual forma.

4. RESULTADOS

4.1 Análisis del órgano subcomisural

Para evaluar el estado del OSC, se realizaron inmunocitoquímica en cortes de cerebro, utilizando AFRU, para teñir las células del OSC. Además, utilizando el mismo antisuero, se realizaron ensayos de inmunoblot en extractos de OSC.

4.1.1 Inmunocitoquímica del OSC

Se realizaron ensayos de inmunocitoquímica en cortes sagitales de cerebro de rata H-Tx normal, en PN1, 7 y 30. Se observó un AS abierto a nivel rostral, las células AFRU-positivas del OSC se mostraron fuertemente teñidas (**Figura 3 y 4A**). En PN30 a diferencia de PN1, se pudo apreciar claramente la presencia de una FR, que se origina desde el OSC y pasa a través del AS (inserto **Figura 4A**). Resultados de inmunocitoquímica del OSC para cortes de cerebro en rata H-Tx normal en PN7 fueron omitidos por presentar gran similitud con PN1. Sin embargo, en el análisis de los cerebros de ratas H-Tx hidrocefálicas de esta edad, se observó que el AS aparece obliterado (**Figura 3 y 4D**). En estos animales además, se observó pérdida de células inmunorreactivas en la zona caudal del OSC, sólo se observó reactividad al AFRU en la región más rostral del OSC (**Figura 3 y 4**). Estas características fueron consistentes en las tres edades analizadas. En las ratas hidrocefálicas (de las tres edades estudiadas), no se observó la formación de FR, solo en PN30 se observó reactividad al AFRU en un cúmulo de material agregado en la región apical de las células endimarias, sin formación de FR (**Figura 4C, inserto**). Estos agregados de material

AFRU positivos también fueron observados en otras regiones del tercer ventrículo, rostrales al OSC.

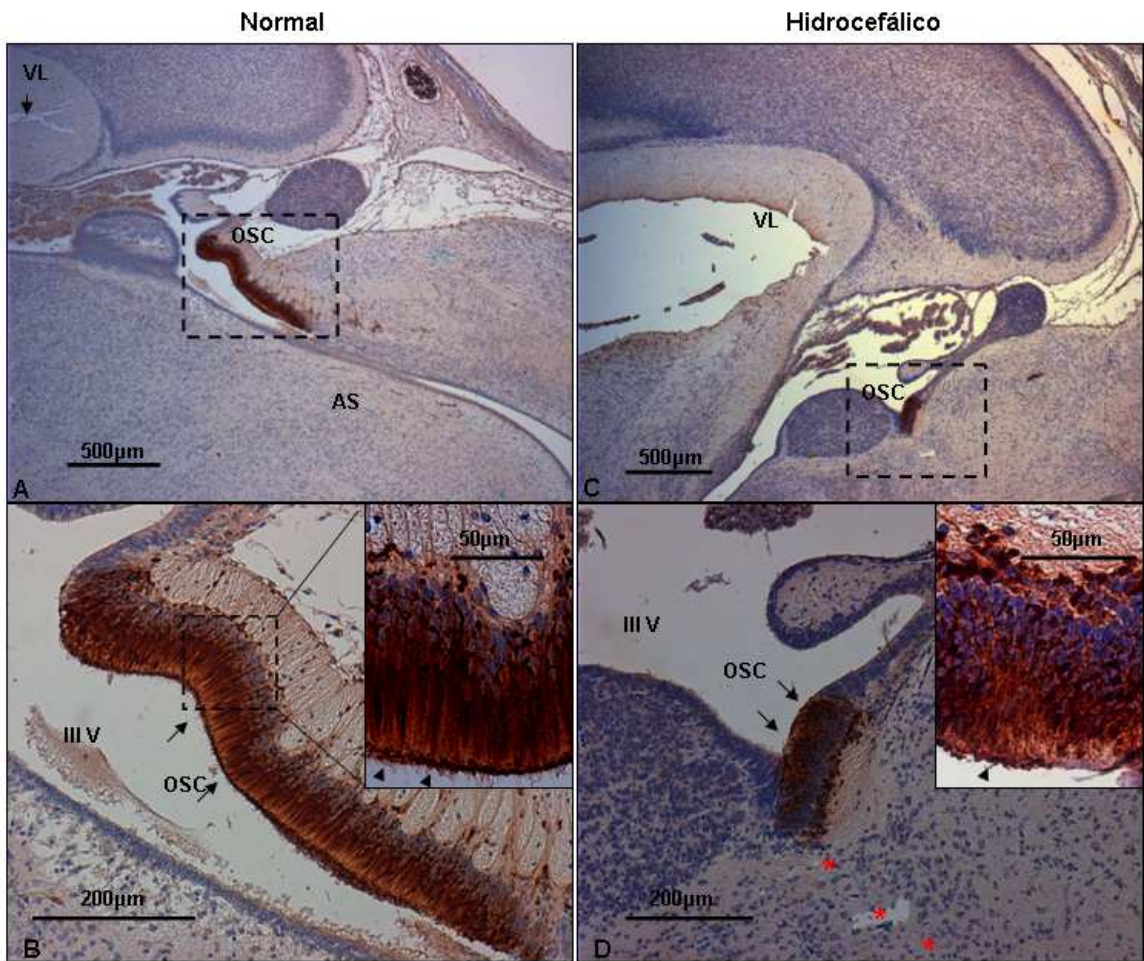


Figura 3. Inmunocitoquímica de cerebro de rata H-Tx en PN1 con AFRU. A-B: Sección sagital del cerebro de una rata H-Tx normal. A: Se observa un OSC fuertemente inmunorreactivo al AFRU y un acueducto de Silvio (AS) abierto (flechas). B: magnificación de A, indicándose con flechas negras las células del OSC inmunorreactivas. El inserto de B muestra con mayor detalle las células inmunorreactivas del OSC y la presencia de gránulos secretorios apicales (cabeza de flechas). C-D: Sección sagital del cerebro de una rata H-Tx hidrocefálica. C: Muestra la presencia de un OSC anómalo, observándose sólo la región más rostral del órgano. Además se aprecia la gran dilatación del ventrículo lateral (VL). D: Magnificación de C, indicándose con flechas negras la pequeña porción del OSC que permanece inmunorreactiva. Con asteriscos se destaca el AS obliterado. El inserto en D muestra las células del OSC con una menor inmunorreacción al AFRU. OSC: órgano subcomisural; III V: tercer ventrículo.

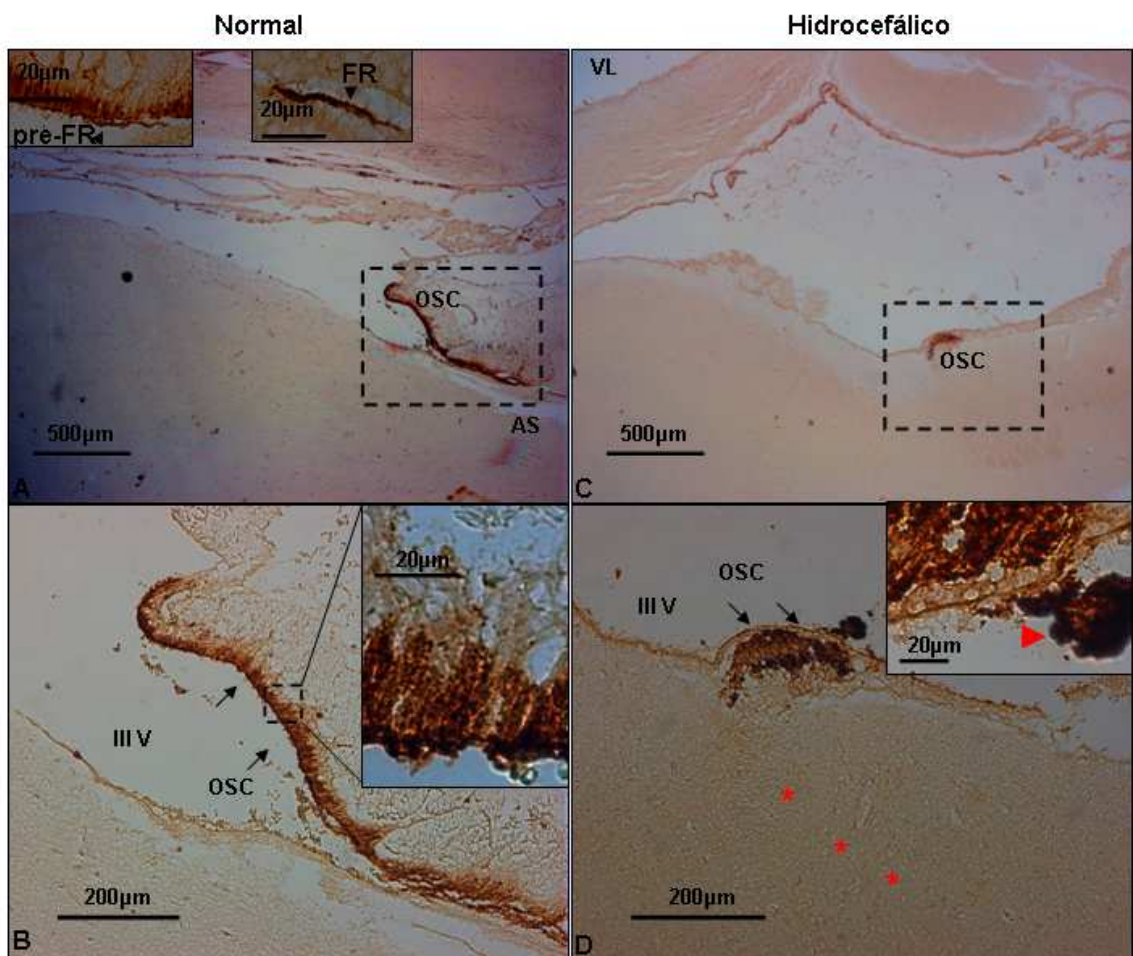


Figura 4. Inmunocitoquímica de cerebro de rata H-Tx en PN30 con AFRU. A-B: Sección sagital del cerebro de una rata H-Tx normal. A: Se observa un OSC inmunorreactivo y un acueducto de Silvio (AS) abierto. i) inserto en A que muestra la presencia de pre-FR en la región apical del OSC (cabeza de flecha). ii) inserto en A que muestra una FR inmunorreactiva (cabeza de flecha). B: magnificación de A, mostrando el OSC y las células inmunorreactivas con la presencia de gránulos secretorios en su región apical (flechas). C-D: Sección sagital del cerebro de una rata H-Tx hidrocefálica. C: muestra un reducido OSC pero inmunorreactivo al AFRU. D: magnificación de C, que muestra con flechas negras la pequeña porción del OSC que permanece inmunorreactiva. Con asteriscos se destaca la estenosis del AS. El inserto en C muestra una masa de material inmunorreactiva con AFRU en la región apical del OSC que no constituye una pre-FR. OSC: órgano subcomisural; VL: ventrículo lateral; III V: tercer ventrículo; AS: acueducto de Silvio.

4.1.2 Inmunoblot de extractos de OSC

Extractos de OSC de PN7 y PN30 normal e hidrocefálico fueron procesados para inmunoblot, utilizando AFRU como primer anticuerpo. En estos extractos se observaron varios compuestos reactivos al antisuero, de 520, 450, 390, 320, 210, 200 y 60 kDa. Al analizar la condición normal e hidrocefálica, se pudo apreciar que los compuestos entre 520 y 320 kDa mostraron variación significativa entre estas dos condiciones (**Figura 5**). El polipéptido de 520 kDa sólo apareció reactivo en extractos de OSC de ratas H-Tx PN7 normal, mientras que la reactividad al AFRU del compuesto de 450 kDa se observó altamente disminuida en los extractos de OSC provenientes de animales hidrocefálico, la inmunorreactividad de este compuesto (450 kDa), también se vio disminuida en los extractos de OSC obtenidos de ratas H-Tx normales e hidrocefálicas en PN30, observándose que en los animales hidrocefálicos de esta edad la reactividad del polipéptido de 450 kDa fue prácticamente nula. Al comparar la intensidad de reacción al anticuerpo de los compuestos de 390 y 320 kDa se vio que estos aparecen menos reactivos que el compuesto de 450 kDa en los extractos obtenidos de animales normales y además se observó que en ambos polipéptidos la reactividad al AFRU disminuye notablemente en los extractos de OSC provenientes de animales hidrocefálicos, lo cual fue más evidente en los animales de PN30, donde se vio reactividad de estos compuestos. (**Figura 5**).

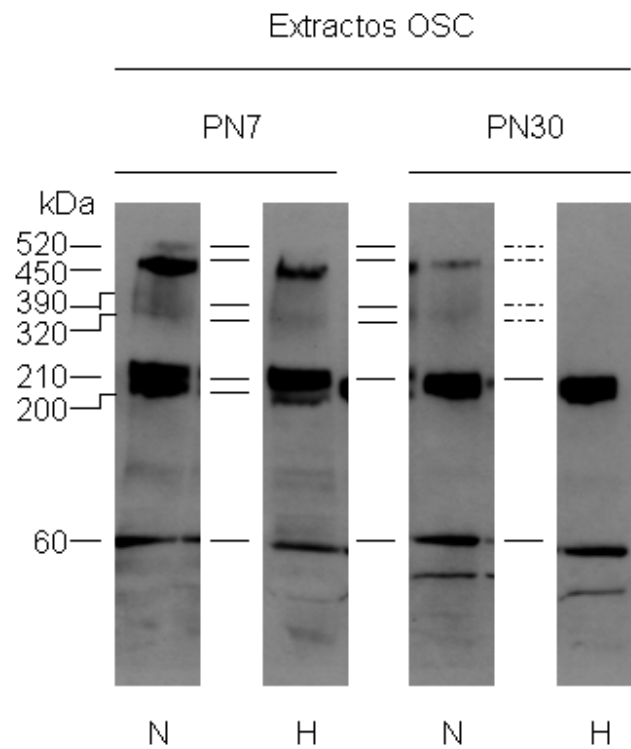


Figura 5. Inmunoblot de extractos de OSC. Extractos de OSC de PN7 y PN30 que muestran los polipéptidos inmunorreactivos con AFRU. En el costado izquierdo de la figura se indican los tamaños relativos para cada banda. Se indican con líneas punteadas los polipéptidos que se han perdido y con una línea continua los que permanecen entre las muestras. N: normal; H: hidrocefálico; PN: día postnatal.

4.2 Variación de la concentración de proteínas en LCR

La concentración de proteínas totales en LCR cisternal de rata H-Tx normales varió dependiendo de la edad analizada, siendo mayor en etapas embrionarias y declinando hacia PN30. En la **Figura 6** se muestra gráficamente la variación que existe entre las edades.

En cuanto a la concentración de proteínas en LCR de ratas hidrocefálicas, este no varió significativamente respecto al normal en el caso de las muestras de LCR de CM. Sin embargo, las muestras de LCR de VL mostraron una disminución respecto al LCR normal obtenido de CM, excepto en PN30 donde la concentración de proteínas fue muy parecidas a la observada en el LCR cisternal de ratas normales de la misma edad (datos no mostrados).

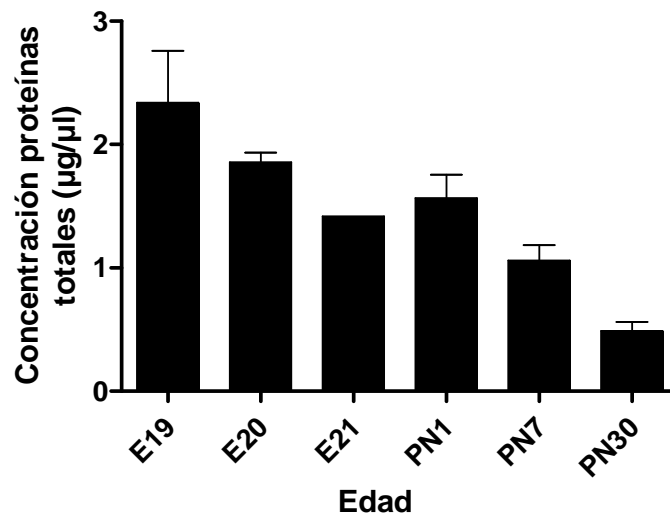


Figura 6. Concentración de proteínas totales en LCR. Proteínas totales en LCR cisternal de ratas H-Tx normales. El análisis estadístico consideró $n=4$ para cada edad. Promedios \pm SEM. E: día embriones, PN: día postnatal.

4.3 Análisis inmunoquímico de la secreción del OSC LCR-soluble

Para analizar compuestos secretados por el OSC al LCR, se realizaron ensayos de inmunoblot, en muestras de LCR de animales normales e hidrocefálico, utilizando como primer anticuerpo: (1) AFRU, (2) Anti-P15, (para información de estos anticuerpos ir a Material y Métodos)

4.3.1 AFRU

Al analizar el LCR proveniente de ratas H-Tx normales e hidrocefálicas, se observó la presencia de 8 compuestos AFRU-reactivos solubles en el LCR. Estos compuestos, presentaron variaciones relativas a su peso molecular y reactividad al antisuero entre los distintos LCRs estudiados. En muestras de LCR obtenido de animales normales en etapas embrionarias, se observó reactividad al AFRU en compuestos de 390, 320, 200, 180, 145, 120, 60 y 50 kDa (**Figura 7A**). Al realizar un estudio comparativo entre LCR proveniente de embriones normales e hidrocefálico, se vio que el LCR proveniente de la CM de embriones en E20 hidrocefálico mostró un patrón de reacción al antisuero distinta a la observada en el LCR del animal normal, observándose la presencia de un compuesto AFRU-positivo adicional de 430 kDa y una mayor reactividad al anticuerpo en el compuesto de 200 kDa (**Figura 7B y C**). Cabe destacar que el compuestos de alto peso molecular fue reactivo al AFRU en la mayoría de las muestras de LCR de animales hidrocefálicos. El patrón de glicoproteínas inmunorreactivas al antisuero del LCR de los VL de embriones hidrocefálicos (E20), se observó muy diferente al del LCR obtenido de CM del mismo embrión, esto también fue evidente en LCR de CM obtenido de embriones normales (**Figura 7A**). En el LCR de

VL del embrión de rata H-Tx hidrocefálico se observaron menos compuestos inmunorreactivos al AFRU (320, 60 y 50 kDa) (**Figura 7A**), en algunas muestras analizadas se pudieron ver sin embargo, algunos compuestos inmunorreactivos adicionales (no se muestra). Al comparar la reactividad al AFRU del compuesto de 200 kDa entre LCR de VL de animales hidrocefálicos y LCR obtenido de CM (de animales normales e hidrocefálicos), se vio que este polipéptido presentó menor reacción en las muestras provenientes de VL (**Figura 7A y C**).

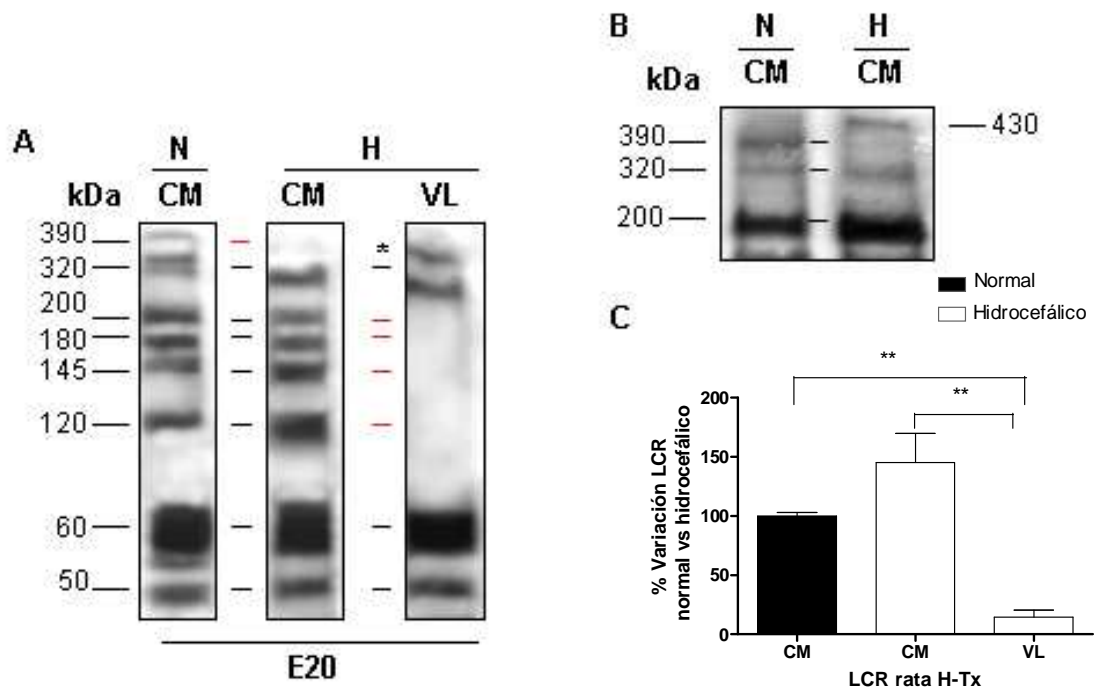


Figura 7. Análisis por inmunoblot de LCR de fetos al E20 utilizando AFRU. **A:** CM (N): LCR cisternal (CM) de un feto normal (N). En esta se detectan ocho polipéptidos de 390 a 50 kDa (líneas). CM y VL (H): LCR cisternal (CM) y ventricular (VL) respectivamente de un mismo embrión hidrocefálico (H). El LCR de CM presenta siete polipéptidos. En el LCR VL se observa solo los compuestos de 320, 60 y 50 kDa. Las líneas rojas indican la pérdida de algunos compuestos. **B:** Detalle de un Inmunoblot donde se observa de forma más precisa el aumento de la intensidad de inmunorreacción del compuesto de 200 kDa en LCR de CM de una rata hidrocefálica. Se destaca la presencia de un compuesto adicional de 430 kDa en LCR hidrocefálico. **C:** Análisis densitométrico del péptido de 200 kDa. Promedios \pm SEM y ** $p < 0,01$. E20: día embrionario 20; N: normal; H: hidrocefálico; LCR: líquido cefalorraquídeo.

Cuando se analizó LCR obtenido de animales normales en etapas postnatales, se observaron los mismos 8 compuestos AFRU-positivos identificados en LCR embrionario. En algunas de las muestras analizadas además apareció una banda inmunorreactiva de 164 kDa (**Figura 8**). En el LCR obtenido de cisterna magna (CM) de animales normales en etapas postnatales se observaron diferencias en el patrón de bandas inmunorreactivas con AFRU entre las tres edades estudiadas (PN 1, 7 y 30). Esta diferencia podría estar correlacionada con el cambio en la concentración de proteínas totales que ocurre en el LCR a medida que aumenta la edad, es así como en PN 1 y 7 aparecen reactivos al AFRU una mayor cantidad de compuestos, sin embargo en el LCR obtenido en animales de PN 30, solo los compuestos de 200 y 60 kDa pudieron ser visualizados con el antisuero (**Figura 8**, comparar **A**, **B** y **C**).

Al analizar LCR proveniente de CM de ratas hidrocefálicas, en edades postnatales se observó que el patrón de bandas reactivas al AFRU en el LCR de PN1 y PN7 es diferente al visto en el LCR de CM de ratas normales de las mismas edades (**Figuras 8A** y **B**). En el LCR de CM de animales hidrocefálicos aparece fuertemente reactivo el compuesto de 200 kDa. Al analizar LCRs en forma individual, se pudo observar que la reactividad y cantidad de este compuesto aumenta en forma directa con el grado de severidad de la hidrocefalia (**Figura 9** y **10**). Al analizar por densitometría la reactividad de este compuesto en LCR de ratas en PN7, se pudo establecer la existencia de una diferencia significativa entre las muestras de LCR normal e hidrocefálico (**Figura 10**).

Cuando se estudió LCR proveniente de ratas normales e hidrocefálicas en PN7, obtenido del VL y CM, se observó que en el LCR hidrocefálico y a medida que la

hidrocefalia fue más severa aparecen reactivos los compuestos de 180 y 164 kDa, (**Figura 10**). También fue posible observar un cambio en el patrón de compuestos reactivos al AFRU en LCR obtenido de ratas en PN30 (**Figura 8C**). En PN30 sólo los compuestos de 200 y 60 kDa fueron AFRU positivos en las muestras de LCR provenientes de CM de animales normales e hidrocefálicos. En algunas muestras se visualizaron reactivos compuestos de 120 y 50 kDa, tanto en LCR normal como hidrocefálico. Compuestos de 164 y 120 kDa aparecen reactivos en LCR obtenido de VL en LCR de animales con un grado de hidrocefalia severa.

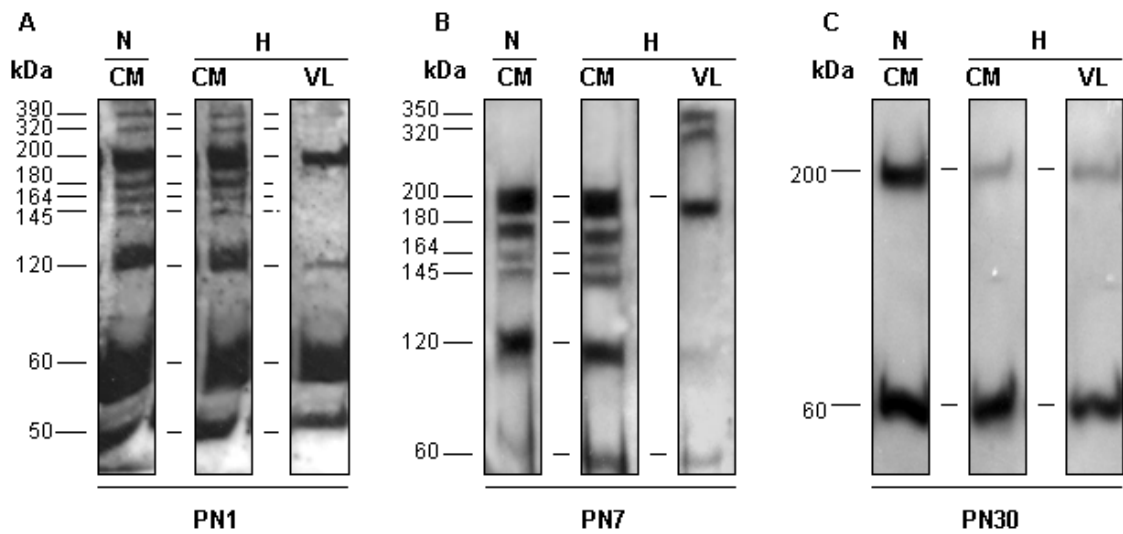


Figura 8. Inmunoblot de LCR ratas H-Tx normales e hidrocefálicas en etapas post natal con AFRU. Análisis de LCR recolectado desde CM y VL de ratas de PN1, PN7, PN30. Los tamaños relativos de cada banda se indican a la izquierda de la figura. Los seis polipéptidos inmunorreactivos, son detectados en LCR de PN1 y, PN7. En PN30, cuatro compuestos se han perdido. PN: día postnatal.

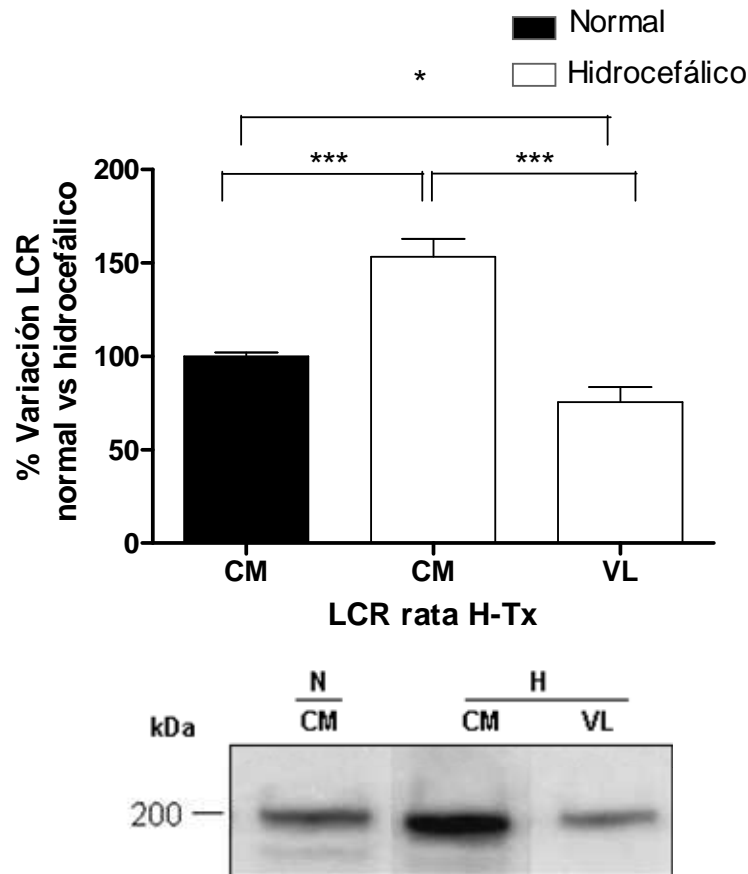


Figura 9. Análisis densitométrico del péptido de 200 kDa en muestras de LCR de PN7. El análisis estadístico consideró n=4. Se utilizó la razón entre la intensidad de banda de muestras de LCR de animales normales e hidrocefálicos, asumiendo al valor correspondiente a LCR de animales normales como 1. Promedios \pm SEM. PN: día postnatal; LCR: líquido cefalorraquídeo; N: normal; H: hidrocefálico; CM: cisterna Magna; VL: ventrículo lateral (* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$)

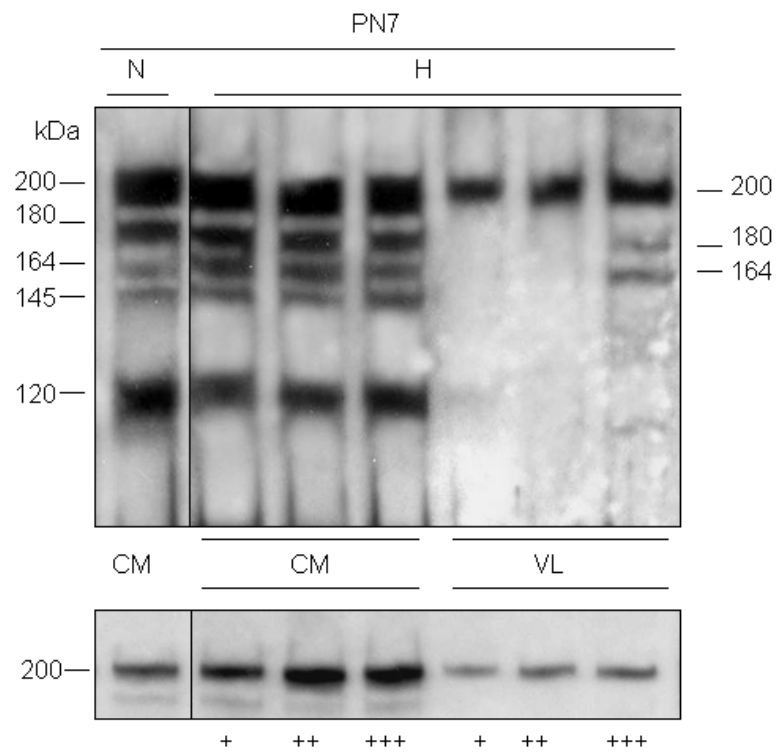


Figura 10. Evaluación LCR de acuerdo al grado de hidrocefalia en rata H-Tx. Las ratas hidrocefálicas en PN7 fueron clasificadas como hidrocefálicas leve (+), moderada (++) o severa (+++). En el panel inferior, se muestra la banda de 200 kDa, en una foto con menor tiempo de exposición. Se observa la variación en la reacción del compuesto de 200 kDa y la presencia de compuestos adicionales en LCR de ratas H-Tx con hidrocefalia severa. Se utilizó AFRU como primer anticuerpo. CM: cisterna Magna; VL: ventrículo lateral; N: normal; H: hidrocefálico; PN7: día 7 post natal.

4.3.2 Anti-p15

Al analizar LCR obtenido de CM de animales en PN7 normales e hidrocefálicos con anti-P15, se observaron cinco compuestos reactivos al anticuerpo, de 320, 200, 180, 164 y 145 kDa, estos fueron detectados tanto en LCR de animales normales como hidrocefálicos, sin embargo, en LCR obtenido de VL de animales hidrocefálicos, solo se pudo visualizar reactiva una banda de 320 kDa (**Figura 11A**). Resultados similares fueron observados en las tres edades postnatales analizadas.

Al hacer análisis densitométrico de las bandas inmunorreactivas con anti-p15 en el LCR de ratas de PN7, se logró determinar que el polipéptido de 320 kDa presentó gran variabilidad en su reactividad al anticuerpo al comparar LCR de animales hidrocefálicos y normal, lo cual fue muy evidente en las muestras de LCR de CM de animales hidrocefálicos, en donde este compuesto se observó altamente reactivo (**Figura 11B**). También fue evidente que este mismo compuesto presentó una tendencia al aumento en las muestras de LCR obtenido de VL de animales hidrocefálicos. El patrón de reacción al anti-P15 de polipéptidos de 200 y 145 kDa también fue diferente entre el LCR normal e hidrocefálico (**Figura 11C**). Se pudo observar que el compuesto de 200 kDa presentó una leve disminución en su reacción en el LCR de CM de animales hidrocefálicos, mientras que el de 145 kDa se vio más aumentado en este mismo LCR. (**Figura 11C**).

En la **Tabla 1**, se resume el patrón de expresión de los polipéptidos inmunorreactivos con anti-p15, a través de las diferentes edades analizadas.

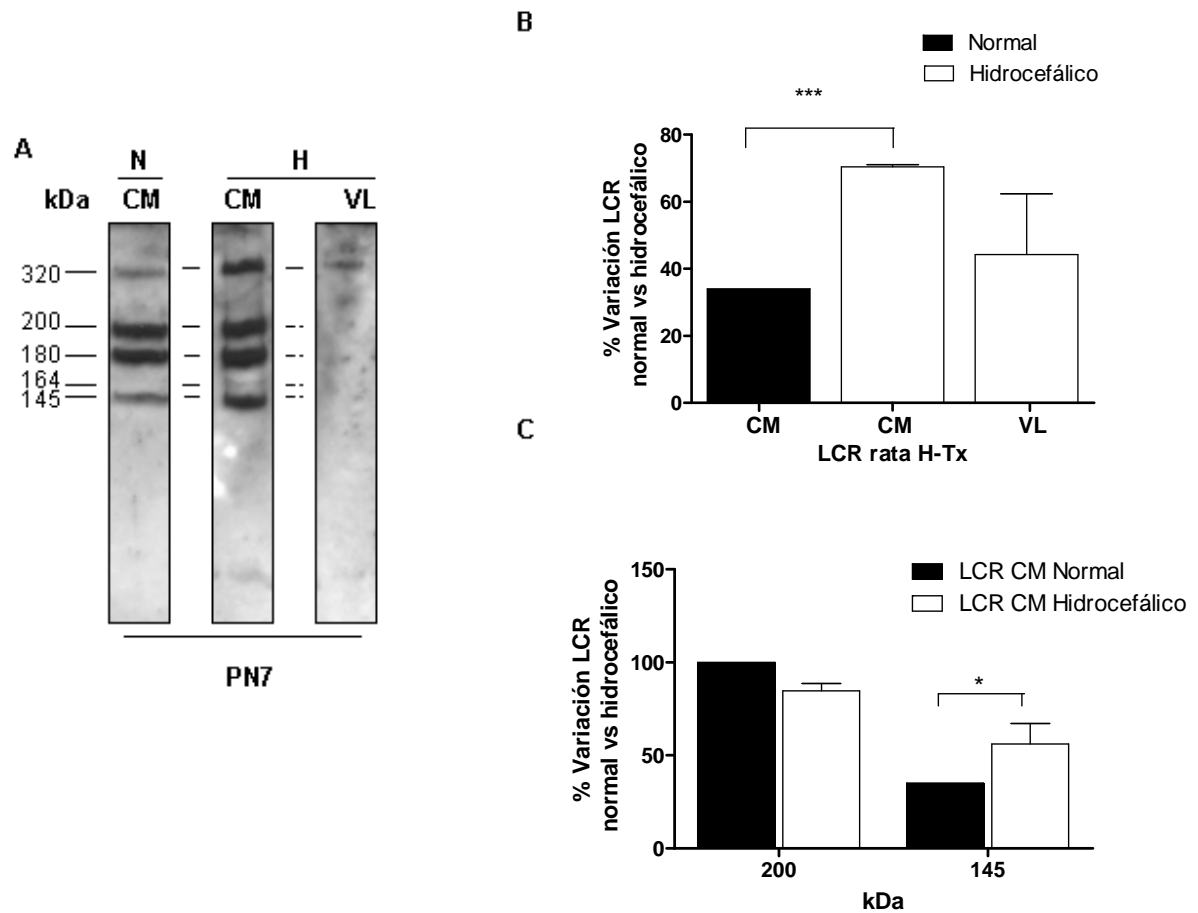


Figura 11. Inmunoblot con anti-p15, de LCR de ratas H-Tx normales e hidrocefálicas en etapas postnatal. Los cinco compuestos inmunorreactivos con anti-p15 se muestran en A, a la izquierda de la figura se indican los tamaños respectivos para cada banda. B: análisis densitométrico de la banda de 320 kDa. C: análisis densitométrico de las bandas de 200 y 145 kDa. El análisis estadístico consideró $n=4$. Se utilizó la razón entre la intensidad de banda de muestras de LCR de animales normal e hidrocefálico, asumiendo al valor correspondiente a LCR de animales normal como 1. Promedios \pm SEM. CM: cisterna Magna; H: hidrocefálica; VL: ventrículo lateral; PN: día postnatal; LCR: líquido cefalorraquídeo. (* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$)

Tabla 1. Expresión de péptidos inmunorreactivos con anti-p15 en diferentes etapas del desarrollo, en LCR de ratas H-Tx normales e hidrocefálicas.

| Edad kDa | E19 | | | E20 | | | PN1 | | | PN7 | | | PN30 | | |
|-------------|-----|----|----|-----|----|----|-----|----|----|-----|----|----|------|----|----|
| | N | H | | N | H | | N | H | | N | H | | N | H | |
| | CM | CM | VL | CM | CM | VL | CM | CM | VL | CM | CM | VL | CM | CM | VL |
| 320 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 200 | + | + | - | + | + | - | + | + | - | + | + | - | - | - | - |
| 180 | + | + | - | + | + | - | + | + | - | + | + | - | - | - | - |
| 164 | + | + | - | + | + | - | + | + | - | + | + | - | - | - | - |
| 145 | + | + | - | + | + | - | + | + | - | + | + | - | - | - | - |

+: presencia del polipéptido

-: ausencia del polipéptido

4.4 Análisis comparativo entre muestras de LCR de ratas H-Tx normal e hidrocefálico a través de electroforesis bidimensional.

A través de electroforesis bidimensional (2D-PAGE) es posible resolver una cantidad de proteínas superior a la que permiten los geles unidimensionales. Considerando esta propiedad se analizaron muestras de LCR de las mismas edades postnatales utilizadas en inmunoblot en una dimensión. El análisis mediante geles en 2D se realizó en un primer lugar para la obtención de un mapa proteómico de LCR normal e hidrocefálico, lo que se logró con la tinción con plata de los geles en 2D-PAGE. Una segunda parte, consistió en realizar inmunoblot de los geles en 2D-PAGE, utilizando AFRU, para identificar posibles variaciones en el perfil proteico reactivo a este anticuerpo.

4.4.1 Electroforesis bidimensional. Análisis de la proteómica del LCR de ratas H-Tx normal e hidrocefálico a través de tinción plata.

En la estandarización de los geles 2D, destinados a tinción con plata, se ensayaron tres cantidades de carga de proteínas (80, 100 y 150 μg). Cuando se usaron 100 μg de proteínas se obtuvo una mejor resolución en términos de cantidad de *spots* visualizados y rendimiento de las muestras (datos no mostrados). Dado que no fue posible obtener esta cantidad de proteínas desde una sola muestra de LCR de rata, se hizo necesario hacer un *pool* de muestras de LCR.

Cada edad fue analizada en triplicado, corriendo en paralelo las muestras de LCR de ratas H-Tx normal (CM) e hidrocefálico (VL). Para este estudio un total de 18 geles fueron teñidos con plata. Los datos obtenidos de los geles 2D-PAGE se usaron

para generar un mapa proteómico e identificar las variaciones entre ambas condiciones (**Figura 12**). Los mapas fueron hechos en gradientes de pH inmovilizados (*IPG strips*) de rango de pH 3-10. La segunda dimensión fue hecha con geles en gradiente 4-20% *SDS-PAGE*. Mediante esta técnica se logro obtener un mapa proteómico de LCR normal e hidrocefálico, en este último se muestran principalmente los *spots* que muestran diferencias con el LCR normal (**Figura 13**), apareciendo como un complemento del mapa normal, en vez de uno entero nuevamente.

En el LCR normal 37 *spots* fueron consistentemente identificados en las diferentes edades estudiadas (PN1, 7 y 30) (**Figura 12**), mientras que en el LCR hidrocefálico se detectaron 3 *spots* adicionales (**Figura 13**). Los *spots* aquí caracterizados hacen mención en algunas ocasiones a un grupo de ellos.

El análisis de la proteómica del LCR mediante geles teñidos con plata, permitió identificar diferencias entre el patrón de proteínas de LCR de ratas H-Tx normal e hidrocefálica y a través de las edades en estudio. Las principales diferencias entre ambas condiciones fueron agrupadas de acuerdo al siguiente criterio:

- i) proteínas presentes sólo en LCR de ratas H-Tx normal
- ii) proteínas presentes sólo en LCR de rata H-Tx hidrocefálica
- iii) proteínas aumentadas en LCR de rata H-Tx normal
- iv) proteínas aumentadas en LCR de rata H-Tx hidrocefálica

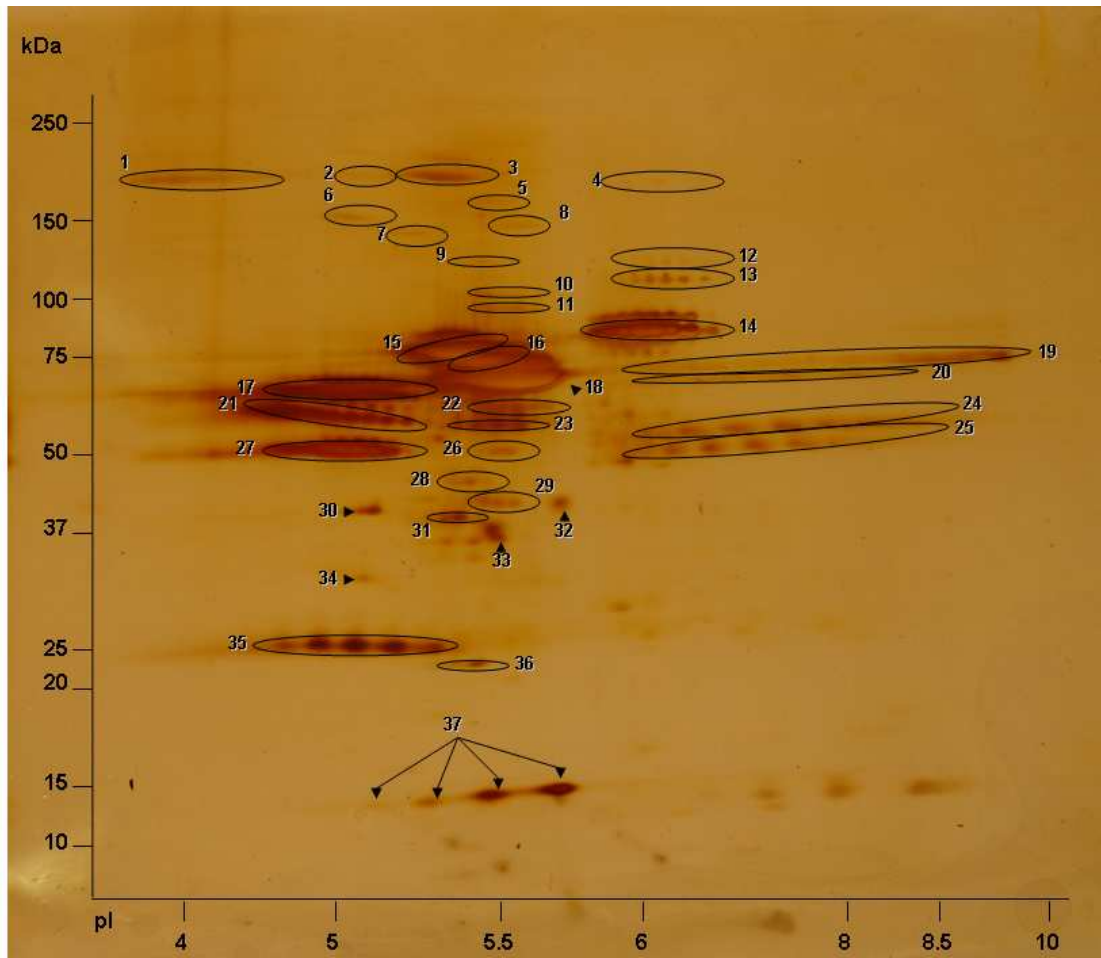


Figura 12. Proteoma LCR de rata H-Tx normal. Mapa proteómico representativo, creado a través de electroforesis bidimensional de muestras de LCR normal de PN 1. Las proteínas del LCR fueron separadas por pI en *strips* de gradiente lineal de pH 3-10, seguido por separación por tamaño en geles de poliacrilamida en gradiente del 4-20%. El gel corresponde a tinción con plata. Los números indican los *spots* identificados en todas las muestras de LCR de rata H-Tx normal de las diferentes edades analizadas.

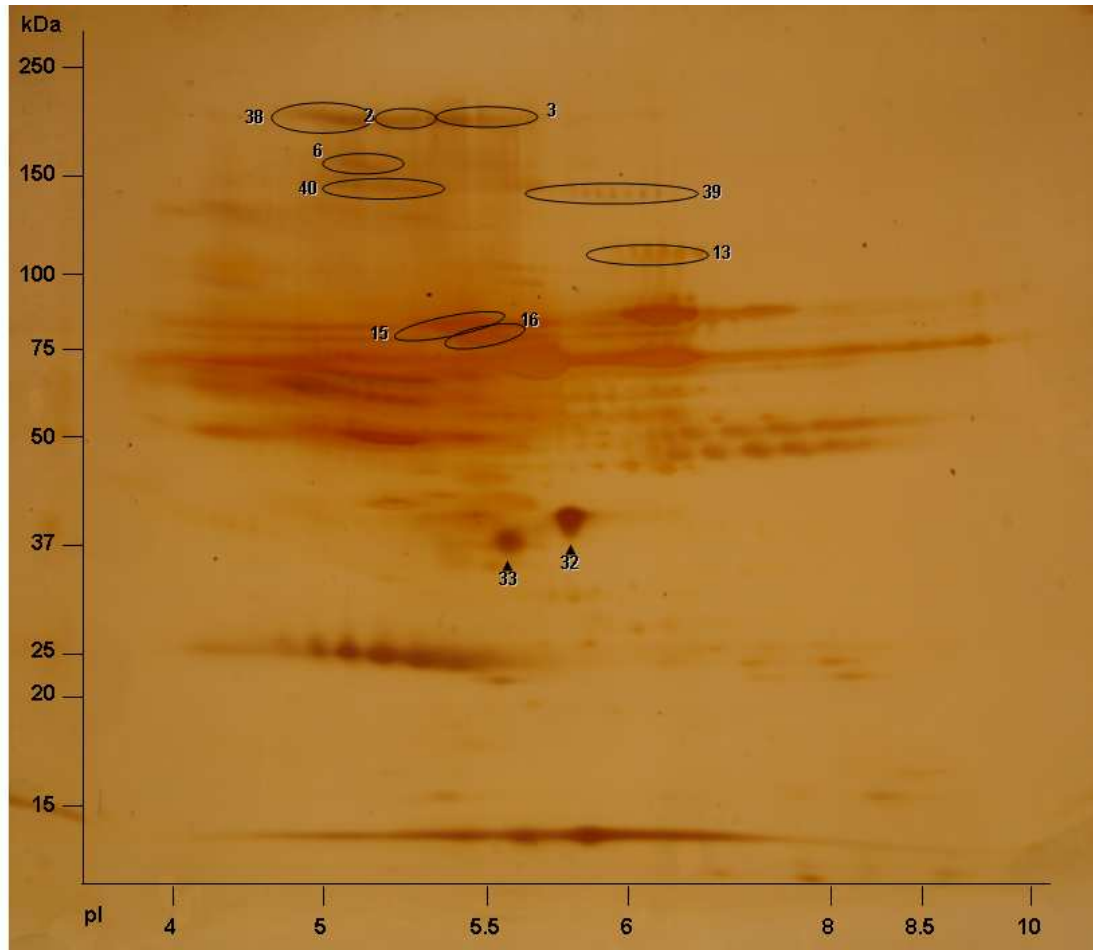


Figura 13. Proteoma LCR de rata H-Tx hidrocefálico. Mapa proteómico representativo, creado a través de electroforesis bidimensional de muestras de LCR de VL de rata H-Tx hidrocefálica de PN 1. Las proteínas del LCR fueron separadas por carga en *strips* de gradiente lineal de pH 3-10, seguido por separación por tamaño en geles de poliacrilamida en gradiente del 4-20%. El gel corresponde a tinción con plata. Los números corresponden a los *spots* que mostraron diferencia entre LCR de rata H-Tx normal e hidrocefálico.

4.4.1.1 Proteínas presentes sólo en LCR de ratas H-Tx normal

El análisis de muestras de LCR normal a PN1, 7 y 30 mediante geles en 2D mostró que los *spots* 1, 4 y 12 solo se encuentran presente en muestras de LCR de ratas H-Tx normal. Estos *spots* no fueron detectados en el LCR de ratas hidrocefálicas de ninguna de las edades utilizadas (**Figura 14**). El *spot* 1, con un peso molecular aproximado de 200 kDa y pI 3-4,5, comprende varios *spots*, pero que no fueron resueltos completamente en el gradiente de pH en el que se trabajó (**Figura 14**). Los *spots* 4 y 12 al igual que el *spot* 1 corresponde a varios *spots* con un peso molecular estimado de 200 y 120 kDa, respectivamente (**Figura 14**).

4.4.1.2 Proteínas presentes sólo en LCR de ratas H-Tx hidrocefálica

El estudio comparativo de muestras de LCR normal e hidrocefálico permitió caracterizar tres *spot* que fueron consistentemente encontrados solo en las muestras de LCR de ratas H-Tx hidrocefálica (**Figura 14**). Estos corresponden a los *spots* 38, 39 y 40, los cuales fueron detectados en PN1 y PN7. En PN30, la proteómica del LCR cambia notoriamente en relación a las edades más pequeñas, se pudo observar una notoria disminución en el número de proteínas identificadas, en esta edad no fueron detectados los *spots* 38 y 39 (**Figura 14**). En PN 30, al parecer existiría además un cambio cualitativo de la composición del LCR, ya que se detectó en LCR normal el *spot* 40 que antes era exclusivo del LCR hidrocefálico de PN 1 y 7 (**Figura 14**).

El *spot* 38 corresponde a un grupo constituido de dos *spots*, probables isoformas de una misma proteína. Este tiene un tamaño aproximado de 200 kDa y se encuentra

en un rango de pI 4,5-5,2 aproximadamente. Este *spot* nunca fue pesquisado a través de tinción con plata en LCR de animales normales.

El *spot* 39 corresponde a cerca de 9 *spots* con un tamaño aproximado de 150 kDa y con de pI 5.5-7.0. Estos *spots* fueron siempre identificados en LCR de animales hidrocefálicos de PN1 y PN7, pero en esta última edad con una menor intensidad. (**Figura 14**). Este *spot* al igual que el 38 nunca fue identificado en muestras de LCR de animales normales. En PN30 los *spots* 38 y 39 nunca fueron detectados en las muestras de LCR tanto de ratas normales como hidrocefálicas.

El *spot* 40, de 150 kDa y pI 5.0-5.5, corresponde a dos *spot* presentes en todas las edades analizadas (en ratas H-Tx hidrocefálicas) y además en LCR de ratas normal de PN30. Este *spot* persiste en todas las muestras de LCR de ratas hidrocefálicas.

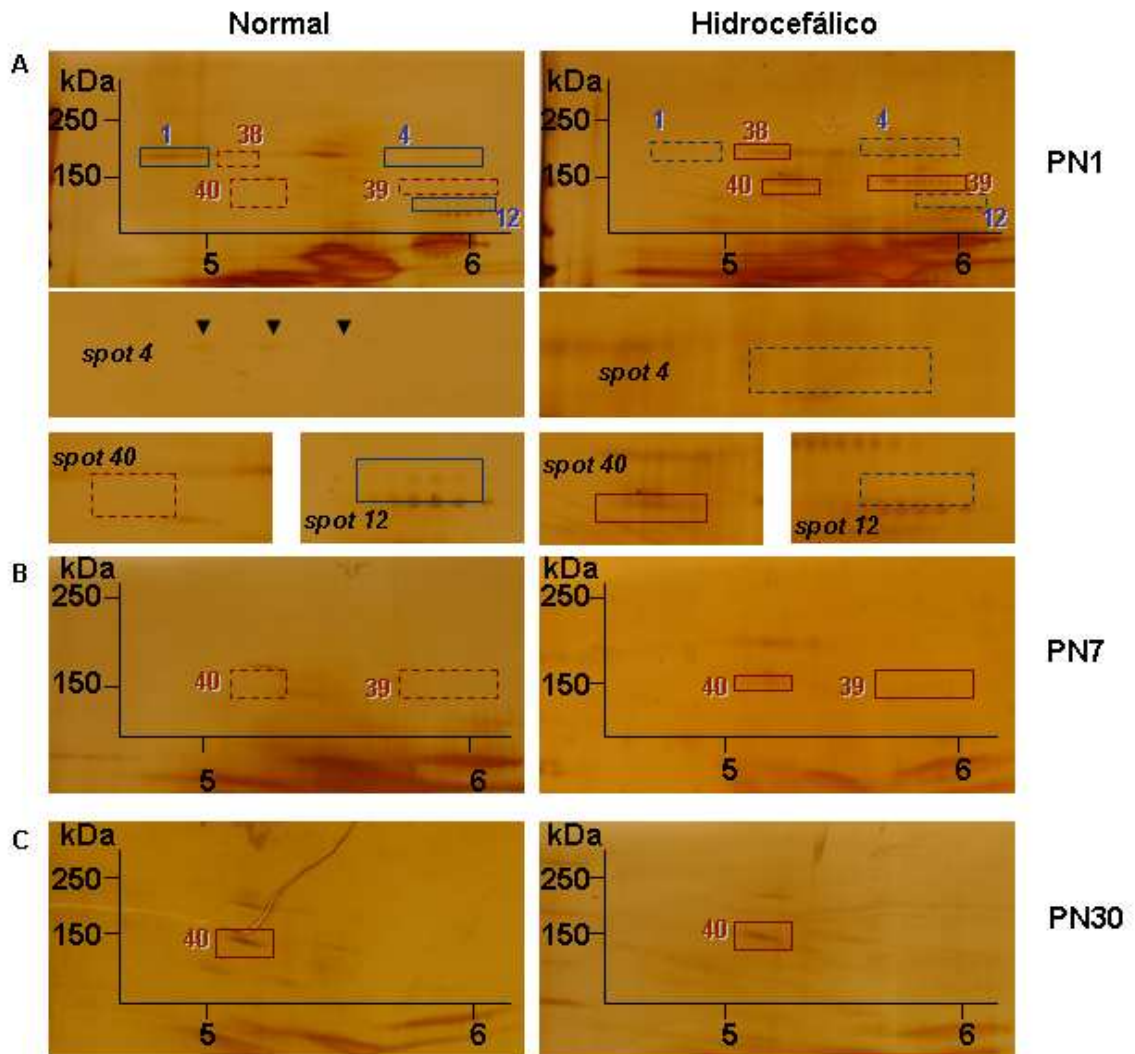


Figura 14. Spots presentes sólo en LCR de ratas H-Tx normal o hidrocefálico. En azul spots presentes sólo en LCR normal y en rojo spots presentes sólo en LCR hidrocefálico. Los rectángulos con líneas punteadas indican la ausencia de spots. Bajo el panel A, se muestran algunos spots con mayor aumento. El tamaño de estándar de peso molecular se indica a la derecha y los valores del estándar de pI se indica en la parte inferior de cada fotografía. PN: día postnatal.

4.4.1.3 Proteínas en mayor concentración en el LCR de ratas H-Tx normal

El estudio comparativo de muestras de LCR normal e hidrocefálica al PN1 mostró que el *spot* 3 está en mayor cantidad en las muestras de LCR normal (**Figura 15**). Este *spot* tiene un peso molecular aproximado de 200 kDa y comprende un rango de pI 5.4-5.7. Este *spot* al parecer sería exclusivo de PN 1, por que no fue identificado en el LCR normal de PN 7 y 30 (**Figura 15**).

4.4.1.4 Proteínas en mayor concentración en LCR de ratas H-Tx hidrocefálico

La proteómica del LCR hidrocefálico mostró que los *spot* 2, 32, 33 y 37 están en mayor concentración en el LCR hidrocefálico que en el normal. De estos *spots*, sólo el 32 se encontró aumentado en las tres edades analizadas (**Figura 16**).

El *spot* 2 con un tamaño de 200 kDa y pI 5.2-5.4, presentó diferencias principalmente a edades postnatales tempranas. Al PN1 se observó un notorio aumento en su concentración en el LCR hidrocefálico, si se lo compara con el LCR normal de la misma edad (**Figura 16**). El aumento del *spot* 2 se mantuvo en PN7, siendo casi indetectable en las muestras de LCR normal (**Figura 16**).

Al PN30 se observó un comportamiento distinto de este *spot* como ya se ha observado para otros *spots* en esta edad. El *spot* 2 no presentó mayor diferencia en su concentración entre ambas condiciones experimentales (**Figura 16**).

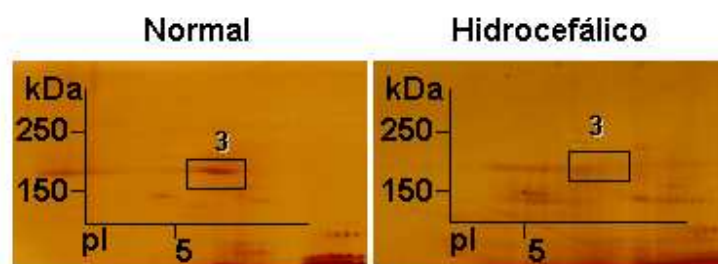


Figura 15. Spot 3 en mayor concentración en el LCR de ratas H-Tx normal de PN 1. Geles 2D-PAGE de LCR de ratas normal e hidrocefálico de PN1 teñido con plata. El rectángulo indica la zona donde se encuentra el *spot* 3, el que muestra un aumento en su concentración en LCR de rata H-Tx normal. A la izquierda se indica el peso molecular en kDa. En la parte inferior de la fotografía, se indica el valor de pI.

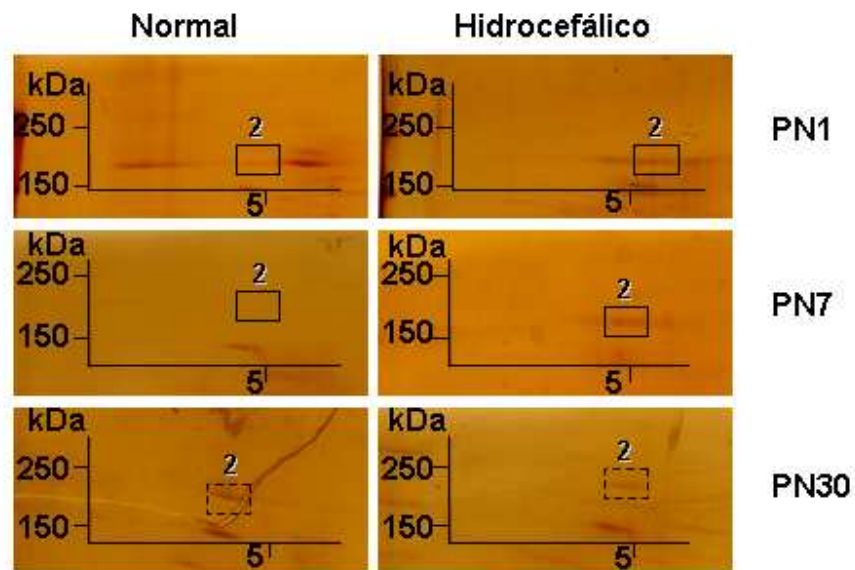


Figura 16. Spot 2 en alta concentración en el LCR de rata H-Tx hidrocefálico.

Geles 2D-PAGE de LCR de ratas H-Tx normal e hidrocefálico de PN 1, 7 y 30 teñidos con plata. En los recuadros se indica el *spot 2* en mayor concentración en las muestras de LCR de animales hidrocefálicos. Los rectángulos punteados indican la no variación de este *spot* al PN30. Los números a la izquierda indican el peso molecular en kDa. En la parte inferior de la figura se indica el valor de pI aproximado. PN: día postnatal.

Uno de los *spot* que presentó una diferencia más consistente entre el LCR de ratas H-Tx normal e hidrocefálica fue el *spot* 32 con un tamaño estimado de 37 kDa y un pI 5,5-6. Este *spot* se detectó en mayor concentración en el LCR de animales hidrocefálico de todas las edades estudiadas (**Figura 17**). El análisis densitométrico de este *spot* mostró una diferencia estadísticamente significativa entre la condición normal e hidrocefálica (**Figura 18A**).

El *spot* 33 de tamaño estimado a 35 kDa y de un pI aproximado de 5.5, al igual que el *spot* 32 fue detectado en mayor concentración en el LCR de animales hidrocefálicos de PN1 y PN7 (**Figura 17A**), mostrando diferencias significativas sólo en el LCR de animales hidrocefálicos de PN7 ($p < 0,05$) (**Figura 18B**). En PN30 este *spot* no tuvo buena resolución con el rango de pI utilizado en los geles de 2D-PAGE. Sin embargo, en las muestras de LCR de PN30 separadas utilizando un rango de pH más estrecho (pH 5-8) este *spot* pudo ser resuelto de una forma más eficiente y detectable (**Figura 17B**). En este rango de pH, fue detectado otro *spot*, no caracterizado previamente, pero que sin embargo presenta una intensidad mayor en muestras de LCR de animales hidrocefálicos, este es indicado sólo con una cabeza de flecha en la **Figura 17B**.

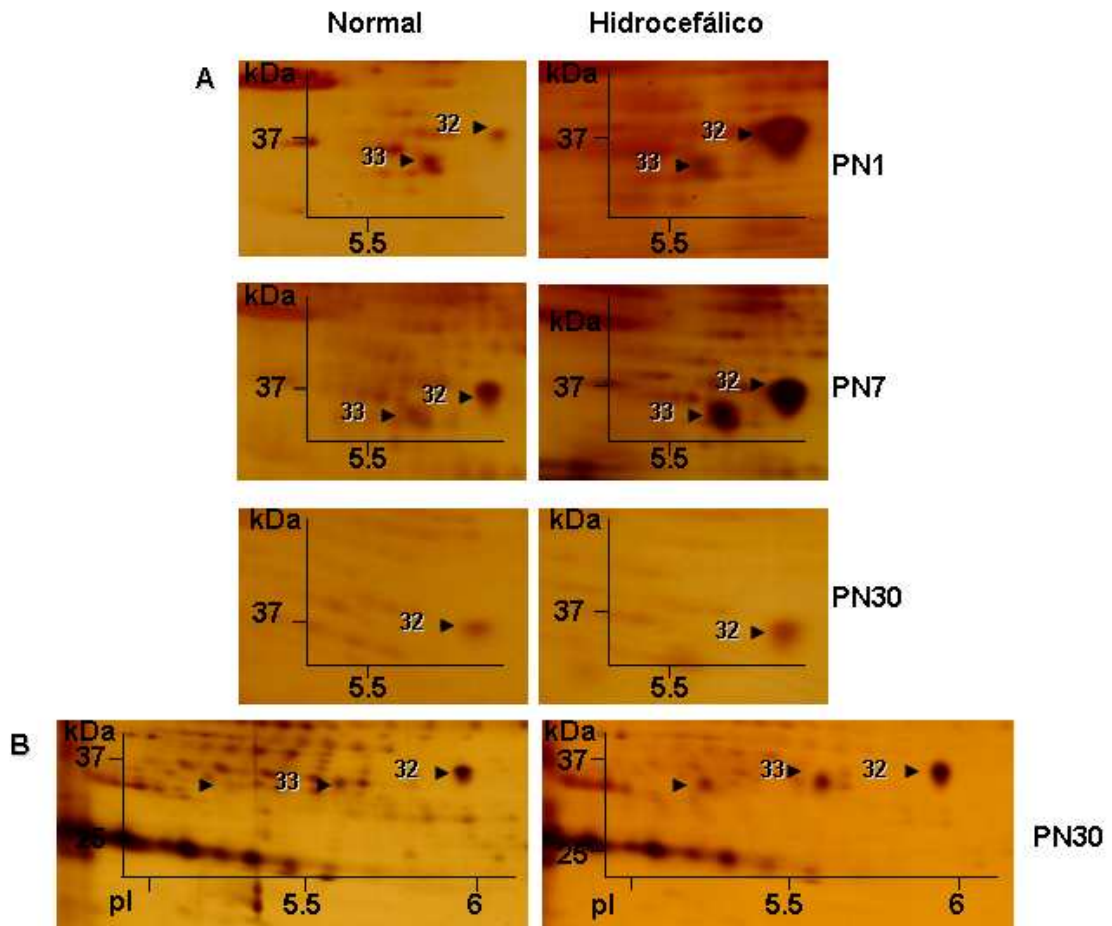


Figura 17. Estudio de spots que muestran mayor concentración en LCR de ratas H-Tx hidrocefálicas. **A:** Geles 2D-PAGE de muestras de LCR de ratas H-Tx normal e hidrocefálicas a diferentes edades corridas en *IPG strips* de rango de pH 3-10 y teñidos con plata. **B:** Geles 2D-PAGE de muestras de LCR corridas en *IPG strips* de rango de pH 5-8. Las cabezas de flecha indican los spots que presentaron variación en su concentración. El tamaño de estándar de peso molecular se indica a la izquierda y los valores del estándar de pI se indica en la parte inferior de cada fotografía. PN: día postnatal.

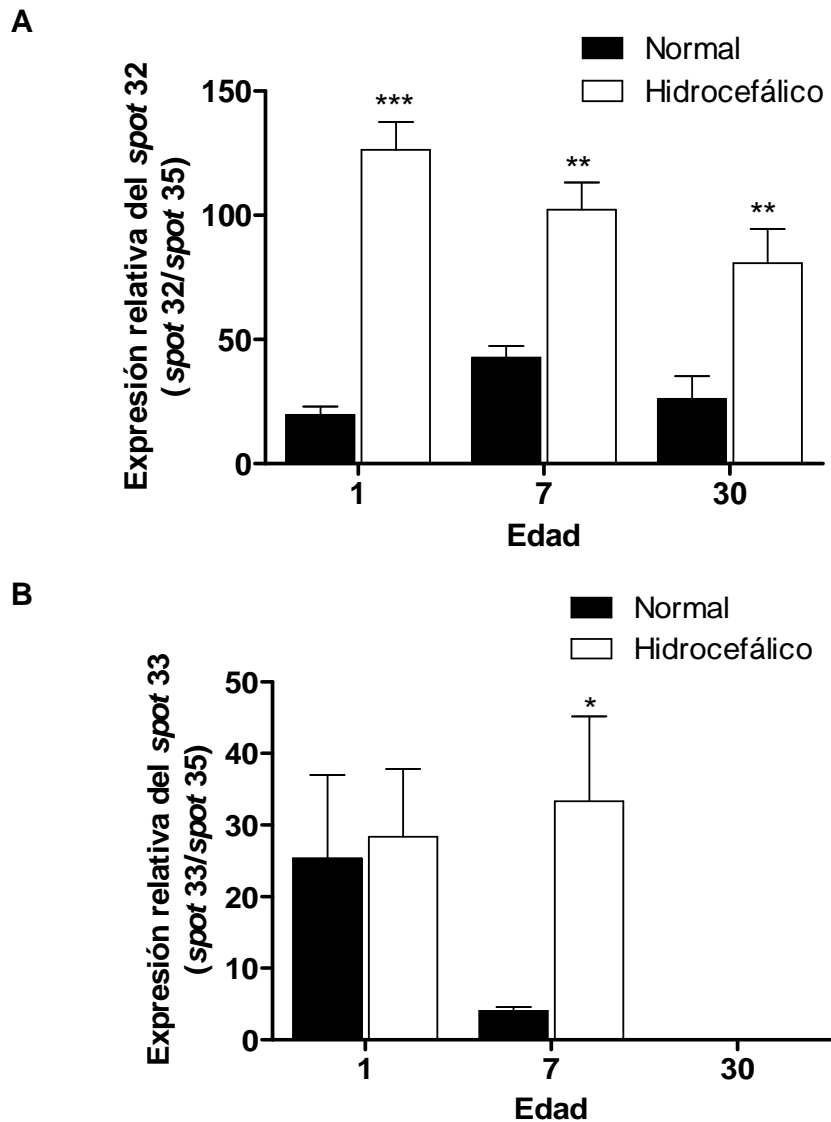


Figura 18. Análisis densitométrico de los spots 32 y 33 en muestras de LCR. A: Variación del spot 32 indicado como porcentaje de variación en LCR de rata H-Tx normal e hidrocefálico en PN1, PN7 y PN30. **B:** Variación del spot 33 indicado como porcentaje de variación en muestras de LCR de rata normal e hidrocefálico en PN1, 7 y 30. Promedios \pm SEM. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$) ($n=3$)

Otro de los *spots* que presentó un aumento en el LCR de ratas H-Tx hidrocefálicas fue el *spot* 37 con un tamaño aproximado de 14 kDa y pI 5-5.8. Este *spot* corresponde a un conjunto de tres *spots* apareciendo en algunas ocasiones un cuarto *spot* (**Figura 19B**). Este grupo de proteínas incrementa su concentración principalmente en muestras de LCR de animales hidrocefálicos de PN7 y PN30, siendo más claro este aumento en PN 30, donde según el análisis estadístico mostró una variación estadísticamente significativa ($p < 0,05$) (**Figura 19 y 20A**).

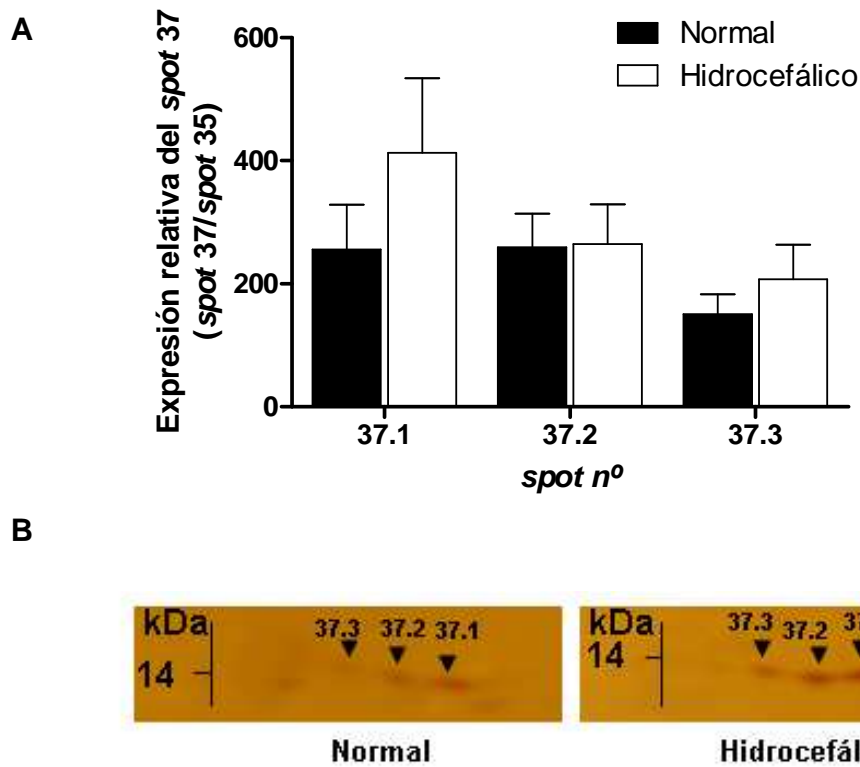
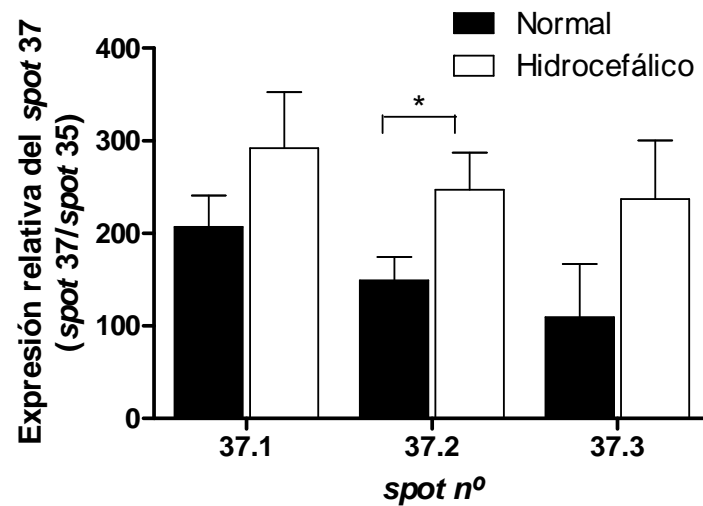


Figura 19. Análisis densitométrico del spot 37, en LCR de rata H-Tx de PN7. A: Variación en porcentaje de la intensidad de las tres proteínas que componen en *spot* 37. Se muestra un aumento de estos *spots* en el LCR de rata H-Tx hidrocefálica. **B:** Geles 2D-PAGE de muestras de LCR de ratas H-Tx normal e hidrocefálica de PN7, teñidos con tinción con plata. Las cabezas de flechas indican los *spots* que fueron medidos para el análisis densitométrico. Promedios \pm SEM.(n=3)

A



B



Figura 20. Análisis densitométrico del spot 37, en LCR de rata H-Tx de PN30. A: Variación en porcentaje de la intensidad de las tres proteínas que componen el spot 37. Se muestra un aumento de estos spots en el LCR de rata H-Tx hidrocefálica. **B:** Geles 2D-PAGE de muestras de LCR de ratas H-Tx normal e hidrocefálica de PN30, teñidos con tinción con plata. Las cabezas de flechas indican los spots que fueron medidos para el análisis densitométrico. Promedios \pm SEM. ($p < 0,05$) ($n=3$)

4.4.2 Análisis a través de inmunoblot de geles 2D-PAGE.

4.4.2.1 Análisis utilizando AFRU

Un tercer paso en este estudio, fue identificar cómo algunas de estas proteínas que muestran diferencias en cuanto a su concentración en el LCR de ratas H-Tx hidrocefálicas, podrían también presentar variaciones en su patrón inmunorreactivo a anticuerpos dirigidos contra la secreción del OSC. Para este propósito muestras de LCR de animales normal e hidrocefálico sometidas a electroforesis bidimensional fueron evaluadas mediante inmunoblot con AFRU.

Solo se identificaron en geles en 2D *spots* AFRU positivos de tamaño superior a 50 kDa, similar a lo observado en inmunoblot en una sola dimensión con el mismo anticuerpo (**Figura 21**). El patrón de reactividad de los *spots* para AFRU observado en geles 2D, presentó variaciones entre edades y condiciones analizadas. En LCR obtenido a partir de animales normales e hidrocefálicos en PN1, se observó un mayor número de *spots* AFRU positivos que en las otras edades analizadas. Se detectaron 12 compuestos inmunorreactivos en LCR de animales normales y 7 en LCR de animales hidrocefálicos (**Figura 21**). En la **Tabla 2** se indican los tamaños y pI estimados para cada *spot* AFRU positivo identificado en geles de 2D.

Se estimó que existiría una equivalencia entre los resultados obtenidos con AFRU en LCR de animales en PN1 en geles de una dimensión y los observados con el mismo anticuerpo en inmunoblot de 2D, existiendo equivalencia en los tamaños estimados de los péptidos (por una dimensión) y los *spots* AFRU positivos en 2D (**Figura 21**, compara **A** y **C**). Compuestos de alto peso molecular, que habían sido

inmunorreactivos al AFRU en geles de una dimensión (320 y 390 kDa), no pudieron ser pesquisados en 2D-PAGE (**Figura 21**, compara **A** y **C**).

Al analizar los resultados obtenidos de geles 2D-PAGE de LCR de ratas H-Tx normal e hidrocefálica (PN1, 7 y 30) mediante inmunoblot utilizando AFRU y hacer una correspondencia con la información obtenida de geles similares teñidos con plata, se observó que algunos de los compuestos que muestran diferencia entre el LCR de ratas normal e hidrocefálico correspondían a compuestos AFRU positivos, los cuales podrían estar siendo secretados por el OSC. Es así como los *spots* que con tinción con plata mostraron diferencia entre el LCR de animales normal e hidrocefálico proveniente de animales en PN1 se corresponden con los *spots* AFRU positivos 2, 4, 12 y 40 (**Figura 21B** y **C**). En LCR obtenido de animales normales en PN7, el número de compuestos AFRU positivos detectados bajó a 5 *spots* y estos fueron los *spots* 4, 7, 17, 18 y 40, los cuales habían sido previamente identificados en los geles de 2D teñidos con plata (**Figura 22C**), al igual que en el LCR de animales normal, en LCR de animales hidrocefálicos, se identificaron 5 *spots* inmunorreactivos al AFRU, sin embargo algunos de ellos no se correspondían con los visualizados en el LCR de animales normal, estos fueron los *spots* 2, 7, 15, 18 y 40 (**Figura 22C**). De estos *spots* inmunorreactivos solo los compuestos 2, 4, y 40 presentaron diferencia entre LCR de animales normal e hidrocefálico. El *spot* 2 que fue observado en mayor concentración en el LCR hidrocefálico también fue muy reactivo al AFRU, y pudiera corresponder con algún compuesto secretado por el OSC al LCR, principalmente al de los animales hidrocefálicos.

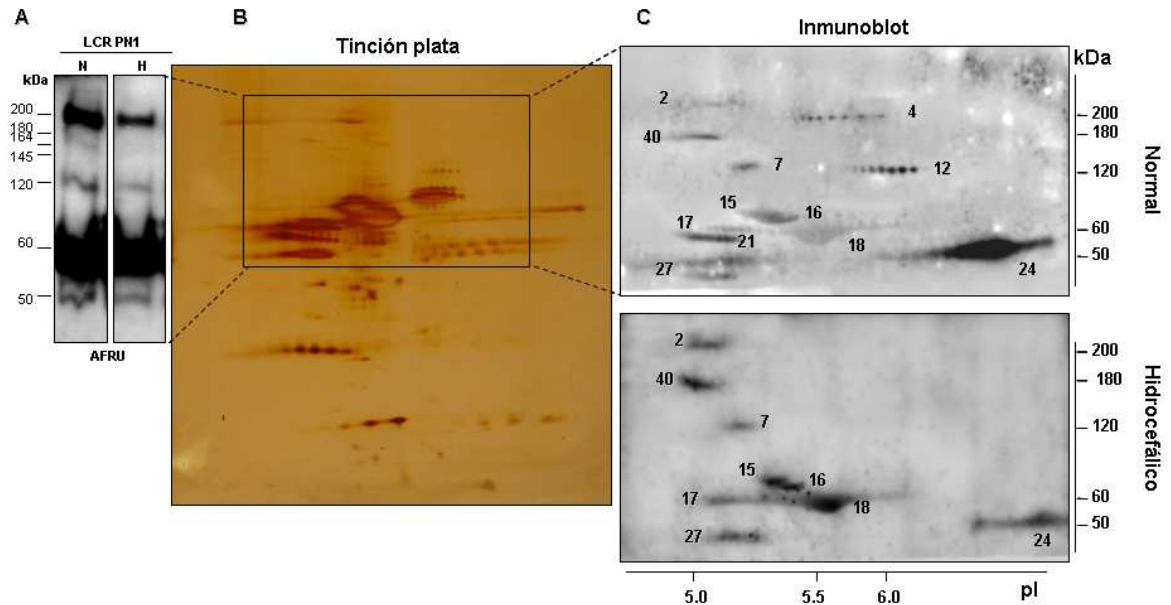


Figura 21. Análisis en geles 2D-PAGE de muestra de LCR de ratas H-Tx en PN1 mediante inmunoblot utilizando AFRU. A: inmunoblot en 1D de LCR de cisterna magna (CM) de ratas H-Tx normal (N) de PN1 en que se detectan siete compuestos inmunorreactivos al AFRU. En el LCR de VL de ratas hidrocefálicas sólo se detectaron los compuestos de 200, 164 120, 60 y 50 kDa. **B:** Muestra de LCR de ratas normal resuelta en un geles de 2D-PAGE y teñida con plata. El rectángulo indica la zona donde se encuentran los *spot* AFRU positivos. **C:** inmunoblot de geles de 2D-PAGE de LCR de ratas H-Tx normal e hidrocefálica (PN1) utilizando AFRU. Se muestra que los *spots* 2, 4, 12 y 40 que presentan diferencia en el LCR de animales hidrocefálico son AFRU positivos. Se identifican además otros siete *spots* inmunorreactivos. Los números indican los *spots* inmunorreactivos con AFRU. N: normal; H: hidrocefálico

Tabla 2. Spots AFRU positivos en 2D-PAGE

| Nº <i>spot</i> ^a | Observado | | PN1 | | PN7 | | PN30 | |
|--------------------------------|-----------------|-----------------------|-----|-----|-----|-----|------|----|
| | pI ^b | PM (kDa) ^b | N | H | N | H | N | H |
| 2 | 5,0-5,3 | 220 | +++ | +++ | | +++ | + | + |
| 40 | 5,0-5,5 | 180 | ++ | +++ | + | + | + | + |
| 7 | 5,3-5,5 | 120 | ++ | +++ | + | +++ | ++ | + |
| 15-16 | 5,3-5,6 | 70 | +++ | +++ | | + | | |
| 17 | 4,8-5,4 | 60 | +++ | ++ | + | | + | |
| 21 | 4,8-5,4 | 56 | + | | | | | |
| 27 | 4,8-5,4 | 50 | + | + | | + | | |
| 4 | 5,8-7,0 | 200 | ++ | | ++ | | | |
| 12 | 6,0-7,0 | 120 | +++ | | | | + | |
| 18 | 5,3-5,8 | 60 | +++ | +++ | + | ++ | + | ++ |
| 24 | 6,0-8,0 | 50 | +++ | +++ | | + | + | + |

^a numeración como se muestra en Figura 12

^b estimado desde los geles 2D-PAGE teñidos con plata

+++: presencia del *spot* en al menos tres *Inmunoblot*

++: presencia del *spot* en al menos dos *Inmunoblot*

+: presencia del *spot* en sólo un *Inmunoblot*

En PN30, siete compuestos AFRU positivos fueron detectados en muestras de LCR de animales normales correspondiente a los *spots* 2, 7, 12, 17, 18, 24 y 40 y cinco en LCR de animales hidrocefálicos que corresponden al los *spots* 2, 7, 16, 18, 24 y 40 (**Figura 23**). Al compara entre los resultados obtenidos en geles unidimensionales y 2D-PAGE a esta edad, se observó una clara diferencia en el patrón de compuesto inmunorreactivos al AFRU, observándose un mayor número de compuestos inmunorreactivos en geles de 2D-PAGE. (**Figura 23**, compara **A** y **C**). Al igual que en las muestras de LCR de animales hidrocefálicos de PN1 y 7, en PN30 varios de los *spots* que presentan diferencia en LCR hidrocefálico son compuestos AFRU positivos (*spot* 2 ,12 y 40) (**Figura 23C**). Es interesante destacar que el *spot* 2 que está aumentado en el LCR hidrocefálico fue reactivo al AFRU en las tres edades analizadas. Esto mismo se puede pensar para el *spot* 40 que solo está en el LCR hidrocefálico y que resulta ser inmunorreactivo al AFRU.

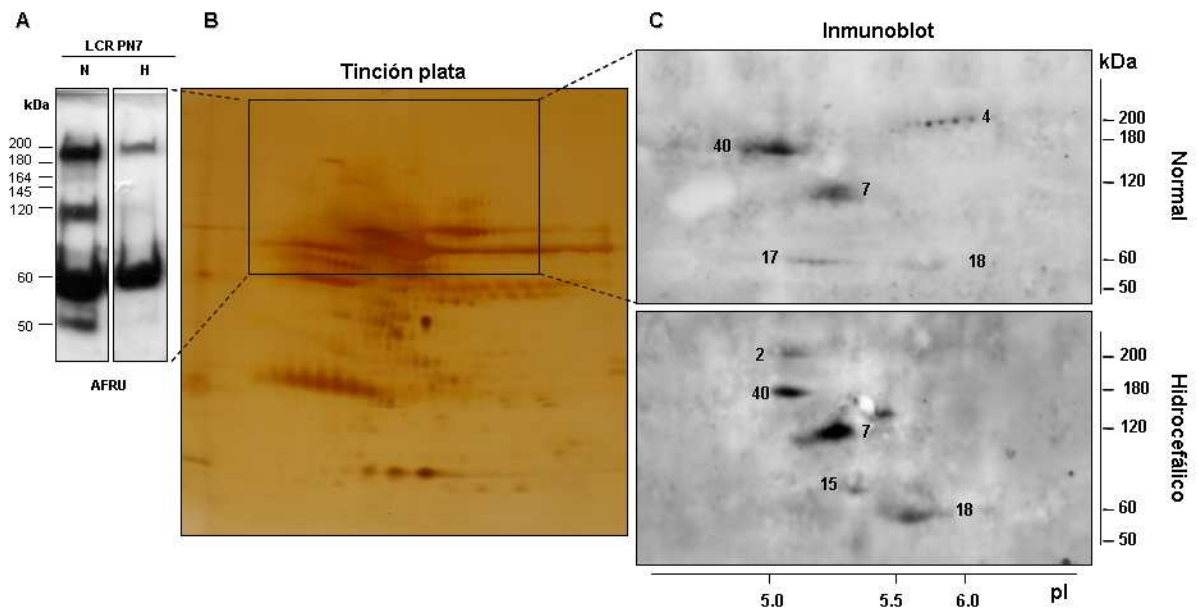


Figura 22. Análisis de LCR de ratas H-Tx en PN7 en 2D-PAGE mediante inmunoblot utilizando AFRU. A: Gel en una dimensión de LCR de ratas H-Tx normal (N) e hidrocefálico (H) utilizando AFRU. Siete polipéptidos son detectados en LCR de animales normal y 3 en LCR de animales hidrocefálicos. Los números indican el peso molecular en kDa. **B:** Gel en 2D-PAGE de LCR teñido con plata. En el recuadro se indica la zona que comprende los compuestos AFRU positivos. **C:** Geles de 2D-PAGE inmunoteñido con AFRU en que se muestra 5 *spots* reactivos en el LCR de rata normal y 5 *spots* en LCR de ratas hidrocefálicas.

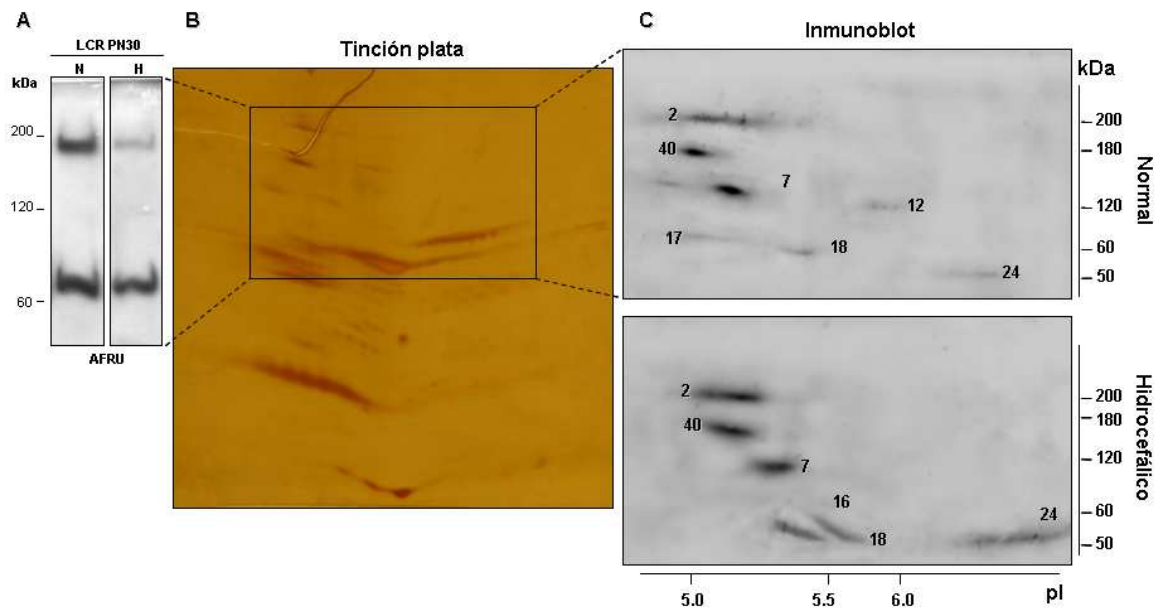


Figura 23. Inmunoblot LCR de ratas H-Tx en PN30 en 2D-PAGE utilizando AFRU.

A: Inmunoblot en una dimensión de LCR de ratas H-Tx normal (N) e hidrocefálica (H) usando AFRU. En este se muestran al menos 3 péptidos inmunorreactivos de 200, 120 y 60 kDa. **B:** Gel en 2D-PAGE de LCR de ratas al PN30 teñido con plata. En el recuadro se muestra la zona correspondiente a los *spots* analizados en **C:** Inmunoblot de gel en 2D-PAGE de LCR de ratas H-Tx normal e hidrocefálica en que se muestran los *spots* identificados con AFRU. N: normal; H: hidrocefálico.

4.4.2.2 Análisis de muestras de LCR utilizando el anticuerpo anti-transtirretina

Transtirretina (TTR) es una proteína secretada principalmente por los plexos coroideos hacia el LCR, sin embargo, recientes publicaciones han demostrado que esta proteína también sería secretada por el OSC (Montecinos *et al*, 2005).

En vista que el objetivo de esta Tesis es evaluar la secreción del OSC hacia el LCR, se realizaron ensayos de inmunoblot utilizando anti-TTR en muestras de LCR de PN1 (**Figura 24**). En geles unidimensionales, fue posible pesquisar dos péptidos inmunorreactivos con TTR, cuyos tamaños relativos fueron de 40 y 14 kDa (**Figura 24A**). Al pasar a geles 2D-PAGE sólo fue posible identificar un *spot* inmunopositivo al anticuerpo anti-TTR, el cual correspondió al *spot* número 37 descrito en los geles de plata (**Figura 24B y C**). Este *spot* corresponde a un grupo de 3 *spots* cuya masa molecular es de 14 kDa y pl 5-6, sin embargo, la forma correspondiente a 40 kDa no fue detectada mediante esta técnica.

El *spot* 37 fue uno de los que aumentaron en LCR hidrocefálico, como ya se describió a través de los geles teñidos con plata.

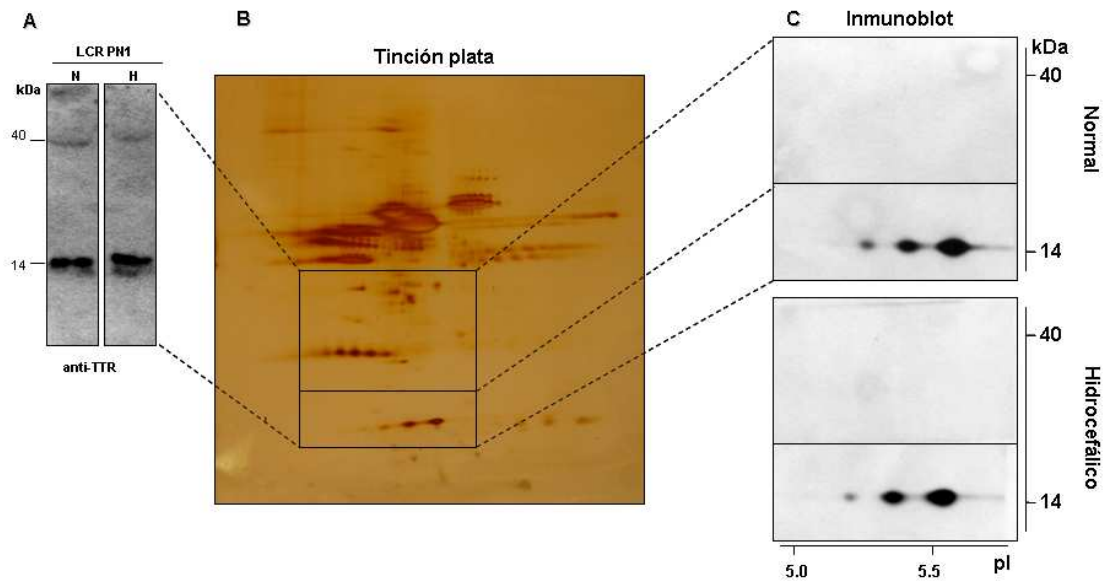


Figura 24. Estudio mediante inmunoblot de muestras de LCR de ratas H-Tx en PN1 con anti-TTR. A: geles unidimensionales de LCR de ratas H-Tx normal e hidrocefálica en PN 1, en que se identifican 2 péptidos de 14 y 40 kDa. **B:** Gel en 2D-PAGE de LCR de ratas en PN1 teñido con plata. El recuadro indica la zona de los *spots* analizados. **C:** Inmunoblot de LCR de ratas H-Tx normal e hidrocefálica en PN 1 en que se muestra el *spot* 37 (grupo de tres *spots*) inmunorreactivo con anti-TTR y con un tamaño de 14 kDa.

4.5 Estudio preliminar del efecto del LCR sobre cultivo de neuroesferas

Células troncales neurales multipotentes pueden ser aisladas de varias regiones del sistema nervioso central (SNC) de los mamíferos, en distintos estadios de su desarrollo (Gage, 2000) y pueden hacerse proliferar en cultivo, como neuroesferas (NE) en suspensión. Las células de estas neuroesferas son capaces de diferenciarse *in vitro* a neuronas y células gliales, cuando reciben las señales apropiadas (Reynolds *et al*, 1992).

En nuestro laboratorio el cultivo de NE ha sido estandarizado y ya se ha comenzado a trabajar en ellas evaluando cómo responden frente estímulos como el LCR (González, 2007) (**Figura 25**).

Las células que componen las NE tienen la potencialidad para adquirir diferentes linajes celulares, esto nos permitió utilizar las NE para hacer una evaluación de su respuesta al tratamiento con LCR, procedente de animales normales e hidrocefálicos. Considerando evidencias bibliográficas que señalan que la composición del LCR en etapas del desarrollo temprano es importante para un adecuado desarrollo cortical (Miyani *et al*, 2006), planificamos este experimento el cual nos podría permitir obtener alguna evidencia *in vitro* con respecto al efecto que podrían generar las variaciones de la composición del LCR hidrocefálico en el desarrollo cortical, lo cual fue extrapolado a partir de los efectos obtenidos en los cultivos de NE.

Las NE (4DIV) que fueron tratadas con LCR de ratas H-Tx normal e hidrocefálico, adicionado al medio de cultivo, presentaron desagregación de las células que las componen, esto se observó en NE obtenidas a partir de ratas hidrocefálicas y en NE obtenidas a partir de ratas normales (**Figura 26**). Estas células libres

comenzaron a migrar y crecer (**Figura 26**). Este efecto de desagregación de las células que componen las NE también fue observado en el tratamiento con suero de bovino fetal (SBF), el que fue utilizado como control (**Figura 26**). Los estudios histológicos realizados a las células disgregadas en estos cultivos, demostraron que estas células correspondían a neuronas (**Figura 27B**) y astrocitos (inserto **Figura 27C**).

Si bien las NE obtenidas desde la ZSV, tanto de animales normales como hidrocefálicos, lograron disgregarse y diferenciarse, al ser tratadas con LCR de ratas H-Tx normal o hidrocefálico, o suero, fue evidente la existencia de diferencias entre el número de neuritas y la longitud de estas, entre las neuronas diferenciadas a partir de cultivos tratados con LCR de animales normal o hidrocefálico.

Las evidencias fotográficas obtenidas a través de inmunocitoquímica con β III tubulina, permitió evaluar la génesis de neuritas en cuanto a número y longitud de neuritas primarias.

El número de neuritas primarias generadas en las células disgregadas a partir de NE provenientes de animales hidrocefálicos, fue siempre mayor que las que se generaron en las células disgregadas desde cultivos de NE provenientes de animales normales, ya fuesen tratadas con LCR de ratas H-Tx normal o hidrocefálico. (**Figura 28A**). Neuronas diferenciadas a partir de NE que provenían de animales normales o hidrocefálicos, las que fueron tratadas con LCR (normal o hidrocefálico), generaron un menor número de neuritas que las observadas en neuronas cuando el tratamiento se realizó con SBF (control) (**Figura 28A**). Las células disgregadas de NE provenientes de animales normales tratadas con LCR de CM de ratas H-Tx hidrocefálicas generaron un mayor número de neuritas que las tratadas con LCR de CM de ratas H-Tx normal, esta

diferencia no fue observada en células disgregadas de NE provenientes de animales hidrocefálicos. En general el LCR de CM de animales hidrocefálicos generó siempre, en todas las células diferenciadas a partir de NE un mayor número de neuritas primarias, en relación a la cantidad de neuritas observadas cuando se agregó al medio LCR de VL de animales hidrocefálicos.

Neuritas generadas en células disgregadas de NE obtenidas de animales hidrocefálicos fueron siempre de mayor longitud que las obtenidas en las células de NE proveniente de animales normales, sin importar la condición experimental (**Figura 28B**). Por otro lado, fue evidente que la longitud de las neuritas de las células disgregadas de NE tratadas con LCR siempre fue inferior a la longitud de las neuritas de las células provenientes de las NE tratadas con SBF (controles).

Solo en las células disgregadas provenientes de NE obtenidas de animales hidrocefálicos se observaron diferencias cuando fueron tratadas con LCR proveniente de CM de animales normales y animales hidrocefálicos. Las NE cultivadas con LCR hidrocefálico (CM), presentaron células con neuritas de mayor longitud a las observadas en las células de las NE tratadas con LCR de CM de animales normal, (**Figura 28B**). En estos resultados fueron omitidos los datos de LCR hidrocefálico de VL por dificultades técnicas en el momento de su realización.

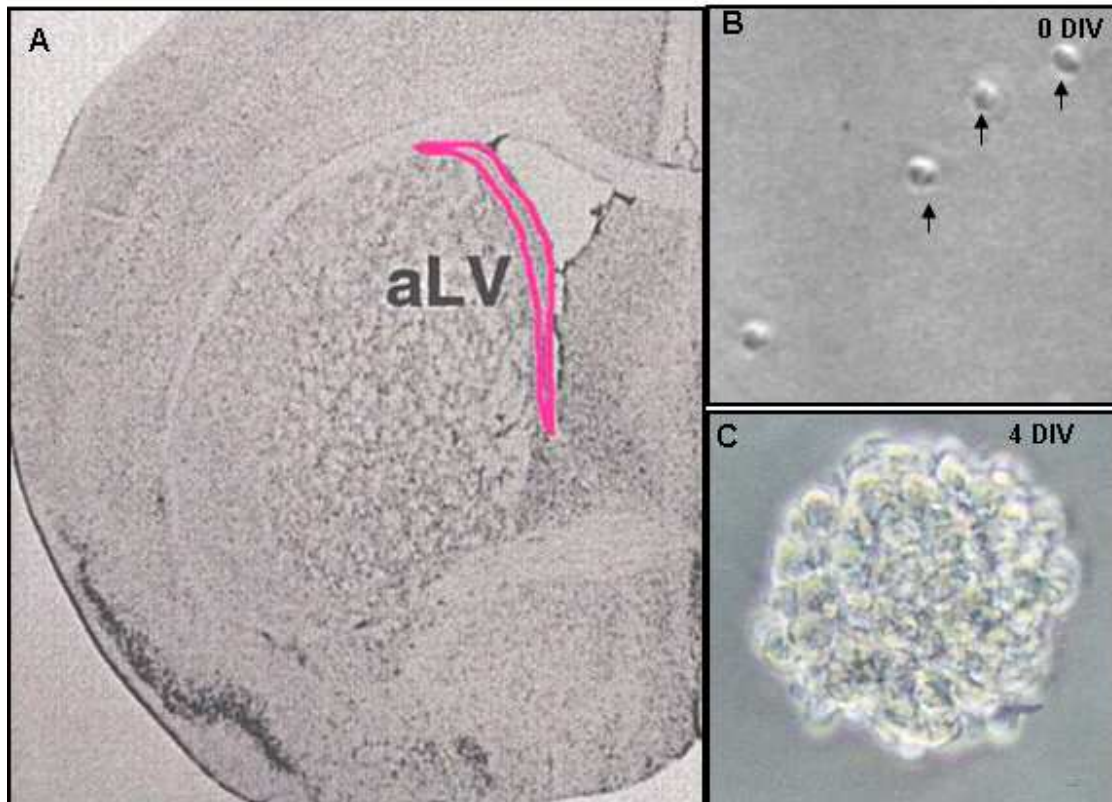


Figura 25: Obtención de neuroesferas a partir de la pared de los VL de rata H-Tx normales e hidrocefálicas de PN7. A: corte de cerebro de rata en que se muestra la zona utilizada para la obtención de neuroesferas (línea roja). **B:** Neuroesferas en el estadio de cero divisiones (flechas). **C:** Detalle de una neuroesfera en el estadio de cuatro divisiones.

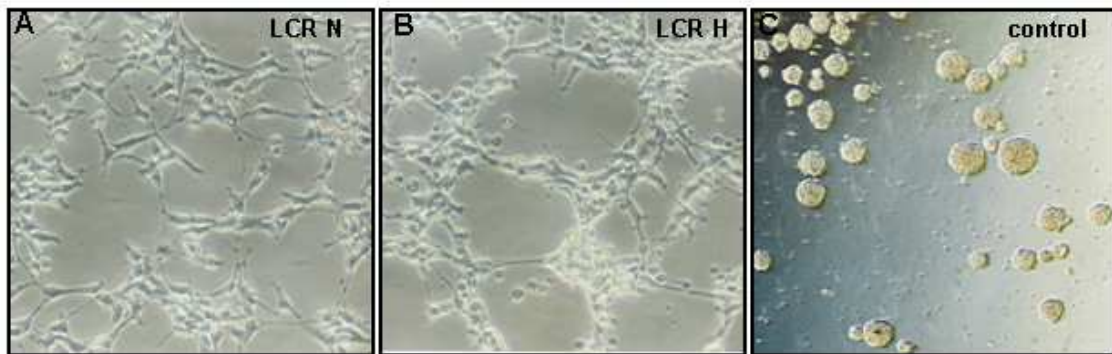


Figura 26: Neuroesferas de de rata H-Tx (4DIV) tratadas con LCR de ratas H-Tx normales e hidrocefálicas por dos días **A:** Neuroesferas obtenidas de ratas H-Tx normales y tratadas con LCR normal de PN 7 se observa la desagregación de las neuroesferas. **B:** Neuroesferas tratadas con LCR ventricular de ratas hidrocefálicas de PN 7. al igual que en A se observa disgregación de las células. **C:** Grupo control al que no se le adicionó LCR en el medio de cultivo.

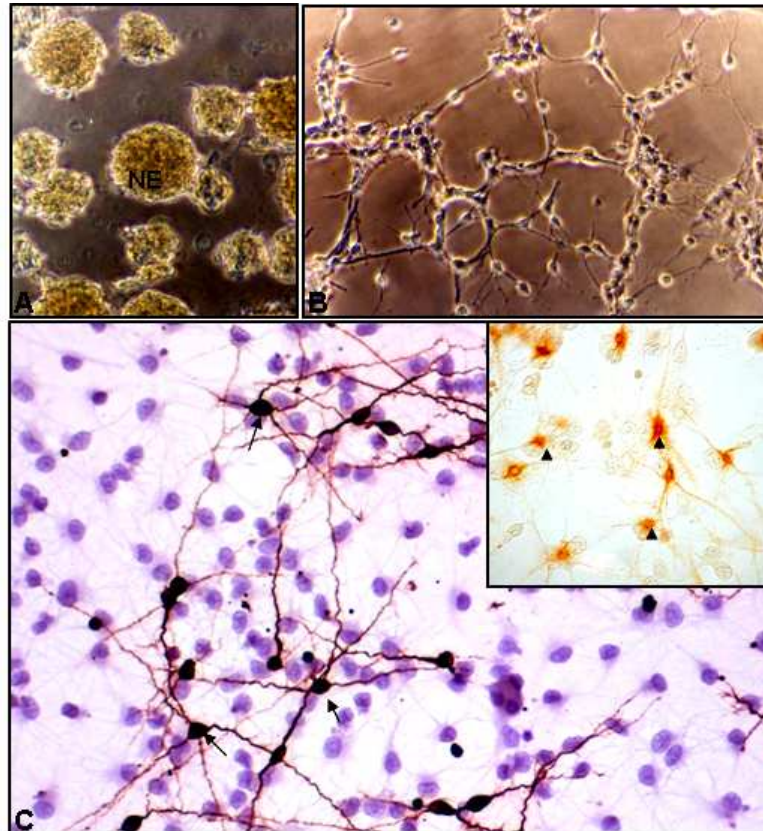


Figura 27: Análisis de las células originadas a partir de las neuroesferas tratadas con LCR. **A:** Neuroesferas en cultivo de 4 DIV, que han adquirido forma esférica. **B:** neuroesferas tratadas con LCR de ratas H-Tx normal, se observa su disgregación. **C:** Inmunocitoquímica de los cultivos utilizando el anticuerpo anti- β III tubulina, que muestra la presencia de neuronas (flechas). **Inserto:** muestra células GFAP positivas también presentes en el cultivo (cabeza de flechas).

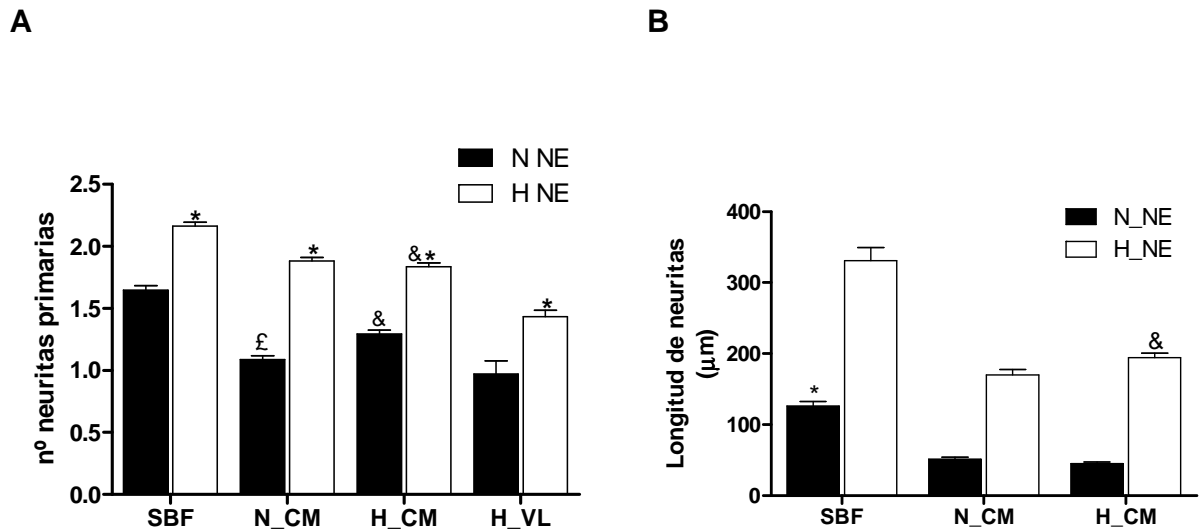


Figura 28. Evaluación de génesis de neuritas a partir de cultivos de neuroesferas diferenciadas. A partir de los datos obtenidos de inmunocitoquímica de cultivos de neuroesferas diferenciadas, se evaluó la cantidad de neuritas primarias y el largo de las neuritas. A: número de neuritas primarias generadas por neuronas provenientes de cultivo de NE diferenciadas. Se indican los tratamientos utilizados para NE provenientes de animales normales e hidrocefálicos. B: longitud de las neuritas generadas por neuronas provenientes de la disgregación y diferenciación de neuroesferas con los tratamientos descritos. &: diferente respecto a las NE tratadas con LCR de VL de animales hidrocefálicos; *: diferente respecto a los cultivos de NE normales con el mismo tratamiento; £: diferente respecto a las NE normal tratadas con LCR de CM de animales hidrocefálicos. CM: cisterna Magna; VL: ventrículo lateral; N: normal; H: hidrocefálico; NE: neuroesferas; SBF: suero bovino fetal.

5. DISCUSIÓN

La hidrocefalia congénita es una patología que afecta a 1-3 por cada 1000 niños nacidos vivos. Sin embargo, no existe información sobre que porcentaje de ellos fueron originados por defectos heredables y cuales lo fueron por agentes ambientales que pudieron inducir problemas en el desarrollo del feto. Debido a su naturaleza compleja y múltiples etiologías, la patogénesis de la hidrocefalia no ha sido explicada completamente. La utilización de modelos animales ha contribuido a la comprensión de la etiología de esta enfermedad. Estudios realizados en los ratones mutantes *hyh* han planteado que un daño inicial en células endimarias conduce al desarrollo de hidrocefalia. El desprendimiento masivo de las células endimarias que tapizan las paredes ventrales y algunas zonas de las paredes dorsales de los ventrículos observado en el mutante *hyh* (Jiménez *et al*, 2001; Wagner *et al*, 2003), no sería consecuencia del aumento de la presión intracraneal. Se ha descrito que este denudamiento del epéndimo ciliado es programado en el tiempo y en el espacio, comenzando tempranamente en el periodo embrionario (E12) y terminando durante los primeros días de la vida post-natal (Pérez-Fígares *et al*, 1998; Jiménez *et al*, 2001). Las alteraciones tanto morfológicas como funcionales que se ha observado en el OSC (células endimarias secretorias) de ratones *hyh*, y que antecederían al desarrollo de hidrocefalia, refuerzan esta idea. De este modo, el uso de animales que desarrollan hidrocefalia son importantes por entregar datos relevantes respecto de los mecanismos involucrados en la patogenia de la hidrocefalia, y en el caso de animales con hidrocefalia congénita indicar cuales serían los defectos primarios en la hidrocefalia,

incluso antes de iniciar la dilatación ventricular, principal característica de esta patología.

5.1 La rata H-Tx como modelo de estudio para hidrocefalia

La rata H-Tx es un mutante que desarrolla hidrocefalia congénita. Esta cepa deriva de una colonia de ratas albinas y es mantenida por la cruce entre hermanos (Kohn *et al*, 1981). Su forma de herencia aún se encuentra en discusión (Cai *et al*, 2000). La incidencia de hidrocefalia obtenida en estas ratas varía de un 30 a un 50% entre los diferentes reportes publicados, lo que ha hecho sospechar de factores epigenéticos involucrados en la expresión fenotípica de la hidrocefalia en estos animales (Jones *et al*, 2004). También la frecuencia de nacimiento de animales hidrocefálicos cambia dependiendo del número de pariciones de la rata, aumentando la posibilidad de tener crías hidrocefálicas mientras más pariciones haya tenido la rata en cruce (Jones *et al*, 2000). Esta característica también fue observada en este estudio, encontrando un aumento en el porcentaje de crías hidrocefálicas a partir de la tercera parición en la colonia de ratas H-Tx mantenida por nuestro laboratorio (datos no mostrados).

La rata H-Tx es un modelo espontáneo de hidrocefalia que está siendo utilizado por varios grupos de investigadores para estudiar los mecanismos moleculares de la hidrocefalia y desórdenes del LCR. En las ratas H-Tx hidrocefálicas, las primeras manifestaciones clínicas comienzan en E18, día en el que se observa dilatación ventricular. Hallazgos histológicos indican que previo a la dilatación ventricular se

produce una estenosis muy extrema del AS¹, que funcionalmente se comporta como obliteración (Jones *et al*, 2001). Las manifestaciones que afectan a las crías pueden ser variables en cuanto al grado de severidad de la dilatación ventricular. Se ha sugerido que el fenotipo encontrado en las ratas H-Tx se asemeja a lo encontrado en los cerebros de humanos con desórdenes congénitos del LCR, como bloqueo del AS, aumento de la presión intracraneal y dilatación ventricular (Johanson y Jones, 2001). Considerando lo señalado anteriormente y el hecho de que la rata por su tamaño nos permite la obtención de volúmenes considerables de LCR, la consideramos como un buen modelo animal para realizar estudio de proteómica del LCR hidrocefálico.

5.2 Hidrocefalia en ratas H-Tx asociada a la agenesia del OSC

Alteraciones morfológicas severas en el OSC han sido descritas en diferentes modelos de animales que desarrollan hidrocefalia. Alteraciones que precederían al inicio de la hidrocefalia (Estivill-Torrús *et al*, 2001; Blackshear *et al*, 2003; Jones *et al*, 1993; Pérez-Fígares *et al*, 2001, Baas *et al*, 2006; Lang *et al*, 2006; Fernández-Llébrez *et al*, 2004; Vio, 2004).

¹ Ortloff y Rodríguez 2007 en presentación del 51th Annual Meeting of the Society for Research into Hydrocephalus and Spina Bífida, con el trabajo titulado “**Mechanism of obliteration of Sylvius aqueduct in the H-Tx rat**”

5.2.1 Una alteración primaria del complejo OSC-FR sería parte del mecanismo que conduciría al desarrollo de hidrocefalia en las ratas H-Tx.

Una revisión temporal del desarrollo del OSC en la rata H-Tx normal, indica que este comienza a diferenciarse a partir de E15, con la presencia de las primeras células inmunorreactivas al AFRU (anticuerpos dirigidos contra la FR). En E17, las células endimarias del OSC muestran una fuerte inmunoreactividad al AFRU, sin embargo en el OSC de las ratas hidrocefálicas se ha observado una disminución en la inmunoreactividad al anticuerpo en E16 y en E17 una reducción en la población de células del OSC (Somera *et al*, 2004). Varios investigadores sugieren que la estenosis del AS y la dilatación ventricular serían eventos posteriores a la agenesia del OSC (Mashayekhi *et al*, 2002; Somera *et al*, 2004). La identificación en el presente estudio de solo la región rostral del OSC en las ratas H-Tx hidrocefálicas habla en favor de una alteración en el desarrollo normal del OSC. En estas ratas hidrocefálicas solo permanece la región más rostral del OSC la que sigue siendo inmunorreactiva al AFRU. Sin embargo, no se observó la formación de FR. Los estudios realizados en estadios embrionarios en la rata H-Tx², refuerzan fuertemente la idea que una alteración en el complejo OSC-FR estaría involucrada en la patogenia de la hidrocefalia de la rata H-Tx. Estos investigadores observaron que algunos embriones de ratas H-Tx en E18 presentaban desorganización de las células endimarias de la región media del OSC, células que no mostraron inmunoreactividad al AFRU. Estos mismos investigadores

² Ortloff y Rodríguez 2007 en presentación del 51th Annual Meeting of the Society for Research into Hydrocephalus and Spina Bifida, con el trabajo titulado “**Mechanism of obliteration of Sylvius aqueduct in the H-Tx rat**”

igualmente mostraron que esta zona es la que posteriormente se ve involucrada en la estenosis del AS. Estos hallazgos se complementan en gran medida con lo observado en la presente Tesis, sugiriendo que el tercio anterior del OSC que permanece en estadios postnatal temprano (PN 1 y 7) y adulto (PN30), es producto de un daño en el desarrollo del OSC y no del proceso hidrocefálico.

El análisis inmunocitoquímico del complejo OSC-FR realizado en las ratas H-Tx hidrocefálicas permitió además, determinar que estos animales presentan alteraciones del complejo OSC-FR muy similares a las descritas en ratas que desarrollan hidrocefalia como consecuencia del bloqueo inmunológico de las glicoproteínas secretorias del OSC por transferencia materna de anticuerpos anti-FR (Vío, 2004) y de los ratones *hyh* hidrocefálicos (Wagner *et al*, 2003). En las ratas H-Tx hidrocefálicas también se observó escaso material pre-FR en la zona apical del OSC, agregados anómalos de material AFRU positivos en el tercer ventrículo y ausencia de FR. La identificación de material AFRU positivo en ratas H-Tx hidrocefálicas en lugares ectópicos rostrales al OSC sugiere fuertemente una alteración en la dinámica de circulación del LCR. Esta observación igualmente ha sido realizada en ratas con bloqueo inmunológico del OSC (Vío, 2004).

5.2.2 Alteración de la actividad secretoria del OSC de ratas H-Tx hidrocefálicas.

Diferentes estudios mediante la utilización de anticuerpos dirigidos contra la secreción del OSC, han podido determinar que el OSC es una glándula que se caracteriza por secretar glicoproteínas de alto peso molecular. Nualart *et al* (1991) han descrito en el OSC de bovino la presencia de tres compuestos AFRU-positivos, los que

tienen un tamaño aproximado de 540, 450 y 320 kDa. Hoyo-Becerra *et al* (2006), utilizando este mismo anticuerpo en el estudio del OSC de pollo, identificaron solo un compuesto de 540 kDa. Por otro lado, estudios realizados con AFRU en OSC de rata y ratón, han permitido identificar a lo menos cuatro compuestos inmunorreactivos de 630, 450, 390 y 320 kDa, existiendo, además, en el caso de la rata un compuesto adicional de 200 kDa (Vío *et al*, 2008).

En la presente Tesis se han identificado las glicoproteínas secretorias del OSC de rata H-Tx (520, 450, 390, 320 y 200 kDa), las cuales difieren en el tamaño de uno de los compuestos con lo ya publicado para la especie murina. Mediante estudios de inmunoblot de extractos de OSC de rata H-Tx normal se logró identificar un polipéptido de 520 kDa en extractos de OSC que es inmunorreactivo al AFRU. Sin embargo, de acuerdo a Vío *et al* (2008), el polipéptido de mayor tamaño pesquisado en el OSC de rata es de 630 kDa. Tal discrepancia podría deberse a que las cepas son diferentes, en el estudio de Vío *et al* (2008) se utilizó la cepa de ratas Sprague-Dawley, por lo que es probable que exista algún tipo de variaciones entre estas dos ratas. Cabe señalar que ya se han reportado diferencias entre la rata H-Tx normal y otras cepas, como la Wistar, en que se han encontrado diferencias de 12 ± 24 horas en las edades gestacionales, mostrando la Wistar un peso y parámetros histológicos similares un día antes que la rata H-Tx (Owen-Lynch *et al*, 2003). En la presente Tesis si bien no se analizaron extractos de OSC de ratas Sprague-Dawley, sí fueron analizadas algunas muestras de LCR provenientes de estas ratas. En tal estudio se observó que la inmunoreactividad de algunos compuestos al AFRU era mayor a los observados en las ratas H-Tx normal de la misma edad, sugiriendo fuertemente un desfase en el desarrollo de las H-Tx en

relación a la ratas Sprague-Dowley, por lo cual no resulta extraño lo observado con respecto al PM de las proteínas presentes en los extractos de OSC.

En las ratas H-Tx hidrocefálicas a pesar que su OSC queda reducido solo a la región más rostral, este es capaz de sintetizar los mismos cuatro compuestos que un OSC completo. Sin embargo, existe una disminución en la inmunoreactividad de los compuestos al AFRU indicando una menor cantidad de las glicoproteínas sintetizadas por el OSC hidrocefálico. Los siguientes hallazgos hablan a favor de una alteración en la actividad secretoria del OSC de la rata H-Tx hidrocefálica: i) escaso material pre-FR en la región apical de las células endimarias del OSC, ii) ausencia de FR, iii) presencia de agregados de material AFRU-positivos que no forman una verdadera FR, iv) presencia de un compuesto adicional de 430 kDa en el LCR cisternal de embriones hidrocefálicos y v) aumento del compuesto de 200 kDa en el LCR hidrocefálico. Existen diferentes estudios que sugieren un rol relevante de las glicoproteínas del OSC en la mantención de un AS normal (Overholzer *et al*, 1954; Vío *et al*, 2000; 2004). La inmunoneutralización de las glicoproteínas secretorias del OSC por transferencia de anticuerpos anti-FR se traduce en crías sin FR, estenosis del AS e hidrocefalia (Vío *et al*, 2000). Así, **la alteración del complejo OSC-FR en la rata H-Tx podría ser la responsable de la estenosis de AS y posterior hidrocefalia.**

5.3 Análisis proteómico del LCR de ratas H-Tx hidrocefálicas.

El análisis proteómico del LCR ha cobrado gran valor en los últimos años, tanto en clínica como en investigación. La principal herramienta utilizada en este tipo de análisis es la electroforesis bidimensional, la que logra una alta resolución ya que

permite separar muestras complejas de proteínas en función de la carga, seguida por una separación en función de su masa molecular (O'Farrel, 1974).

El análisis de la proteómica del LCR resulta importante, por que cambios en su composición surgen como consecuencia de procesos patológicos del SNC. En general, la mayoría de los trabajos en que se ha utilizado esta técnica tienen relación con el análisis de LCR humano en patologías como hidrocefalia, Alzheimer, esclerosis múltiple, entre otros (Finehout *et al*, 2004, Li *et al*, 2006; Sihibom *et al*, 2004).

5.3.1 Reproducibilidad de geles 2D-PAGE de LCR

En el análisis de las muestras de LCR fue necesario utilizar un *pool* de muestras debido a que se necesitan grandes volúmenes para alcanzar una concentración de proteínas adecuadas para que la técnica fuese reproducible. Nuestros resultados en 2D-PAGE presentaron un alto grado de reproducibilidad en cuanto a la distribución general de *spots* en el gel, donde fue posible observar y detectar *spots* iguales en diferentes geles, lo cual nos hizo sugerir que se trata de las mismas proteínas. Los trabajos realizados utilizando esta técnica, permitieron identificar por lo general compuestos bajo los 150 kDa, en esta Tesis se presentan *spots* con masa molecular superior a 150 kDa, siendo algunos de ellos expresados diferencialmente entre LCR de animales normal e hidrocefálico y algunos de ellos se pueden asociar a la secreción del OSC debido a su reactividad con AFRU. Por otra parte, a pesar de no contar con *software* adecuados para la comparación de los mapas proteómicos, logramos identificar 40 *spots* presentes en todos los geles 2D-PAGE generados, los que varían solamente según la condición analizada (normal o patológica).

5.3.2 Cambios en la proteómica del LCR de ratas H-Tx hidrocefálicas

La composición del LCR va cambiando a medida que avanza en su circulación por el sistema ventricular. Se ha propuesto que la composición del LCR proveniente de CM sería una sumatoria de los compuestos secretados a nivel de los VL, tercer y cuarto ventrículo, los cuales derivarían principalmente de los plexos coroideos, parénquima cerebral y del propio OSC (Miyayama *et al*, 2003). En nuestro análisis del LCR, utilizamos muestras de CM y VL de animales hidrocefálicos y los comparamos con LCR de CM de animales normales. Aún cuando en condición normal el LCR de CM y VL poseen una composición diferente (Miyayama *et al*, 2003; Zappoterra *et al*, 2007), el análisis proteómico del LCR de VL obtenido de un animal hidrocefálico, entrega información única, pues es este LCR el que está en contacto con el neuroepitelio durante el desarrollo. (Mashayekhi *et al*, 2002). Frente a este hecho resultaron interesantes las variaciones que observamos en la presente Tesis en el proteoma del LCR ventricular de las ratas H-Tx hidrocefálicas. Varios de los cambios estarían relacionados directamente con la severidad de la hidrocefalia. Los estudios mediante inmunoblot utilizando AFRU mostraron que al aumentar el grado de hidrocefalia se logran detectar compuestos no detectados en condiciones menos severas de la enfermedad.

Si tenemos en consideración la normal circulación del LCR, los cambios del LCR ventricular en la rata H-Tx podrían tener incidencia directa en las diferencias observadas en el normal desarrollo del neuroepitelio de los VL. En tanto, el LCR cisternal, el cual accede al espacio subaracnoideo, podría ser considerado al evaluar el desarrollo cortical.

Aún cuando en esta Tesis no se realizaron estudios de espectrometría de masas, lo que nos permitiría obtener la secuencia de los *spots* que presentan diferencias en el LCR hidrocefálico, consideramos que las principales diferencias del LCR hidrocefálico están dadas por proteínas sobre 100 kDa. Avaladas por referencias bibliográficas referentes a la proteómica del LCR (Merched *et al*, 1998; Parada *et al*, 2005; Lanfon-Cazal *et al*, 2003; Puchades *et al*, 2003; Finehout *et al*, 2004) sugerimos proteínas candidatas que estarían alteradas, entre ellas las glicoproteínas del OSC (ver punto 5.6).

5.4 La variación en la composición proteica del LCR hidrocefálico estaría asociada a cambios en las glicoproteínas secretadas por el OSC.

Diversos estudios, en diferentes especies (aves y mamíferos), han demostrado que el OSC, principalmente durante la etapa embrionaria secreta glicoproteínas que permanecen solubles en LCR (Hoyo-Becerra *et al*, 2006; Vío *et al*, 2008). En la rata, la FR (forma condensada de las glicoproteínas secretadas por el OSC) no se forma sino hasta el día 6 después del nacimiento (Shoebitz *et al*, 1993). La identificación de polipéptidos reactivos al AFRU en el LCR en estadíos postnatales tardíos como en PN30, apoyan la idea propuesta por Vío *et al* (2008) de que cuando la FR ya se ha formado, existiría un estado de equilibrio entre las glicoproteínas solubles y las que forman parte de la FR.

Como se señaló anteriormente las principales diferencias encontradas en el LCR de rata H-Tx hidrocefálica corresponden a proteínas de alto peso molecular. Mediante

los estudios de inmunoblot en geles de 2D utilizando AFRU pudimos identificar que algunas de estos *spots* correspondían a proteínas secretorias del OSC.

De los polipéptidos identificados en LCR de rata H-Tx, el de 200 kDa generó un interés particular, transformándola en una buena candidata para estudios más detallados. Esta glicoproteína ha sido detectada en FR, OSC y LCR de rata por lo que ha sido indicada como una proteína clave de la secreción del OSC (Vio *et al*, 2008). El polipéptido de 200 kDa se pesquisó en todas las edades analizadas, en LCR de ratas normal e hidrocefálico (CM y VL) y presentando una mayor concentración en LCR cisternal de ratas H-Tx hidrocefálicas. Tomando en cuenta que la concentración de proteínas totales en LCR cisternal no muestra diferencias entre LCR de animales normal e hidrocefálico (presente Tesis y Miyan *et al*, 2003), resultó interesante observar que este compuesto se detectó en mayor concentración en LCR de CM de ratas hidrocefálicas. A través de 2D-PAGE fueron identificados dos compuestos AFRU-positivos con masa molecular cercana a los 200 kDa en LCR cisternal de ratas H-Tx normales (*spot* 2 y 4), mientras en LCR de VL de ratas H-Tx hidrocefálicas, sólo fue identificado un compuesto en este rango de masa molecular (*spot* 2), por lo tanto es muy probable que la diferencia en concentración que observamos entre LCR cisternal de animales normales y LCR de VL de animales hidrocefálicos en inmunoblot en una dimensión, tenga su origen en la pérdida de algunos compuestos inmunorrelacionados con la secreción del OSC y solubles en LCR. En este sentido, podemos especular que los compuestos ausentes en LCR de VL de animales hidrocefálicos sean secretados por las células de la porción medial o bien caudal del OSC, las que como ya discutimos, desaparecen en OSC de animales hidrocefálicos.

Si bien nuestras evidencias apuntan a que las glicoproteínas AFRU-positivas que cambian la composición del LCR hidrocefálico corresponderían a proteínas liberadas por el OSC, no se puede descartar la posibilidad de que alguna de las proteínas de alto peso molecular sean liberadas por la placa del piso (PP). Durante un período restringido del desarrollo del SNC, las células de la PP de algunas especies (peces, anfibios, aves y mamíferos) presentan fuerte reactividad con el AFRU (Rodríguez *et al*, 1996; López-Avalos *et al*, 1997; Yulis *et al*, 1998; Lichtenfeld *et al*, 1999). Hoyo-Becerra *et al* (2006) identificaron en LCR de embrión de pollo un compuesto de 540 kDa, este compuesto ha sido identificado como una forma precursora de las proteínas que secreta el OSC del pollo (Hoyo-Becerra *et al*, 2006). Del Brío *et al* (2000) identificaron un compuesto de similar peso molecular (540 kDa) mediante inmunoblot con AFRU, en extractos de PP y OSC, por lo tanto los compuestos de 390 y 320 kDa que identificamos en LCR embrionario de rata H-Tx podrían estar siendo secretados por la PP y el OSC embrionario en forma paralela, resulta clave analizar la presencia de estos compuestos en la PP de rata H-Tx.

El OSC secreta otros compuestos que no son inmunorreactivos con AFRU ni anti-p15, es el caso de transtirretina (TTR). Esta proteína es secretada principalmente por los plexos coroideos, sin embargo, se ha comprobado que también es secretada por células del OSC de bovino (Montecinos *et al*, 2005). TTR actúa principalmente como intermediario en el transporte de hormonas tiroideas y retinol (retinol o vitamina A). TTR ha sido involucrada en neuropatías amiloidóticas, en las cuales la mutación genética en el cromosoma 18q11,2-q12,1 genera una proteína mutante que se deposita como amiloide en diferentes órganos. Un aumento en su concentración se ha

relacionado con el envejecimiento (Merched *et al*, 1998), aunque aún es discutido, pues otras publicaciones afirman que esta proteína disminuye su concentración en LCR como efecto del envejecimiento. En nuestros análisis de LCR, observamos que TTR aumenta su concentración en LCR de VL de ratas H-Tx hidrocefálicas (corroborado mediante 2D-PAGE con tinción con plata e inmunoblot). Es interesante que sólo en PN30 la diferencia en TTR de LCR de ratas H-Tx hidrocefálicas logre ser significativa y más aún que sólo una isoforma sea expresada diferencialmente, lo que indica que la variación en la concentración de TTR podría tener relación con la edad de la rata o con la severidad de la hidrocefalia, pues las ratas H-Tx analizadas de PN30 sufrían de hidrocefalia severa. En los análisis proteómicos realizados sobre muestras de LCR de pacientes hidrocefálicos, principalmente recién nacidos, ha sido identificado por nuestro grupo de trabajo, el aumento en la concentración de algunas de las isoformas de TTR en LCR de pacientes hidrocefálicos.

5.5 ¿Existe una vía compensatoria de circulación del LCR en la rata H-Tx hidrocefálicas?

Dada la circulación del LCR es de suponer que la concentración de proteínas aumenta a medida que avanza en su circulación (Miyan *et al*, 2003). En relación a este hecho, resulta controversial pesquisar en el LCR de la CM de ratas hidrocefálicas un patrón similar de compuestos AFRU-positivos que el observado en el LCR de CM de una rata normal, teniendo en cuenta que la circulación entre el AS y cuarto ventrículo en la rata hidrocefálica se vería afectada por la estenosis del AS. Para explicar este fenómeno podríamos manejar dos alternativas: a) la existencia de una ruta de

circulación alterna (compensatoria) que derive las proteínas desde los VL y tercer ventrículo hacia el cuarto ventrículo y b) la existencia de una estructura cerebral distal al AS, que está secretando material AFRU positivo hacia el LCR. Respecto de la primera proposición, se reconocen en la circulación del LCR dos vías, denominadas vía mayor (comienza en los VL y continua por el tercer y cuarto ventrículo) y vía menor (incluye el paso del LCR por el epéndimo ventricular, espacio perivascular e intersticial y canales linfáticos perineurales) (Oi *et al*, 2006). Considerándose importante la comunicación entre ambas para el mantenimiento de la homeostasis del cerebro. La identificación de material agregado AFRU-positivo en lugares ectópicos del tercer ventrículo sugiere que en la rata H-Tx hidrocefálica existiría una alteración en la dinámica de circulación del LCR. Esto podría generar un cambio en la relación entre ambos tipos de circulación, originando el predominio de una en desmedro de la otra, instaurándose la menor como una vía compensatoria. La posibilidad de vías de absorción compensatorias ya ha sido investigada. En ratas inyectadas con kaolina, se ha establecido que pese al cierre del AS, el LCR logra avanzar desde el tercer al cuarto ventrículo, e incluso, circular a través del espacio subaracnoideo espinal y entre los hemisferios cerebrales (Voelz *et al*, 2007). Sin embargo, la activación de una vía compensatoria, no explica por qué encontramos algunos polipéptidos en mayor concentración en LCR cisternal de animales hidrocefálicos, por lo tanto la segunda proposición de una segunda estructura secretora de compuestos inmunorreactivos al AFRU podría estar actuando. Una candidata de acuerdo a estas características es la PP. Se ha descrito que esta glándula secreta material inmunorrelacionado con el OSC hacia el LCR (Rodríguez *et al*, 1996). La presencia de los mismos compuestos en LCR de animales normal e hidrocefálico de

CM podría ser explicado por una secreción activa de tal estructura pero sólo en etapa embrionaria, pues luego del nacimiento esta estructura experimenta un retroceso, debido a que las células de la PP entran en apoptosis (Del Brío *et al*, 2001), lo que la elimina como posible fuente de polipéptidos tipo AFRU en etapa postnatal.

Debido a que el aumento en la inmunorreacción de algunos de los compuestos inmunorrelacionados con la secreción del OSC (compuesto de 200 kDa), ha sido encontrado principalmente en LCR de ratas H-Tx de PN7, es probable que este aumento tenga igualmente su origen en la no formación de FR en las ratas hidrocefálicas, permaneciendo solubles en el LCR. Considerando los antecedentes antes expuestos creemos que sería interesante a futuro analizar la posibilidad de la existencia de vías compensatoria de circulación del LCR en la hidrocefalia. Ya que esto podría además entregar información de cómo ratas H-Tx con hidrocefalia severa son capaces de vivir más que otras con el mismo grado de dilatación ventricular.

5.6 ¿Existen otras proteínas candidatas que alteran la composición del LCR hidrocefálico?

Del análisis de los geles 2D-PAGE teñidos con plata, surgió una gama de variaciones no atribuidas a glicoproteínas secretadas por el OSC. Tales diferencias fueron observadas en los spots 1, 3, 32, 33, 38 y 39.

De estos, el *spot* 32 generó gran interés, pues mostró variaciones consistentes en las tres edades en análisis. De acuerdo a proteomas de LCRs publicados, de humano, rata y pollo (Merched *et al*, 1998; Parada *et al*, 2005; Lanfon-Cazal *et al*, 2003; Puchades *et al*, 2003; Finehout *et al*, 2004) se han identificado *spots* con un

tamaño y pI similar al *spot* 32 como apoE. Resulta de gran interés la identificación de este *spot* por la relevancia de este compuesto en la modulación del desarrollo de neuritas y plasticidad sináptica (Parada *et al*, 2005). Además, una alteración en su expresión han sido asociadas a patologías como el Alzheimer. La identificación de este *spot* podría ser abordada a futuro a través de inmunoblot de geles de 2D utilizando un anticuerpo anti-apoE o a través de la secuenciación de este *spot*.

5.7 Desarrollo cortical en ratas H-Tx. Aproximación a través del cultivo de neuroesferas.

Diversos estudios plantean que la zona subventricular (ZSV) y el giro dentado (GD) del hipocampo son lugares importante de neurogenesis (Gage, 2000). Se ha sugerido que estas células se encontrarían en un microambiente con factores que estimulan la mitosis. Estas células progenitoras pueden ser aisladas y mediante cultivos *in vitro* en presencia de los medios apropiados son capaces de proliferar y generar estructuras esféricas denominadas neuroesferas (NE) (Reynolds *et al*, 1992).

En el presente trabajo el cultivo *in vitro* de NE provenientes de ratas H-Tx normales e hidrocefálicas en presencia de LCR, confirma que las células progenitoras provenientes de ratas hidrocefálicas tiene intacto su potencial proliferativo. Esta proposición se encuentra apoyada por la presencia de proliferación y neurogénesis en NE provenientes de ratas hidrocefálicas tratadas con LCR normal. Estos resultados juntos a los obtenidos por Owen-Lynch *et al* (2003) y Mashayekhi *et al* (2002) en la rata H-Tx, avalan fuertemente la hipótesis de que **el daño cortical observado en esta rata hidrocefálica, sería producto de la composición del LCR hidrocefálico y no por un**

daño en la capacidad proliferativa del neuroepitelio. El estudio *in vitro* del efecto del LCR de animales hidrocefálicos (VL) sobre el desarrollo cortical realizado en la presente Tesis refuerza esta hipótesis. El LCR de animales hidrocefálicos (VL) tuvo un efecto inhibitorio en la proliferación de células diferenciadas a partir de las NE. Además el tratamiento con este LCR ocasionó la disminución en la génesis de neuritas de las neuronas generadas a partir de NE obtenidas de animales normales como de los provenientes de animales hidrocefálicos. Esto nos hace sugerir que el efecto del LCR hidrocefálico, no sólo sería negativo para el proceso de proliferación, sino también, para el de diferenciación neuronal. Considerando los estudios de proteómica del LCR de la rata H-Tx que hemos realizado, creemos que con toda probabilidad el efecto negativo del LCR de animales hidrocefálicos es producto de la composición de éste. Esto es importante si se considera que durante el desarrollo la concentración de determinados compuestos son cruciales para un normal desarrollo del SNC. Por ejemplo, el aumento del TNF en el LCR conduce al desarrollo de hidrocefalia (Galbreath *et al*, 1995). Si bien un cambio en la concentración de componentes del LCR debido a la obstrucción del AS se han propuesto en la presente Tesis, por Owen-Lynch *et al* (2003) y Mashayekhi *et al* (2002) como el principal agente causal del daño cortical en la rata H-Tx, no se puede descartar que tal efecto sea resultado de nuevos compuestos presentes en el LCR de ratas H-Tx hidrocefálicas o ausentes en este. En nuestro estudios identificamos tanto proteínas propias del LCR de ratas hidrocefálicas (*spots* 38,39 y 40), como otras que están ausentes (*spots* 1, 4 y 12).

Aunque con LCR de VL de animales hidrocefálicos disminuyó la génesis de neuritas, el LCR de CM de animales hidrocefálico estimuló su génesis tanto en

neuronas provenientes de NE normales como en hidrocefálicas, aún más que el LCR de CM de animales normales. Las diferencias entre LCR ventricular y cisternal de animales hidrocefálicos se han determinado tanto a nivel de concentración de proteínas totales como a nivel de compuestos secretorios del OSC, por lo tanto esta nueva evidencia sugiere que la no presencia o disminución a niveles críticos en la concentración de algunas proteínas pueda generar la inhibición en el desarrollo de neuritas *in vitro*. Sin embargo, no se puede descartar la posibilidad de el aumento en la concentración de algunas proteínas, tales como el *spot* 32 y 33, puedan generar tal efecto inhibitorio. En esta Tesis se presenta por primera vez el efecto del LCR cisternal de ratas H-Tx hidrocefálicas sobre el cultivo de NE. En general el LCR de VL de ratas H-Tx hidrocefálicas ha sido utilizado de preferencia para los estudios *in vitro*. Nuestros hallazgos nos llevan a proponer que el aumento de algunas glicoproteínas secretorias del OSC podrían ser responsables del efecto del LCR de CM de animales hidrocefálicos. Tal efecto podría ser generado por un aumento de OSC-espondina, ya que péptidos derivados de esta proteína (correspondientes a la secuencia aminoacídica más conservada de un dominio TSR de OSC-espondina) tienen una potente actividad sobre el desarrollo de neuritas, siendo esta respuesta además, dosis dependiente de la concentración de este péptido (Gobron *et al*, 2000). Esto se apoya además en a) el aumento de la concentración del polipéptido de 200 kDa (con AFRU) y el de 320 y 145 kDa (con anti-p15) en LCR de CM de animales hidrocefálicos y la disminuyeron en LCR de VL de animales hidrocefálico (ambos respecto al valor en LCR normal) y b) ausencia del *spot* 4 en LCR hidrocefálico de VL.

Así en cultivo de NE con LCR cisternal de animales hidrocefálicos existe un aumento en la génesis de neuritas *in vitro*, mientras que con LCR de VL de animales hidrocefálicos ésta disminuye, respecto a lo observado en LCR normal. De esto se podría proponer la existencia de una correlación positiva entre la cantidad y concentración de compuestos inmunorrelacionados con la secreción del OSC solubles en LCR y la generación de neuritas. Si bien estos estudios son preliminares estimulan a realizar a futuro nuevos estudios para demostrar la real participación de las glicoproteínas OSC LCR-solubles sobre el desarrollo cortical. Además el estudio de la proteómica del LCR hidrocefálico sugiere la existencia de otras proteínas candidatas que podrían participar en este fenómeno. Creemos que la utilización en conjunto de la proteómica del LCR y cultivos de NE en presencia de LCR nos pueden entregar importante información para comprender el mecanismo que lleva al daño cortical en la hidrocefalia.

De acuerdo a los antecedentes presentados, podemos concluir que:

1. La concentración y composición de proteínas totales en el LCR de ratas H-Tx varía entre las edades analizadas, disminuyendo hacia la edad adulta.
2. En la rata H-Tx normal los compuestos inmunorelacionados con la secreción del OSC y soluble en LCR varían con la edad, disminuyendo su concentración y cantidad hacia la edad adulta.
3. Una alteración primaria en el OSC de ratas H-Tx llevaría a una modificación en la secreción de las glicoproteínas constitutivas de la FR, las que una vez liberadas al LCR no sufrirían un proceso normal de agregación, resultando ello en una permanente ausencia de FR.

4. Algunos de los *spots* que marcan diferencia entre el LCR de ratas H-Tx normal e hidrocefálico corresponden a compuestos secretados por el OSC. Estos *spots* corresponden a los *spots* 2, 4, 12 y 40.
5. El *spot* 37 que aumenta en el LCR de rata H-Tx hidrocefálica, con un tamaño aproximado de 14 kDa y pI 5-5,8 corresponde a transtirretina.
6. El LCR de CM de ratas H-Tx hidrocefálicas, que posee una mayor cantidad de compuestos LCR-solubles del OSC que el LCR de VL de la misma rata, estimula el desarrollo de neuritas de neuronas obtenidas de NE *in vitro*, mientras el LCR de VL de la misma rata inhibe tal desarrollo, existiendo una correlación positiva entre la inmunorreacción (concentración) y cantidad de compuestos LCR-solubles del OSC con el largo y número de neuritas generadas.

La individualización de las proteínas que varían en el perfil proteico del LCR hidrocefálico de rata H-Tx, y su potencial identificación a través de su secuenciación, representan un aporte importante al entendimiento del desarrollo de la patología a nivel molecular, lo que permitirá eventualmente lograr una mejor clasificación, diagnóstico, pronóstico y tratamiento (por medio de nuevos blancos terapéuticos) para niños que sufren de hidrocefalia congénita.

6. BIBLIOGRAFÍA

Baas D., Meiniel A., Benadiba C., Bonnafé E., Meiniel O., Reith W., Durand B. (2006). A deficiency in RFX3 causes hydrocephalus associated with abnormal differentiation of ependymal cells. *Eur. J. Neurosci.*, 24, 1020-1030.

Bannister C.M., Russell S.A., Rimmer S., Aurora A. (2000). Pre-natal ventriculomegaly and hydrocephalus. *Neurol. Res.*, 22, 37-42

Blackshear P.J., Graves J.P., Stumpo D.J., Cobos I., Rubenstein J.L., Zedlin D.C. (2003). Graded phenotypic response to partial and complete deficiency of a brain-specific transcript variant of the winged helix transcription factor Rfx4. *Development.*, 130, 4539-4552.

Bradford M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of micrograms quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72, 248-254.

Cai X., McGraw G., Pattisapu J., von Kalm L., Willingham S., Socci D., Gibson J. (2000). Hydrocephalus in the rat H-Tx: A monogenic disease?. *Exp. Neurol.*, 163, 131-135.

Creveaux I., Gobron S., Meiniel R., Dastugue B., Meiniel A. (1998). Complex expression pattern of the SCO-spondin gene in the bovine subcommissural organ: toward an explanation for Reissner's fiber complexity?. *Mol. Brain Res.*, 55, 45-53.

Del Brío M.A., Riera P., Muñoz R.I., Montecinos H., Rodríguez E.M. (2000). The metencephalic floor plate of chick embryos expresses two secretory glycoproteins homologous with the two glycoproteins secreted by subcommissural organ. *Histochem. Cell Biol.*, 113, 415-426.

Del Brío M.A., Riera P., Peruzzo B., Rodríguez E.M. (2001). Hindbrain floor plate of the rat: ultrastructural changes occurring during development. *Microsc Res Tech.*, 52, 615-626.

Dziegielewska K.M., Knott W.G., Saunders N.R. (2000). The nature and composition of internal environment of the developing brain. *Cell Mol. Neurobiol.*, 20, 41-56.

Estivill-Torrús G., Vitalis T., Fernández-Llebrecz P., Price D.J. (2001). The transcription factor Pax6 is required for development of the diencephalic dorsal midline secretory radial glia that form the subcomisural organ. *Mech Dev.*, 109, 215-224.

Fernández-Llebrecz P., Grondona J.M., Pérez J., López-Aranda M.F., Estivill-Torrús G., Llebrecz-Zayas P.F., Soriano E., Ramos C., Lallemand Y., Bach A., Robert B. (2004). *Msx1*-Deficient mice fail to form prosomere 1 derivatives, subcommissural organ and

posterior commissure and develop hydrocephalus. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 63, 574-586.

Finehout E., Franck Z., Lee K. (2004). Towards two-dimensional electrophoresis mapping of the cerebrospinal fluid proteome from a single individual. *Electrophoresis.*, 25, 2564-2575.

Fishman R.A. (1992). Cerebrospinal fluid in disease of the nervous system. Philadelphia: WB Saunders Co, 1-42.

Gage F.H. (2000). Mammalian neural stem cells. *Science.*, 287, 1433-1438.

Galbreath E., Kim S.J., Park K., Brenner M., Messing A. (1995). Overexpression of TGF-beta 1 in the central nervous system of transgenic mice results in hydrocephalus. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 54, 339-349.

Gato A., Martín P., Alonso M.I., Martín C., Pulgar M.A, Moro J.A. (2004). Analysis of cerebrospinal fluid protein composition in early developmental stages in chick embryos. *J. Exp. Zool.*, 301, 280-289.

Gato A., Moro J.A., Alonso M.I., Bueno D., de la Mano A., Martin C. (2005). Embryonic cerebrospinal fluid regulates neuroepithelial survival, proliferation, and neurogenesis in chick embryos. *The anatomical record part A.*, 284A, 475-484.

Gobron S., Monnerie H., Meiniel R., Creveaux I., Lehmann W., Lamalle D., Dastugue B., Meiniel A. (1996). SCO-spondin: a new member of the thrombospondin family secreted by the subcommissural organ is a candidate in the modulation of neuronal aggregation. *J. Cell Sci.*, 109,1053–1061.

Gobron S., Creveaux I., Meiniel R., Didier R., Dastugue B., Meiniel A. (1999). SCO-spondin is evolutionarily conserved in the central nervous system of the chordate phylum. *Neuroscience*, 88, 655–664.

Gobron S., Creveaux I., Meiniel R., Didier R., Herbet A., Bamdad M., Bitar F., Dastugue B., Meiniel A. (2000). Subcommissural organ /Reissner's fiber complex: Characterization of SCO-spondin, a glycoprotein with potent activity on neurite outgrowth. *GLIA*, 32, 177-191.

González C. (2007). Participación del órgano subcomisural y el líquido cefalorraquídeo en la neurogénesis postnatal. Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias. Univ. Austral de Chile, 182pp.

Hoyo-Becerra C., López-Avalos M.D., Alcaide-Gavilán M., Gómez-Roldan M.C., Pérez J., Fernández-Llebrez P., Grondona J.M. (2005). Reissner's fiber formation depends on developmentally regulated factors extrinsic to the subcommissural organ. *Cell Tissue Res.*, 321, 429–441.

Hoyo-Becerra C., López-Ávalos M.D., Pérez J., Miranda E., Rojas-Ríos P., Fernández-Llebrez P., Grondona J.M. (2006). Continuous delivery of a monoclonal antibody against Reissner's fiber into CSF reveals CSF-soluble material immunorelated to the subcommissural organ in early chick embryos. *Cell Tissue Res.*, 326, 771-786.

Jiménez A.J., Tomé M., Páez P., Wagner C., Rodríguez S., Fernández-Llebrez P., Rodríguez E.M., Pérez-Fígares J. (2001). A programmed ependymal denudation precedes congenital hydrocephalus in the *hyh* mutant mouse. *JNEN*, 60(11), 1105-1119.

Johanson C., Jones H. (2001). Promising vistas in hydrocephalus and cerebrospinal fluid research. *Trends in Neurosciences*, 24, 631-632

Jones H.C. (1993). Physiology of cerebrospinal fluid circulation: amphibians, mammals, and hydrocephalus. En: Oksche A, Rodríguez E.M, Fernández-Llebrez P. (ed) The subcommissural organ. An ependymal brain gland: 243-253. Springer-Verlag, Berlin.

Jones H.C., Lopman B.A. (1998). The relation between CSF pressure and ventricular dilatation in hydrocephalic H-Tx rats. *Eur. J. Pediatr. Surg.*, Suppl 1, 55-58

Jones H., Lopman B., Jones T., Carter B., Depelteau J., Morel L. (2000). The expression of inherited hydrocephalus in H-Tx rats. *Child's Nerv. Syst.*, 16, 578-584.

Jones H.C., Depelteau J.S., Carter B.J., Lopman B.A., More L. (2001). Genome-wide linkage analysis of inherited hydrocephalus in the H-Tx rat. *Mammal. Genome.*, 12, 22-26.

Jones H., Totten C., Mayorga D., Yue M., Carter B. (2004). Genetic loci for ventricular dilatation in the LEW/Jms rat with fetal-onset hydrocephalus are influenced by gender and genetic background. *Cerebrospinal Fluid Research.*, 2: 2.

Kaiser G., Jones H.C. (1991). Cerebrospinal fluid pressure in 10-days-old rats with congenital hydrocephalus. *Eur. J. Pediatr. Surg.*, Suppl 1, 20-22.

Kohn D.F., Chinookoswong N., Chou S.M. (1981). A new model of congenital hydrocephalus in the rat. *Acta Neuropathol. (Berl)*, 54, 211-218.

Laemmli U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227,680-685.

Lanfon-Cazal M., Adjali O., Galéotti N., Poncet J., Jouin P., Homburger V., Bockaert J., Marin P. (2003). Proteomic analysis of astrocytic secretion in the mouse. *J. Biol. Chem.*, 278, 24438-24448.

Lang B., Song B., Davidson W., MacKenzie A., Smith N., McCaig C.D., Harmar A.J., Shen S. (2006). Expression of the human PAC1 receptor leads to dose-dependent hydrocephalus-related abnormalities in mice. *J. Clin. Invest.*, 116(7), 1924–1934.

Leonhardt H. (1980). Ependym und circumventriculare organe. En: Oksche A., Vollrath L., (ed) Handbuch der Mikroskopischen Anatomie des Menschen, Neuroglia I.: 177–665. Springer-Verlag, Berlin.

Li X., Miyajima M., Mineki R., Taka H., Murayama K., Arai H. (2006). Analysis of potential diagnostic biomarkers in cerebrospinal fluid of idiopathic normal pressure hydrocephalus by proteomics. *Acta Neurochir.*, 148, 859-864.

Lichtenfeld J., Viehweg J., Schützenmeister J., Naumann W. (1999). Reissner's substance expressed as a transient pattern in vertebrate floor plate. *Anat. Embryol.*, 200, 161-174.

López-Avalos M.D., Cifuentes M., Grondona J.M., Miranda E., Pérez J., Fernández-Llebrez P. (1997). Rostral floor plate (flexural organ) secretes glycoproteins immunologically similar to subcommissural organ glycoproteins in dogfish (*Scyliorhinus canicula*) embryos. *Dev. Brain Res.*, 102, 69-75.

Mashayekhi F., Draper C.E., Pourghasem M., Bannister C.M., Owen-Lynch P.J., Miyan J.A. (2002). Deficient cortical development in the hydrocephalic Texas (H-Tx) rat: a role for cerebrospinal fluid. *Brain*, 125,1859-1874.

McComb J.G. (1997). The cerebrospinal fluid, hydrocephalus, and cerebral edema. En: Davis R.L., Robertson D.M., (ed). *Textbook of neuropathology*: 225–251. Williams and Wilkins, Baltimore.

Meiniel A. (2001). SCO-spondin, a glycoprotein of the subcommissural organ/Reissner's fiber complex: evidence of a potent activity on neuronal development in primary cell cultures. *Microsc. Res. Tech.*, 52, 484–495.

Meiniel A., Meiniel R., Goncalves-Mendes N., Creveaux I., Didier R., Dastugue B. (2003). The thrombospondin type 1 repeat (TSR) and neuronal differentiation: roles of SCO-spondin oligopeptides on neuronal cell types and cell lines. *Int. Rev. Cytol.*, 230, 1–39.

Meiniel A. (2007). The secretory ependymal cells of the subcommissural organ: wich role in hydrocephalus? *The international Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 39, 463-468.

Merched A., Serot J.M., Visvikis S., Aguillon D., Faure G., Siest G. (1998). Apolipoprotein E, transthyretin and actin in the CSF of Alzheimer's patients : relation with the senile plaques and cytoskeleton biochemistry.

Miyan J.A., Mashayekhi F., Bannister C.M. (2001). Developmental abnormalities in early-onset hydrocephalus: clues to signaling. In *Symp. Soc. Exp. Biol.* England, 91-106.

Miyan J.A., Nabiyouni M., Zendah M. (2003). Development of the brain: a vital role for cerebrospinal fluid. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 81, 317-328.

Miyan J.A., Zendah M., Mashayekhi F., Owen-Lynch P. (2006). Cerebrospinal fluid supports viability and proliferation of cortical cells *in vitro*, mirroring *in vivo* development. *Cerebrospinal Fluid Res.*, 3, 2.

Monnerie H., Dastugue. B, Meiniel A. (1998). Effect of synthetic peptides derived from SCO-spondin conserved domains on chick cortical and spinal-cord neurones in cell cultures. *Cell Tissue Res.*, 293, 407-418.

Montecinos H.A., Richter H., Caprile T., Rodríguez EM. (2005). Synthesis of transthyretin by the ependymal cells of the subcommissural organ. *Cell Tissue Res.*, 320, 487-499.

Nualart F., Hein S., Rodríguez E.M., Oksche A. (1991). Identification and partial characterization of the secretory glycoproteins of the bovine subcommissural organ-Reissner's fiber complex. Evidence for the existence of two precursor form. *Brain Res. Mol. Brain Res.*, 11, 227-238.

O'Farrel P. (1974). High resolution two-dimensional electrophoresis of protein. *J. Biol. Chem.*, 250, 4007-4021.

Oi S., Rocco C. (2006). Proposal of "evolution theory in cerebrospinal fluid dynamics" and minor pathway hydrocephalus in developing immature brain. *Childs. Nerv. Syst.*, 22, 662-669.

Oksche A. (1993). Phylogenetic and conceptual aspects of the subcommissural organ. En: Oksche A., Rodríguez E.M., Fernández-Llebrez P. (eds) The subcommissural organ. An ependymal brain gland: 23-32. Springer-Verlag, Berlin.

Owen-Lynch P.J., Draper C.E., Mashayekhi F., Bannister C.M., Mian JA. (2003) Defective cell cycle control underlies abnormal cortical development in the hydrocephalic Texas rat. *Brain*, 126, 623-631.

Overholzer M.D., Whitley J.R., O'Dell B.L., Hogan A.G. (1954). The ventricular system in hydrocephalic rat brains produced by a deficiency of vitamin B12 or of folic acid in the maternal diet. *Anat. Rec.*, 120, 917-933

Parada C., Gato A., Bueno D. (2005). Mammalian embryonic cerebrospinal fluid proteome has greater apolipoproteína and enzyme pattern complexity than the avian proteome. *J. Proteome Res.*, 4, 2420-2428.

Pérez-Fígares J.M., Jiménez A.J., Pérez-Martín M., Fernández-Llebrez P., Cifuentes M., Riera P., Rodríguez S., Rodríguez E.M. (1998). Spontaneous congenital hydrocephalus in the mutant mouse *hyh*. Changes in the ventricular system and the subcommissural organ. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 57(2), 188-202.

Pérez-Fígares J.M., Jiménez A.J., Rodríguez E.M. (2001). Subcommissural organ, cerebrospinal fluid circulation and hydrocephalus. *Microsc Res Tech.*, 52, 591-607.

Puchades M., Hansson S., Nilsson C., Andreasen N., Blennow K., Davidsson P. (2003). Proteomics studies of potential cerebrospinal fluid protein markers for Alzheimer's disease. *Mol. Brain Res.*, 118, 140-146.

Rekate H.L. (1997). Recent advances in the understanding and treatment of hydrocephalus. [Review]. *Semin. Pediatr. Neurol.*, 4, 167-178.

Reynolds B.A., Weiss S. (1992). Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science*, 255, 1707-1710.

Rønn L., Raets I., Hartz B., Bech M., Berezin A., Berezin V., Møller A., Bock E. (2000). A simple procedure for quantification of neurite outgrowth based on stereological principles. *J. Neurosc. Meth.*, 100, 25-32.

Rodríguez E.M., Oksche A., Hein S., Rodríguez S., Yulis R. (1984). Comparative immunocytochemical study of the subcommissural organ. *Cell Tissue Res.*, 237, 427-441.

Rodríguez E.M., Oksche A., Hein S., Yulis C.R. (1992). Cell biology of the subcommissural organ. *Int. Rev. Cytol.*, 135, 39-121.

Rodríguez E.M., Jara P., Richter H., Montecinos H., Flandes B., Wiegand R., Oksche A. (1993). Evidence for the release of CSF-soluble secretory material from the subcommissural organ, with particular reference to the situation in the human. En: Oksche A., Rodríguez E.M., Fernández-Llebrez P. (eds) *The subcommissural organ. An ependymal brain gland*: 121-131. Springer-Verlag, Berlin.

Rodríguez E.M., del Brío M., Riera P., Menéndez J., Schoebitz K. (1996). The floor plate of the hindbrain is a highly specialized gland. Immunocytochemical and ultrastructural characteristics. *Dev. Brain Res.*, 97, 153-168.

Rodríguez E.M., Rodríguez S, Hein S. (1998). The subcommissural organ. *Microsc. Res. Tech.*, 41, 98–123.

Rodríguez S., Vío K., Wagner C., Barría M., Navarrete EH., Ramírez VD., Pérez-Fígares JM., Rodríguez EM. (1999). Changes in the cerebrospinal fluid monoamines in rats with an immunoneutralization of the subcommissural organ-Reissner's fiber complex by maternal delivery of antibodies. *Exp. Brain Res.*, 128, 278-290.

Rodríguez E.M, Oksche A, Montecinos H. (2001). Human subcommissural organ, with particular emphasis on its secretory activity during the fetal life. *Microsc. Res. Tech.*, 52, 573-590.

Shoebitz K., Garrido O., Heinrichs M., Speer L., Rodríguez E.M. (1986). Ontogenic development of the chick and duck subcommissural organ. An immunocytochemical study. *Histochemistry*, 84, 31-40.

Shoebitz K., Rodríguez E.M., Garrido O., Del Brío-León M.A. (1993). Ontogenic development of the subcommissural organ with reference to the flexural organ. En: Oksche A., Rodríguez E.M., Fernández-Llebrez P. (eds) *The subcommissural organ. An ependymal brain gland*: 41-49. Springer-Verlag, Berlin.

Sihibom C., Davidsson P., Sjögren M., Wahlund L., Nilsson C. (2008). Structural and quantitative comparison of cerebrospinal fluid glycoproteins in Alzheimer's disease patients and healthy individuals. *Neurochem. Res.*, 33, 1332-1340.

Somera K.C., Jones H.C. (2004). Reduced subcommissural organ glycoprotein immunoreactivity precedes aqueduct closure and ventricular dilatation in H-Tx rat hydrocephalus. *Cell tissues Res.*, 315, 361-373

Sternberger L.A., Hardy P.H., Cuculis J.J., Meyer H.G. (1970). The unlabelled antibody-enzyme method of immunohistochemistry: preparation and properties of a soluble antigen-antibody complex (horseradish-peroxidase-antiperoxidase) and its use in identification of spirochetes. *J. Histochem. Cytochem.*, 18, 315-345.

Vío K., Rodríguez S., Navarrete E., Pérez-Fígares J.M., Jiménez A., Rodríguez E. (2000). Hydrocephalus induced by the immunological knock out of the subcommissural organ-Reissners fiber complex by material delivery of anti-RF antibodies. *Exp Brain Res.*, 135, 41-52.

Vío K. (2004). Participación del complejo órgano subcomisural-fibra de Reissner en el desarrollo de hidrocefalia congénita. Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias. Univ. Austral de Chile, 131pp.

Vío K., Rodríguez S., Yulis C., Oliver C. (2008). The subcommissural organ of the rat secretes Reissner's fiber glycoproteins and CSF-soluble proteins reaching the internal and external CSF compartments. *Cerebrospinal Fluid Research*, 5, 3.

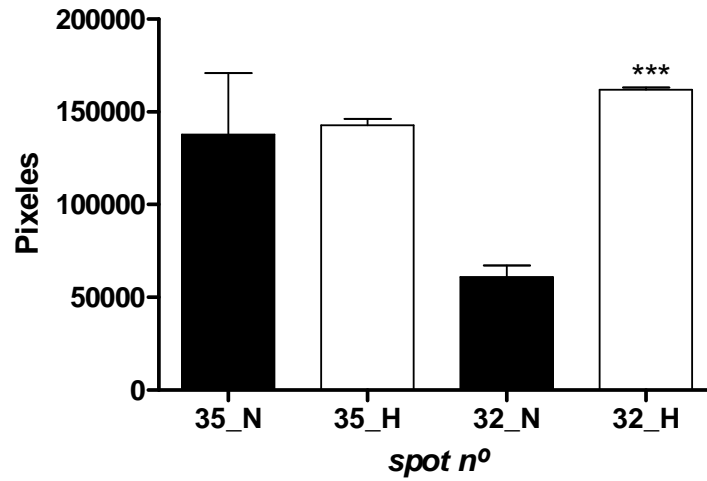
Voelz K., Kondziella D., von Rautenfeld D., Brinker T., Lüdemann W. (2007). A ferritin tracer study of compensatory spinal CSF outflow pathways in kaolin-induced hydrocephalus. *Acta Neuropathol.*, 113, 569–575.

Wagner C., Bátiz L.F., Rodríguez S., Jiménez A., Páez P., Tomé M., Pérez-Fígares J.M., Rodríguez E.M. (2003). Cellular mechanisms involved in the stenosis and obliteration of the cerebral aqueduct of *hyh* mutant mice developing congenital hydrocephalus. *JNEN*, 62(10), 1019-1040.

Yulis C., Mota M.D., Andrades J.A., Rodríguez S., Peruzzo B., Mancera J.M., Ramirez P., Garrido M., Pérez-Fígares J.M., Fernández-Llebrez P., Rodríguez E.M. (1998). Floor plate and the subcommissural organ are the source of secretory compounds of related nature: comparative immunocytochemical study. *J. Comp. Neurol.*, 392, 19-34.

Zappoterra M., Lisgo S., Lindsay S., Gygi S., Walsh C., Ballif B. (2007). A comparative proteomic analysis of human and rat embryonic cerebrospinal fluid. *J. Proteome Res.*, 6, 3537-3548.

7. ANEXO



7.1 Análisis densitométrico de las variaciones entre los spots 32 y 35. A través de la medición de los pixeles de los spots 32 y 35, se determinó al spot 35 como control de tinción, por no variar significativamente entre las muestras estudiadas. (***) $p > 0,001$)