

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA**  
Campus Juriquilla, Querétaro.

“Control del Crecimiento Axonal Longitudinal en el  
Cerebro en Desarrollo”

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS**

**P R E S E N T A :**

**M. en C. Hebert Luis Hernández Montiel**

Asesor: Dr. Alfredo Varela Echavarría

Juriquilla, Querétaro, abril de 2005.



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

*A Sary, mi amor eterno;  
a Hebert y Mauricio mi tesoro más  
preciado*

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Dr. Alfredo Varela Echavarría por su compromiso ilimitado hacia mi formación como investigador y como mejor ser humano.

A mis compañeros de trabajo por mantener un ambiente de armonía y ayuda entre todos nosotros.

Al Dr. Francisco Fernández de Miguel y al Dr. Jorge Larriva Sahd, miembros de mi comité tutorial, por sus enseñanzas a través de estos años y por la motivación que indujeron en mí para hacer siempre mi mejor esfuerzo.

A la Dra. Magdalena Giordano, Dra. Ofelia Mora y a Claudia Castillo por su apoyo, orientación y ayuda en el análisis estadístico de los datos.

Al CONACYT por la beca para la formación académica de mi Doctorado y por el apoyo al proyecto 31882-N.

A la DGEP de la UNAM por la beca durante mi Doctorado.

A mis padres por su apoyo y enseñanzas a través de sus actos, por mantenerse a mi lado y ser parte de mi felicidad.

Pero sobre todo a Sary, Hebert y Mauricio, por ser la motivación que guía mi vida y mi felicidad.

A Dios por darme esta vida...

## ÍNDICE

<b>RESUMEN</b>	9
<b>SUMMARY</b>	10
<b>INTRODUCCIÓN</b>	11
a) Neuronas reticuloespinales romboencefálicas	13
b) Neuronas dopaminérgicas nigroestriatales	15
<b>Hipótesis</b>	19
<b>Objetivo General</b>	19
<b>Objetivos particulares</b>	19
<b>ANIMALES, MATERIALES Y MÉTODOS</b>	20
ANIMALES	20
MATERIALES	20
MÉTODOS	23
1. Inmunohistoquímica	23
2. Hibridación <i>in situ</i>	24
3. Cultivos de neuronas reticuloespinales en geles de colágena	26
4. Microcirugías en embriones de pollo	28
5. Marcaje axonal retrógrado de axones reticuloespinales	29
6. Sistema de cultivo para el crecimiento de axones dopaminérgicos	30
7. Identificación del tejido fuente de moléculas quimiotrópicas para axones dopaminérgicos mesencefálicos.	31
<b>Estrategia experimental</b>	33
a) Proyección reticuloespinal romboencefálica	33
b) Proyección nigroestriatal mesencefálica	33

<b>RESULTADOS</b>	35
Axones Reticuloespinales Romboencefálicos	35
1.- El istmo presenta una actividad difusible que inhibe el crecimiento caudal de axones romboencefálicos.	35
2.- El istmo inhibe el crecimiento de neuritas de poblaciones específicas.	40
3.- Las proyecciones caudales del romboencéfalo proyectan de forma aberrante en ausencia del istmo.	41
Tracto nigroestriado	48
1. Sistema de evaluación del efecto quimiotrópico sobre las neuronas dopaminérgicas mesencefálicas (NDM).	48
2. La p1r y el estriado atraen a las neuritas de las NDM.	49
3. Las semaforinas 3A, 3C y 3F se expresan en regiones del neuroepitelio con acción trópica sobre la proyección nigroestriatal.	50
4. Las semaforinas 3A, 3C y 3F tienen efectos quimiotrópicos sobre las NDM en cultivo.	55
5. Anticuerpos contra los receptores para semaforinas reducen los efectos quimiotrópicos causados por la p1r y las semaforinas 3A, 3C y 3F.	58
<b>DISCUSIÓN</b>	62
A. Neuronas reticuloespinales	62
El istmo es una fuente de señales difusibles que afectan la proyección de axones romboencefálicos caudales.	62
Los axones mesencefálicos del FLM participan en la proyección reticuloespinal romboencefálica.	63
Naturaleza de las señales guía para los axones longitudinales pioneros	64
B. Neuronas dopaminérgicas mesencefálicas.	65
Zonas del neuroepitelio embrionario atraen el crecimiento de	65

las NDM.	
Las semaforinas ejercen efectos quimiotrópicos sobre axones dopaminérgicos.	65
Mecanismos de proyección axonal longitudinal en el SNC en desarrollo	68
<b>CONCLUSIONES</b>	70
<b>REFERENCIAS</b>	71
<b>ANEXO.</b> Artículo: “Diffusible signals and fasciculated growth in reticulospinal axon pathfinding in the hindbrain”	79

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Proyección de las neuronas dopaminérgicas mesencefálicas de la sustancia nigra.	16
<b>Figura 2.</b> Tipos generales de proyecciones descendentes en el romboencéfalo y el sistema de cultivo para su estudio.	27
<b>Figura 3.</b> Cultivos en geles de colágena para axones dopaminérgicos mesencefálicos.	31
<b>Figura 4.</b> Crecimiento axonal de explantes marcados con Dil.	36
<b>Figura 5.</b> El istmo inhibe el crecimiento caudal de los axones romboencefálicos de proyección caudal.	37
<b>Figura 6.</b> El istmo repele el crecimiento caudal de los explantes de romboencéfalo rostral. El istmo no ejerce efectos negativos sobre la sobrevivencia de las neuronas reticuloespinales.	39
<b>Figura 7.</b> El istmo inhibe el crecimiento caudal de neuronas positivas a serotonina, sustancia P y adrenalina.	40
<b>Figura 8.</b> El istmo inhibe el crecimiento caudal de poblaciones neuronales específicas del romboencéfalo.	41
<b>Figura 9.</b> Las neuronas reticuloespinales romboencefálicas fallan en su proyección caudal en ausencia de las señales derivadas del istmo.	43
<b>Figura 10.</b> La falta del istmo altera la proyección descendente de axones positivos a GAD en el romboencéfalo, pero no alteran la expresión de marcadores para neuronas reticuloespinales ni de neuronas motoras.	46
<b>Figura 11.</b> Sistema de evaluación del crecimiento dopaminérgico.	49
<b>Figura 12.</b> La p1r y el estriado atraen el crecimiento de las neuritas dopaminérgicas.	50
<b>Figura 13.</b> Las semaforinas 3A y 3C se expresan en la ruta de proyección dopaminérgica.	52



<b>Figura 14.</b> La región del explante mesencefálico expresa los receptores neuropilina 1 y 2 durante el desarrollo.	54
<b>Figura 15.</b> Las semaforinas 3A, 3C y 3F ejercen efectos quimiotrópicos sobre la proyección dopaminérgica <i>in vitro</i> .	57
<b>Figura 16.</b> Los anticuerpos contra los receptores a semaforinas anulan los efectos quimiotrópicos mostrados por la p1r y por el estriado.	59
<b>Figura 17.</b> Los anticuerpos son específicos para los receptores a semaforinas.	61

## RESUMEN

El estudio del control de la proyección axonal a lo largo del eje longitudinal del tubo neural nos ha llevado a usar como modelos de estudio a la proyección reticuloespinal romboencefálica en el fascículo longitudinal medio (FLM) y al tracto nigroestriado en la rata. Los resultados muestran que el istmo controla la proyección en sentido caudal de las neuronas reticuloespinales romboencefálicas. En cultivos, el istmo mostró una actividad repelente del crecimiento caudal de las neuritas reticuloespinales y de subpoblaciones de neuronas reticulares y del rafe. La falta de señales provenientes de esta zona provoca una falta de proyección caudal de las neuronas reticuloespinales. Estos resultados sugieren que señales difusibles quimiorrepelentes o no permisivas provenientes del istmo y señales ancladas al sustrato en los axones pioneros del FLM se encuentran involucrados en la dirección caudal de la proyección reticuloespinal y podría influenciar otras proyecciones longitudinales en el romboencéfalo. Dentro del estudio de la proyección dopaminérgica, hemos identificado zonas del neuroepitelio que guían la proyección en sentido rostral hacia su blanco final ubicado en el estriado en desarrollo. La prosómera 1 y el estriado atraen a las neuritas dopaminérgicas en desarrollo. Los experimentos de hibridación *in situ* mostraron que las semaforinas se expresan en la prosómera 1 rostral (sema 3C y 3F), la prosómera 2 (sema 3A) y en el estriado (sema 3A). Cuando las semaforinas se expresaron en agregados celulares y éstos se cultivaron junto con explantes de la sustancia nigra, mostraron efectos de atracción (sema 3A y 3C) y de repulsión (sema 3F). Estos efectos se pueden bloquear mediante el uso de anticuerpos específicos para los receptores de estas moléculas. Los resultados sugieren que las semaforinas 3A, 3C y 3F participan en el control de la proyección dopaminérgica en sentido rostral hacia su blanco final.

## SUMMARY

We addressed the control of longitudinal axon pathfinding in the developing brain, including the caudal projections of reticular neurons and the nigrostriatal mesencephalic tract. Our results showed that the isthmus inhibited caudally directed axon outgrowth, whereas rostrally directed axon outgrowth was unaffected. Immunohistochemistry for reticular and raphe neuronal markers indicated that the caudal, but not the rostral projections of these neuronal subpopulations were inhibited by isthmus explants. Companion studies in chick embryos showed that, when the hindbrain was surgically separated from the isthmus, caudal reticulospinal axon projections failed to form and that descending pioneer axons of the medial longitudinal fasciculus play an important role in the caudal reticulospinal projection. These results suggest that diffusible chemorepellent or nonpermissive signals from the isthmus and substrate-anchored signals on the pioneer FLM axons are involved in the caudal direction of reticulospinal projections and might influence other longitudinal projections in the brainstem. In the study of nigrostriatal projections we have identified neuroepithelial regions that guide the rostral projection of the dopaminergic mesencephalic neurons to the final target in the developmental striatum. Our data showed that prosomere 1 and the striatum can attract the dopaminergic neurite outgrowth during rat development. *In situ* hybridization experiments demonstrated that semaphorins are expressed in the prosomere 1 (sema 3C and 3F), prosomere 2 (sema 3A) and striatum (sema 3A). When semaphorins were expressed in cellular aggregates and cultured with substantia nigra explants, they show attractive (sema 3A y 3C) and repulsive (sema 3F) effects. These effects can be blocked using specific antibodies for semaphorins receptors. These results suggest that semaphorins participate in the control of the rostral dopaminergic projection to their final target.

## INTRODUCCIÓN

El Sistema Nervioso Central (SNC) de los mamíferos está constituido por una compleja red de circuitos neuronales interconectados de forma muy compleja, que en su mayoría se forman durante el desarrollo embrionario (Daston y Koester, 1996). Estos circuitos se establecen por la proyección estereotípica de axones en crecimiento desde su sitio de origen hasta sus células blanco, en respuesta a señales guía detectadas por receptores localizados en su extremo distal, el cono de crecimiento (Mueller, 1999; Kanki y Kuwada, 2000).

La proyección axonal está controlada por sistemas que se pueden clasificar en señales de corto y de largo alcance (Tessier-Lavigne y Goodman, 1996; Varela-Echavarría y Guthrie, 1997). Los mecanismos de corto alcance consisten en moléculas ancladas a la membrana celular o a la matriz extracelular. Entre este tipo de señales podemos citar a las proteínas slit (Brose y Tessier-Lavigne, 2000), a moléculas de adhesión celular como NCAM y L1 y a las efrinas y sus receptores (Kury et al., 2000). Los mecanismos de largo alcance consisten en señales secretadas que difunden desde su sitio de síntesis formando gradientes en el tejido circundante. Ejemplos de señales de largo alcance lo constituyen las semaforinas de secreción, las netrinas y las proteínas BMP (por las siglas del inglés Bone Morphogenetic Proteins).

Algunos de los grupos de moléculas descritos guían el crecimiento axonal a lo largo de rutas circunferenciales en el tubo neural en desarrollo, esto es, a lo largo de rutas ortogonales a su eje longitudinal (Kaprielain, Imondi y Runko, 2000). Destacan entre ellas las netrinas (Kennedy et al., 1994; Colamarino y Tessier-Lavigne, 1995; Chan et al., 1996; Ren et al., 1999), BMP's y slit (Kidd, Bland y Goodman, 1998; Van Vactor y Flanagan, 1999; Wang et al., 1999; Rajagolapan et al., 2000) en la proyección de las neuronas comisurales espinales. Estas neuronas proyectan ventralmente desde la porción dorsal del tubo neural y atraviesan la línea media para después proyectar en sentido ascendente. Estas neuronas inician la proyección ventral alejándose de la placa del techo que expresa la proteína BMP-7 (Augsburger et al., 1999); en su proyección ventral, son atraídas

hacia la placa del piso (PP), en la línea media ventral, que expresa netrina-1 (Serafini et al., 1996). Posteriormente, las proteínas slit, que se expresan también en la línea media, controlan el cruce en la placa del piso, evitando que los axones crucen nuevamente (Rothberg et al., 1990).

Sin embargo, los mecanismos que guían el crecimiento axonal a lo largo del eje longitudinal del tubo neural son menos conocidos. Este trabajo forma parte de un programa de investigación amplio en el que se estudian estos mecanismos y, como modelos de proyección longitudinal hemos iniciado el estudio de la proyección reticuloespinal en el romboencéfalo y de la vía nigroestriatal en el mesencéfalo. Durante el desarrollo embrionario, los axones reticuloespinales siguen una ruta descendente ipsi o contralateral en el fascículo longitudinal medial (FLM) hasta la región cervical de la médula espinal que determina la posición de las extremidades superiores en relación con el resto del cuerpo; la vía dopaminérgica sigue un trayecto ascendente ipsilateral desde el mesencéfalo caudal hasta la región del prosencéfalo que da lugar al estriado.

### **a) Neuronas reticuloespinales romboencefálicas**

Las neuronas de la formación reticular del romboencéfalo dan lugar a varias proyecciones, incluyendo la vía reticuloespinal originada en las neuronas reticuloespinales cuyos axones se unen de forma ipsilateral al FLM o proyectan a través de la placa del piso antes de unirse al FLM contralateral (Glover y Petursdottir, 1988; Easter y Frankfurter, 1993; Parent, 1996; Bélanger et al., 1997; Auclair, Marchand y Glover, 1999). Tanto en embriones de pollo como de roedores, las neuronas reticuloespinales se encuentran organizadas en columnas longitudinales con núcleos localizados en niveles específicos del eje longitudinal (Glover y Petursdottir, 1988; Clarke y Lumsden, 1993; Glover, 1993; Auclair, Marchand y Glover, 1999). Dos columnas se encuentran en la médula (rombómeras 6 a 8); una de ellas proyecta ipsilateralmente y la otra de forma contralateral. La columna ipsilateral se continúa en el puente (rombómera 1 a 5) mientras que la contralateral es interrumpida a nivel de la prosómera 5 (Mastick y Easter, 1996). Las neuronas serotoninérgicas y adrenérgicas son otras poblaciones que siguen proyecciones longitudinales en el romboencéfalo en desarrollo. Las neuronas serotoninérgicas se desarrollan en el romboencéfalo rostral y dan lugar a los núcleos caudales lineales, al núcleo dorsal del rafe, al núcleo medial del rafe y al grupo B9 de Dalhström y Fuxe (Dalhström y Fuxe, 1964; Aitken y Tork, 1988). A pesar de que la mayoría de las proyecciones de estos núcleos son en sentido ascendente, el núcleo dorsal y medio del rafe también tienen proyecciones descendentes claramente definidas en la rata adulta (Vertes, Fortin y Crane, 1999). En contraste, el núcleo serotoninérgico caudal tiene principalmente proyecciones caudales (Parent, 1996). Se ha mostrado que las neuronas positivas para feniletanolamina-N-metiltransferasa (PNMT) que se desarrollan en el romboencéfalo rostral, dan lugar a centros adrenérgicos en el puente que presentan tanto proyecciones ascendentes como descendentes (Shimada, Takatsuji y Wanaka, 1998).

En el romboencéfalo de anfibios, la dirección de crecimiento caudal de las neuronas reticuloespinales Mauthner es influenciada por la polaridad del tubo neural. Las neuronas Mauthner presentes en fragmentos neuroepiteliales

romboencefálicos transplantados homotópicamente pero en orientación inversa de acuerdo a su eje longitudinal, proyectan inicialmente de forma ascendente de acuerdo al eje original del implante. Sin embargo, la mayoría de ellas viran caudalmente siguiendo la proyección normal de acuerdo a la polaridad del tubo neural del hospedero (Hibbard, 1965). La fuente de tales señales de orientación no es clara, pero podría residir en información de patrones locales, en tractos pioneros preexistentes o en algunos centros organizadores localizados en distintas posiciones a lo largo del eje neural, produciendo señales difusibles que guían el crecimiento. Esta última idea podría ser de gran relevancia toda vez que se ha encontrado que la placa del piso (PP) actúa como un organizador, y que influye en la guía axonal a lo largo del eje dorsoventral del tubo neural (Tanabe y Jessell, 1996; Tessier-Lavigne y Goodman, 1996). Otros centros organizadores que controlan patrones de desarrollo en el eje rostrocaudal incluyen al istmo, a la región organizadora del prosencéfalo (Lumsden y Krumlauf, 1996; Houart, Westerfield y Wilson, 1998; Rubenstein et al., 1998), y posiblemente a la zona *limitans* intratálámica (Larsen, Zeltser y Lumsden., 2001; Zeltser, Larsen y Lumsden, 2001). El papel de estas regiones en la proyección axonal no ha sido investigado. En este trabajo se examinó el posible papel del istmo en la guía axonal, ya que esta zona actúa como un organizador de patrones de desarrollo y diferenciación del mesencéfalo, el cerebelo y el romboencéfalo rostral (Lee et al., 1997; Wassarman et al., 1997; Martínez et al., 1999; Irvin y Mason, 2000). También hemos investigado si los axones descendentes del FLM originados en el mesencéfalo, podrían proveer información de señales guía. Utilizando experimentos *in vitro* e *in vivo*, hemos encontrado que el istmo es una fuente de señales difusibles que afectan a poblaciones de axones romboencefálicos de proyección caudal, incluyendo a los reticuloespinales y del rafe, y que los axones descendentes del FLM del mesencéfalo juegan un papel crítico en la proyección caudal reticuloespinal. Estos resultados indican que el istmo actúa como un organizador del crecimiento axonal al producir señales guía, señales inhibitoras o activando sistemas de guía axonal que conducen las proyecciones descendentes

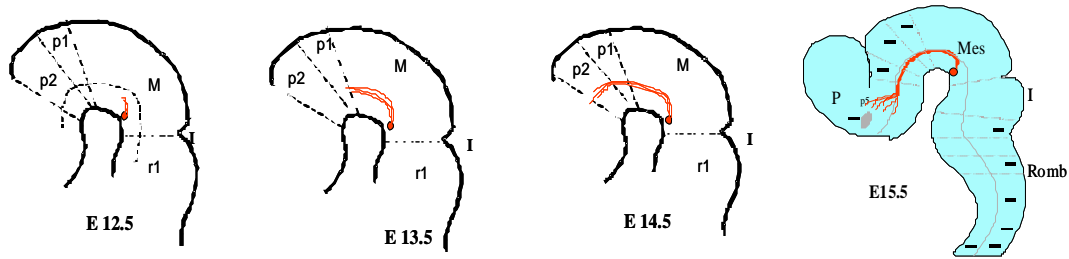
desde las rombómeras rostrales. Nuestros resultados indican que el FLM actúa como un tracto pionero para proyecciones descendentes del tallo cerebral.



## **b) Neuronas dopaminérgicas nigroestriatales**

El tracto nigroestriado participa en el control motor al modular el funcionamiento de las neuronas estriatales. Sus fibras hacen sinapsis con las neuronas pequeñas y grandes del estriado dorsolateral (Beckstead, Domesick y Nauta, 1979; Lin y Rosenthal, 2003). En este sitio liberan dopamina, la cual activa receptores D1 y D2, causando, respectivamente, una disminución de la excitabilidad de la membrana y una disminución de la liberación de neurotransmisor por parte de las neuronas colinérgicas estriatales. Ambos efectos provocan una disminución de la frecuencia de descarga de las neuronas estriatales. Además, este tracto está evolutivamente conservado en los vertebrados y es posible identificarlo mediante el uso de anticuerpos contra la hidroxilasa de tirosina (TH), enzima limitante en la síntesis de dopamina. En el humano, el origen de la enfermedad de Parkinson, es la muerte de estas neuronas.

Durante el desarrollo embrionario de la rata, el tracto nigroestriado inicia su proyección en las porciones ventral y caudal del mesencéfalo, donde se localiza la sustancia nigra (SN) en desarrollo, originándose en el día 12 de gestación (E12). Su proyección inicial es hacia la parte dorsal del tubo neural, alejándose de la PP. En el E12.5, la mayoría de las neuronas dopaminérgicas mesencefálicas (NDM) ya han proyectado dorsalmente. Entre E12.5 y E13, las neuritas viran y proyectan rostralmente, dirigiéndose hacia el prosencéfalo. Esta región del cerebro en desarrollo está dividida en dominios transversos o prosómeras (Puelles y Rubenstein, 1993). Así, los axones dopaminérgicos proyectan hacia el diencefalo, que incluye a las prosómeras 1 a 4 y posteriormente, en E15, llegan a la prosómera 5 (p5), que en estadios posteriores da lugar al estriado (fig. 1) (Nakamura et al., 2000). Durante el período postnatal, la formación de nuevas sinapsis dopaminérgicas con las neuronas estriatales continúa y es incluso probable que contribuya a la maduración del estriado (Antonopoulos et. al, 2002).



**Figura 1. Proyección de las neuronas dopaminérgicas mesencefálicas de la sustancia nigra.** La proyección dopaminérgica en la rata comienza en el E12.5 y los primeros axones dopaminérgicos llegan a su blanco final, el estriado, en el E15.5.

En el cerebro maduro, las neuronas dopaminérgicas están concentradas en dos zonas del mesencéfalo: el área tegmental ventral (VTA) y la sustancia nigra (SN). Las proyecciones del VTA hacia el estriado ventromedial (núcleo *accumbens* y tubérculo olfatorio) forman el tracto mesolímbico y la proyección hacia la corteza forma el tracto mesocortical. Por su parte, las proyecciones de la SN hacia el estriado dorsolateral (caudado-putamen) forman el tracto nigroestriado (Moore y Bloome, 1978; Beckstead, Domesick y Nauta, 1979; Van der Kooy, 1979).

A pesar de que las señales más importantes que guían al tracto nigroestriado hasta el estriado aún se desconocen, existen algunas moléculas que han sido implicadas en algunos aspectos de esta proyección.

Las proteínas slit-1 y 2 se expresan en la parte ventral del mesencéfalo y diencefalo en E12.5 y E13.5 cuando las NDM proyectan dorsalmente, y la ausencia de estas proteínas ventraliza la proyección nigroestriado en su curso por el diencefalo (Bagri et al., 2002) lo que supone que este sistema participa en la determinación de la posición dorsoventral de este tracto; además se ha demostrado que estas neuronas expresan los receptores robo-1 y robo-2 que son los receptores para las proteínas slit (Marillat et al., 2002). Recientemente, se ha determinado que la netrina-1 y la proteína slit-2 contribuyen a la determinación dorsoventral de la proyección de las NDM (Lin, Rao e Isacson, 2005).

Cuando se cocultiva, la PP inhibe el crecimiento de las NDM (Tamada, Shirasaki y Murakami, 1995). La netrina-1 se expresa en la PP, en la porción

ventral del mesencéfalo (Funato, Saito-Nakasato y Takahashi, 2000) y en el estriado (Livesey y Hunt, 1997; Braisted et al., 2000; Hamasaki et al., 2001) lo que hace posible que esta molécula se encuentre implicada en la regulación de la proyección inicial dorsal del tracto referido. Sin embargo, esto no ha sido demostrado directamente.

La efrina B2 también ha sido implicada en la organización local de la zona blanco de las neuronas dopaminérgicas, al dirigir la proyección hacia el estriado dorsolateral y excluirlas del estriado ventromedial donde se expresa el receptor EphB (Yue et al., 1999).

A pesar de toda la información anterior, se desconocen la mayoría de los sistemas de moléculas que controlan la proyección hasta su blanco final. En este estudio nos propusimos identificar señales que llevan a cabo tal función. Para ello se diseñó un sistema en geles de colágena en el que se cultivaron explantes del mesencéfalo conteniendo a las NDM en desarrollo con explantes de otras zonas del neuroepitelio circundante. Esto permitió evaluar el efecto de diversas zonas del neuroepitelio en desarrollo en el crecimiento dopaminérgico. Además encontramos que algunas de las semaforinas del grupo 3 presentan patrones de expresión que podrían estar relacionados con las rutas de proyección de la vía dopaminérgica. Por ejemplo, la semaforina 3F se expresa en el mesencéfalo dorsal y la semaforina 3C se expresa en el mesencéfalo ventral. Por otro lado, en estudios de otros laboratorios se ha descrito que la semaforina 3F se expresa en p1 (Funato, Saito-Nakasato y Takahashi, 2000) y que las semaforinas 3A y 3F se expresan en el estriado (Marín et al., 2001), zonas por las cuales proyectan las NDM.

La expresión de moléculas de la familia de las semaforinas a lo largo de la ruta de proyección dopaminérgica, sugiere su participación en la orientación del crecimiento hacia su blanco final. Por ello se propuso averiguar el posible papel de las semaforinas en el control de la proyección longitudinal nigroestriatal. En la primera etapa llevamos a cabo una búsqueda más amplia de regiones del neuroepitelio con posible actividad quimiotrópica. Posteriormente, desarrollamos métodos para determinar el posible papel de las semaforinas de secreción en esta

actividad quimiotrópica y la participación de los receptores de membrana correspondientes.

**Hipótesis:**

El istmo actúa como un organizador de la proyección longitudinal de las neuronas reticuloespinales romboencefálicas en desarrollo.

Las semaforinas de la clase III, que constituyen moléculas secretadas, participan en el control de la proyección longitudinal rostral de las neuronas dopaminérgicas mesencefálicas.

**Objetivo general:**

Estudiar los mecanismos de control de la proyección axonal longitudinal en el cerebro en desarrollo evaluando el posible papel del istmo en el control del crecimiento caudal de las neuronas reticuloespinales romboencefálicas y el papel de las semaforinas de la clase III en el control de la proyección nigroestriatal.

**Objetivos particulares:**

- 1.- Evaluar el efecto del istmo sobre el crecimiento caudal de explantes de rombencéfalo rostral (r2-r3) en cultivos en geles de colágena.
- 2.- Identificar a las poblaciones neurales cuyo crecimiento axonal es afectado por el istmo.
- 3.- Analizar el efecto *in vivo* de la ausencia de la región del istmo sobre la proyección reticuloespinal en embriones de pollo.
- 4.- Identificar zonas del neuroepitelio embrionario que tienen un efecto quimiotrópico sobre el crecimiento de los axones dopaminérgicos *in vitro*.
- 5.- Analizar mediante hibridación *in situ* el patrón de expresión de las semaforinas de la clase III.
- 6.- Determinar el efecto sobre el crecimiento de los axones dopaminérgicos de las semaforinas que se expresen en las zonas del cerebro con actividad quimiotrópica para los mismos.
- 7.- Analizar la participación de las semaforinas en los efectos quimiotrópicos de explantes neuroepiteliales por medio del bloqueo de sus receptores.

## **ANIMALES, MATERIALES Y MÉTODOS**

### **ANIMALES**

Para los ensayos *in vitro* en geles de colágena para axones reticuloespinales se utilizaron embriones de rata Wistar de 14.5 días de gestación (E14.5). El día de detección del tapón vaginal se consideró como día 0.5. Es importante aclarar que la eutanasia de animales por dislocación cervical está aprobada por la norma sobre especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio, NOM-062-ZOO-1999, que se encuentra dentro del Catálogo de Normas Oficiales Mexicanas (SECOFI, 1999).

En los ensayos *in vitro* realizados con las neuronas dopaminérgicas mesencefálicas se utilizaron embriones de dos estadios de desarrollo: con embriones E13.5 se realizaron cocultivos de las NDM junto con explantes de prosómera 1 (p1), p2 y p3 y con E14.5 se realizaron los cultivos con el estriado. En ambos casos, las ratas fueron sacrificadas mediante dislocación cervical e inmediatamente después se realizó una incisión abdominal para extraer todos los embriones y ponerlos en solución Ringer fría. De cada embrión se extraen los explantes de neuroepitelio y se conservan en Ringer frío.

Se utilizaron embriones de pollo de la cepa White Leghorn que fueron incubados a los estadios de Hamburger y Hamilton (HH) deseados (Hamburger y Hamilton, 1951) para marcaje con dextrán fluorescente, microcirugías *in ovo* o en hibridación *in situ*.

### **MATERIALES**

Anticuerpos primarios:

Anticuerpo contra triptófano hidroxilasa, # de catálogo AB 15567, Chemicon Internacional Inc., Temecula, Cal., USA.

Anticuerpo contra feniletanolamina-N-metiltransferasa, PNMT, # de catálogo AB110, Chemicon Internacional Inc., Temecula, Cal., USA.

Anticuerpo contra la descarboxilasa del ácido glutámico, GAD, # de catálogo AHP360, Serotec, USA.

Anticuerpo contra sustancia P, # de catálogo AB1566, Chemicon Internacional Inc., Temecula, Cal., USA.

Anticuerpo contra tirosina hidroxilasa: Rabbit anti-tyrosine hydroxylase polyclonal antibody, # de catálogo AB151, Chemicon Internacional, USA.

Anticuerpo contra tirosina hidroxilasa: Mouse anti-tyrosine hydroxylase monoclonal antibody, # de catálogo MAB5280, Chemicon Internacional, USA.

Neuropilina-1, # de catálogo sc-5541, Santa Cruz Biotechnology, Inc., USA.

Neuropilina-2, # de catálogo sc-7242, Santa Cruz Biotechnology, Inc., USA.

Anticuerpos secundarios:

Anticuerpo anti-conejo, conjugado a Cy<sup>TM</sup>3, # de catálogo 111-166-003, Jackson Immunoresearch Laboratories, Inc., West Baltimore Pike, USA.

Anticuerpo anti-ratón, conjugado a fluoresceína, # de catálogo 115-096-003, Jackson Immunoresearch Laboratories, Inc., West Baltimore Pike, USA.

Anticuerpo anti-conejo, conjugado a peroxidasa, # de catálogo 111-036-003, Jackson Immunoresearch Laboratories, Inc., West Baltimore Pike, USA.

Anticuerpo Anti-DIG (anti-digoxigenin-AP Fab fragments) # de catálogo 1 093 274, Roche.

Otros reactivos:

Diaminobencidina, # de catálogo D-5905, Sigma, St. Louis, MO, USA.

Tritón X-100, # de catálogo X198-07, J.T. Baker.

Tween 20, # de catálogo X251-07, J.T. Baker.

Metanol, # de catálogo 9070-03, J.T. Baker.

Proteinasa K, # de catálogo 25530-015, GibcoBRL.

Glutaraldehído 50%, # de catálogo 16310, Electron Microscopy Sciences.

NBT (4-nitro blue tetrazolium chloride, # de catálogo 1 383 213, Roche.

BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate), # de catálogo 1 383 221, Roche.

Sacarosa, # de catálogo 4072-01, J.T. Baker.

Peróxido de hidrógeno al 30%, # de catálogo 2186-01, J.T. Baker.

DABCO/Glicerol 0.21 M.

0.233 grs. de DABCO (# de catálogo D-2522, SIGMA, St. Louis, MO, USA) se disuelven en 800 µl de agua MQ, más 200 µl de tris (# de catálogo 4109-06, J.T. Baker) 1M pH 8 y 9 ml de glicerol (# de catálogo 2136-02, J.T. Baker). Se deja en agitación toda la noche. Almacenar a -20 °C.

Soluciones de hibridación *in situ*:

Buffer de hibridación: Formamida (# de catálogo 4028-01, J.T. Baker) 25 ml, SSC pH 4.5 12.5 ml, heparina (# de catálogo H-5263, Sigma) (50 mg/ml) 50 µl, Tween-20 500 µl, Yeast RNA (# de catálogo 109 223, Roche) (20 mg/ml) 125 µl, SSDNA (# de catálogo D-7656, Sigma) (10 mg/ml) 250 µl, aforar con agua a 50 ml.

Solución I: Formamida 25 ml, SSC pH 4.5 10 ml, SDS (sodium dodecyl sulfate, # de catálogo 15525-017, Invitrogen)) 10% 5 ml, aforar con agua a 50 ml.

Solución II: NaCl 2M 12.5 ml, Tris 1M pH 7.5 500 µl, Tween-20 10% 500 µl, aforar con agua a 50 ml.

Solución III: formamida 25 ml, SSC pH 4.5 5 ml, aforar con agua a 50 ml.

Solución NTMT: NaCl 2M 2.5 ml, Tris pH 9.5 1M 5 ml, MgCl<sub>2</sub> 2M 1.75 ml, Tween-20 10% 500 µl, aforar con agua a 50 ml.

Solución MABT: ácido maléico (P460-07, J.T. Baker) 0.1 M, NaCl 150mM y Tween-20 0.1%.

SSC 20X: NaCl 3M, citrato de sodio (# de catálogo 364605, J.T. Baker) 0.3M pH 4.5.

Extracción de colágena. Se utilizaron colas de rata congeladas a -20 °C, las cuales se descongelaron a temperatura ambiente, se esterilizaron en alcohol al 70% por 10 minutos y se les practicó una extracción mecánica de las fibras de colágena con pinzas. Las fibras se aislaron de los demás tejidos y se colocaron en una caja de petri estéril con etanol al 70% por 15 minutos. Después se recolectaron en un tubo tratando de quitarles el etanol usado, se añadió ácido acético al 0.1% y con agitación lenta por un día completo, a fin de disolver la colágena. Al día siguiente la solución se diluyó un poco (por la adición de 300ml de agua



desionizada) y se centrifugó por 30 minutos a 4 °C a 21000 xg. Por último, se recolectó el sobrenadante y se almacenó a 4 °C hasta el momento de usarlo. A este extracto crudo de colágena se le adicionaron los otros componentes para formar la mezcla del gel de colágena utilizada en los cultivos.

La mezcla del gel de colágena se preparó con 300 microlitros ( $\mu$ l) de D-MEM (# de catálogo 12100-038, Gibco), 100  $\mu$ l de colágena, 10  $\mu$ l de NaCl 1.537 M y 10  $\mu$ l de bicarbonato de sodio al 7.5% (# de catálogo 25080-094, Gibco). La mezcla se mantuvo en hielo hasta el momento de ser usada.

## SOLUCIONES:

Medio Opti-Mix: Optimem 70% (# de catálogo 51985-034, Gibco), nutrimix f-12 23.5% (# de catálogo 10565, Gibco), suero fetal bovino 4.7% (# de catálogo 16000-044, Gibco) y penicilina/estreptomicina 1:100 0.5% (# de catálogo 15140-122, Gibco).

Fijador: Paraformaldehído al 3.5% (# de catálogo P6148, Sigma) en PBS/pH 7.3.

Solución de Ringer: 0.1232 M de NaCl (# de catálogo 3624-05, J.T. Baker), 0.0015 M de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (# de catálogo 1332-01, J.T. Baker) y 0.0049 M de KCl (# de catálogo 3040-01, J.T. Baker).

Solución PBS pH 7.3: 0.0014 M de NaCl, 0.0026 M de KCl, 0.0042 M de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (# de catálogo 3828-01, J.T. Baker) y 0.0014 de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (# de catálogo 3246-01, J.T. Baker).

## MÉTODOS

### 1. Inmunohistoquímica.

- 1.- Fijar los embriones con paraformaldehído al 3.5.
- 2.- Realizar 6 lavados en PBS/tritón 1%, 15 minutos cada uno.
- 3.- Lavar dos veces con PBS/Tritón 1%/peróxido de hidrógeno1% una hora a temperatura ambiente.

- 4.- Incubar en solución PBS/Tritón 1%/suero de cabra 10% durante 3 horas a temperatura ambiente.
- 5.- Incubar el anticuerpo primario durante 72 horas a 4 °C.
- 6.- Lavar con PBS/Tritón 1% durante 1 día completo haciendo 6 cambios a 4 °C.
- 7.- Incubar el anticuerpo secundario en PBS/Tritón/suero de cabra 10% durante 1 día completo a 4 °C.
- 8.- Lavar con PBS/tritón al 1% durante 1 día completo.
- 9.- Revelar con diaminobencidina:
  - a) Disolver una tableta de DAB de 20 mgrs en 20 ml de tris 0.1M pH 7.2, centrifugar antes de usar.
  - b) Incubar en esta solución durante 2 horas a temperatura ambiente.
  - c) Disolver otra tableta como en el inciso a y añadir 6 µl de peróxido de hidrógeno por cada 10 ml de solución.
  - d) Incubar con esta solución hasta alcanzar el contraste y color deseado de la reacción.
  - e) Lavar rápidamente con PBS

## **2. Hibridación *in situ*.**

Los embriones de pollo fueron fijados y se les realizó hibridación *in situ* como se describe enseguida. Se usaron sondas para Lhx-1, Lhx-3 e Islet-1 (Tsuchida et al., 1994) proveídas por el Dr. S.L. Pfaff, The Salk Institute for Biological Studies La Jolla, California, USA.

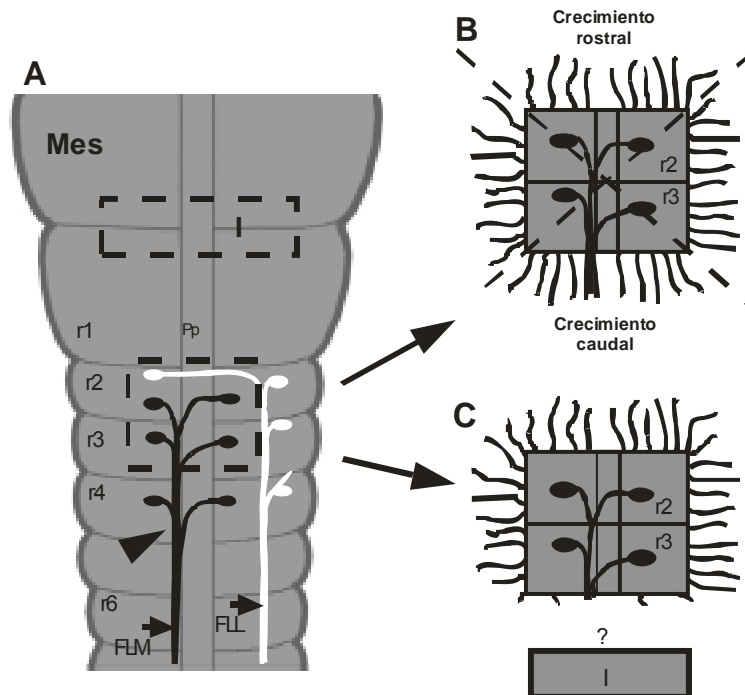
### **Método**

- 1.- Disecar los embriones en PBS.
- 2.- Deshidratar los embriones en series de metanol/PBT (25%, 50%, 75%) por 15 minutos cada una.
- 3.- Lavar dos veces con metanol al 100% por 10 minutos cada una.
- 4.- Rehidratar los embriones en series de metanol/PBT (75%, 50%, 25%) por 10 minutos cada una.
- 5.- Lavar dos veces con PBT, 10 minutos cada una.

- 6.- Aclarar los embriones con peróxido de hidrógeno 6% en PBT por 1 hora.
  - 7.- Lavar los embriones 3 veces en PBT, 10 minutos cada una.
  - 8.- Tratar con proteinasa K (10 µg/ml en PBT) por 20 minutos a temperatura ambiente sin agitación. Detener la digestión de la proteinasa K reemplazando con una solución de paraformaldehído al 3.5%, glutaraldehído al 0.2% y tween-20 al 0.1% durante 20 minutos.
  - 9.- Lavar dos veces con PBT durante 10 minutos cada una.
  - 10.- Agregar a los embriones 4 ml de buffer de hibridación para la prehibridación e incubar al menos por una hora a 70 °C.
  - 11.- Reemplazar la solución de hibridación con la solución de hibridación precalentada con la sonda e incubar los embriones por 1 día a 70 °C. La concentración total de la sonda no debe exceder 1 µg/ml.
- Lavados post-hibridación, se realizan a 70 °C y con soluciones precalentadas.
- 12.- Lavar 3 veces con la solución I, 30 minutos cada una.
  - 13.- Lavar 1 vez con una mezcla 1:1 de la solución I y la solución II, por 30 minutos.
  - 14.- Lavar 3 veces con la solución II, 30 minutos cada una.
  - 15.- Lavar 3 veces con la solución III, 30 minutos cada una.
  - 16.- Enjuagar a temperatura ambiente con MABT 3 veces por 10 minutos cada una.
  - 17.- Reemplazar la solución MABT con MABT/suero de cabra al 15% y preincubar por 3 horas.
  - 18.- Reemplazar con solución fresca con el anticuerpo anti-DIG 1:3000 e incubar toda la noche a 4 °C.
  - 19.- Lavar 6 veces con MABT, una hora cada una.
  - 20.- Lavar 3 veces con NTMT por 10 minutos cada una.
  - 21.- Incubar con la solución colorante NBT/BCIP (agregar 4.5 µl de NBT y 3.5 µl de BCIP por cada mililitro de NTMT) a temperatura ambiente hasta que se desarrolle la tinción deseada.
  - 22.- Detener la reacción lavando 3 veces con NTMT, 10 minutos cada una.
  - 23.- Fijar con paraformaldehído al 3.5% en PBS toda la noche para preservar la tinción.

### **3. Cultivos de neuronas reticuloespinales en geles de colágena.**

Explantos de romboencéfalo de embriones de rata en E14.5 fueron disecados y cultivados por 48 horas en geles de colágena. La región usada para evaluar a los explantes (contiene neuronas romboencefálicas de proyección longitudinal) fue un explante de rombómera 2 y 3. El borde rostral de cada explante fue marcado con rojo carmín con una aguja de tungsteno previo a la disección. Los explantes fueron cultivados de 200 a 500  $\mu\text{m}$  de distancia de los explantes de istmo (conteniendo mesencéfalo caudal y rombómera 1 rostral), rombómera 8 ó neuroepitelio cervical (Fig. 2). Después del período de cultivo, se observaron los geles en el microscópio de contraste de fases y después se fijaron con paraformaldehído al 4.5% en PBS para realizar inmunohistoquímica. Para contar los axones en los explantes sin teñir obtenidos bajo contraste de fase se identificaron los axones que se extienden desde el borde caudal del explante romboencefálico y se dibujaron mediante una cámara lúcida. Fue contado el número total de axones o de fascículos axonales saliendo de los bordes rostrales y caudales del explante. Después se determinó la media de crecimiento para cada condición y se hicieron comparaciones estadísticas con la prueba  $t$  ( $P=0.05$ ).



**Figura 2. Tipos generales de proyecciones descendentes en el romboencéfalo y el sistema de cultivo para su estudio.** (A) Se representan los dos tipos principales de proyecciones de r2-r3 en un diagrama de montaje plano del romboencéfalo. Las neuronas que proyectan de forma ipsi y contralateral, siguiendo el fascículo longitudinal medio (FLM) se muestran en color negro; las neuronas ipsi y contralaterales que proyectan en el fascículo longitudinal lateral (FLL), se muestran en color blanco. Las neuronas reticuloespinales proyectan hacia blancos específicos localizados en la médula espinal (Glover y Petursdottir, 1991). No se muestran las proyecciones ascendentes y todas las poblaciones son simétricas, pero para su simplicidad sólo se muestran las de un lado del romboencéfalo. El diagrama también muestra el origen de los explantes utilizados para los cultivos en geles de colágena para estudiar las proyecciones longitudinales, el explante de r2-r3 y el istmo. La flecha negra muestra el sitio entre r4 y r5 donde se aplicó el marcador fluorescente Dil al FLM para marcar de forma retrógrada las neuronas del explante de r2-r3 de proyección caudal. Se muestran también un diagrama de un explante de romboencéfalo rostral (B) y uno similar cocultivado junto con el istmo (C). Las líneas punteadas en (B) indican la forma como fue dividido el explante en cuadrantes. El crecimiento rostral y caudal se encuentran indicados en los bordes rostral y caudal del explante, respectivamente. Mes- mesencéfalo; I- istmo; r1-r6, rombómeros 1-6; PP- placa del piso. (A) Figura adaptada de Clarke y Lumsden, 1993.

Algunos explantes de rombómera 2 y 3 fueron marcados de forma retrógrada con Dil antes del cultivo. Basados en su trayectoria normal *in vivo*, los axones reticuloespinales de r2 y r3 deberían proyectar por el borde caudal de r3 a ambos lados de la placa del piso (PP). Para evaluar esto, las neuronas reticuloespinales del explante de r2 y r3 fueron marcadas retrógradamente a nivel de la unión de r4-r5 con Dil antes de la obtención del explante. Aplicando el Dil en este nivel, nos

aseguramos que las neuronas marcadas en r2-r3 eran sólo aquellas que presentaban una proyección longitudinal caudal. Los embriones fueron cultivados hasta que el marcador llegó a la r3, en este momento, se obtuvieron los explantes de r2-r3 y fueron cultivados en geles de colágena. Los cultivos fueron analizados usando microscopía confocal ensamblando imágenes con intervalos de 5-10  $\mu\text{m}$ . Los axones fueron contados de la misma forma como se describió anteriormente.

Para determinar el efecto del istmo en el ángulo de crecimiento de los axones en los explantes en cultivo, se realizaron cultivos en los que el istmo fue colocado perpendicular al borde caudal del explante de r2-r3. En esta configuración el lado más cercano al istmo se afectó más que el otro. Posteriormente, se obtuvieron imágenes en cámara lúcida de los bordes caudales de los explantes usando microscopía de contraste de fases. Las imágenes digitales de los dibujos se importaron a un programa de gráficos, donde fueron añadidas líneas rectas sobre la proyección del tercio distal de los axones en crecimiento. El ángulo de cada una de las líneas se midió de manera digital con relación al borde caudal del explante; la media de los ángulos fue determinada para cultivos en presencia o ausencia de explantes del istmo. Se realizaron comparaciones estadísticas para las medias de los ángulos mediante la prueba  $t$  ( $P=0.05$ ).

#### **4. Microcirugías en embriones de pollo.**

Las microcirugías fueron realizadas en embriones de pollo en estadio HH12. Se realizó una ventana en el cascarón del huevo con tijeras curvas y se inyectó tinta china al 10% en PBS por debajo de la yema para visualizar al embrión. Las cirugías implicaron cortar de forma transversal en el romboencéfalo a nivel de la unión de la rombómera 1 con la 2, separando el istmo del romboencéfalo restante o seccionando completamente el mesencéfalo a niveles rostrales o caudales. En cada caso, una pequeña banda de tejido se removió para asegurar que los dos extremos del neuroepitelio no se unieran nuevamente. Después de la cirugía, se agregaron algunas gotas de solución Ringer, conteniendo penicilina-estreptomicina a una dilución de 1:50. Las gotas fueron colocadas encima del embrión, la pieza del cascarón removida fue colocada nuevamente, sellándola con cinta adhesiva.

Después, los huevos operados fueron incubados por 2 días en una incubadora humidificada a 39 °C hasta que los embriones alcanzaron los estadios HH19 a 22. Sólo aquellos embriones con una apariencia normal después de los 2 días de incubación se analizaron y después se usaron para realizar marcaje axonal retrógrado de neuronas motoras o reticuloespinales, para hibridación *in situ* o para inmunohistoquímica para GAD. Las neuronas reticuloespinales marcadas en cada mitad de las rombómeras 2, 3 y 4 se contaron en microscopía de fluorescencia y se hicieron comparaciones entre los grupos utilizando la prueba *t* de *student* ( $P \leq 0.05$ ).

### **5. Marcaje axonal retrógrado de axones reticuloespinales.**

Para llevar a cabo el marcaje de la proyección caudal de las neuronas reticuloespinales romboencefálicas se utilizaron embriones de rata de E14.5. Los embriones se fijaron a una superficie de silicón y sumergidos en solución Ringer. Se expuso la cara ventral del romboencéfalo y se realizó una sección ventral del neuroepitelio a nivel del límite entre la rombómera 4 y rombómera 5 con una aguja de tungsteno, seguido por la aplicación local de 1  $\mu$ l de solución de Dil (0.5% en DMSO; Molecular Probes, Inc., Eugene, OR). A continuación se incubó por 2 horas a 37 °C y con CO<sub>2</sub> al 5%, después de este lapso, se obtuvieron los explantes de rombómera 2 y 3 (r2 y r3) para ser cultivados en geles de colágena como se describió anteriormente. Para marcar con dextrán conjugado con rodamina (10,000 M.W., Molecular probes, Inc.), los embriones fueron fijados a la superficie de silicón y se colocó un cristal de dextrán en un corte transversal realizado a nivel de la rombómera 5. A continuación, los embriones se incubaron durante 3 horas a 30 °C en solución Ringer con una mezcla de gases de O<sub>2</sub> al 95% y CO<sub>2</sub> al 5% (Auclair, Marchand y Glover, 1999). Después del período de incubación, se obtuvieron los explantes de r2 y r3 para ser cultivados en geles de colágena en presencia o ausencia de istmo. Después de 24 horas de cultivos se obtuvieron fotomicrografías en el microscopio confocal a intervalos de 10  $\mu$ m y se contaron los cuerpos celulares marcados en el neuroepitelio. La media del número de células marcadas por explante de los cultivos control y de los cultivados en presencia de istmo fueron comparados estadísticamente mediante la prueba *t* de *student* ( $P=0.05$ ).

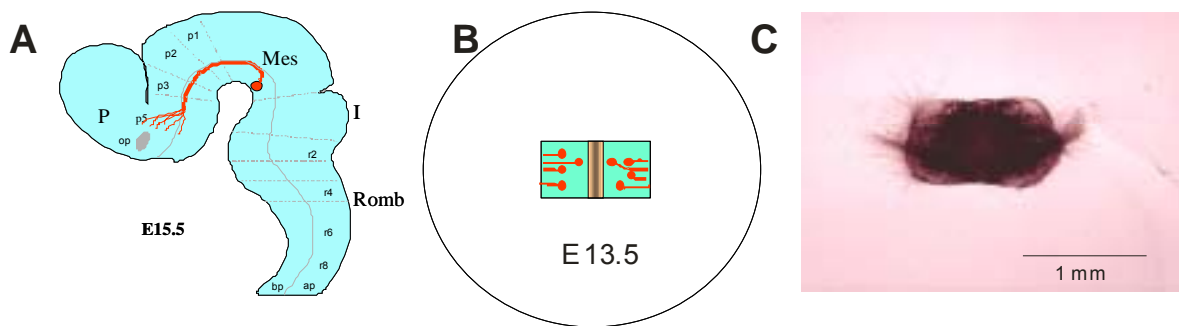
El marcaje de neuronas reticuloespinales romboencefálicas en embriones de pollo usando dextrán conjugado con rodamina y FITC se realizó de la siguiente manera: los embriones se fijaron a una superficie de silicón y sumergidos en medio D-MEM y se realizó un corte transversal a nivel de r6-r7, aplicando inmediatamente el dextrán fluorescente utilizando unas pinzas finas. Para marcar el ganglio del trigémino se realizó también la aplicación del dextrán fluorescente en el sitio de corte del ganglio del trigémino. Después del marcaje, los embriones fueron incubados por 2 horas en el mismo medio a 37 °C en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% y posteriormente fijados con paraformaldehído al 4.5%. Este método de marcaje fue utilizado para visualizar a las neuronas reticuloespinales y motoras del trigémino después de las microcirugías *in ovo*.

## **6. Sistema de cultivo para el crecimiento de axones dopaminérgicos.**

El desarrollo de un método adecuado de cultivo fue de gran importancia ya que nos permitió evaluar la actividad quimiotrópica de los explantes utilizados. En este trabajo se utilizaron cultivos en geles de colágena. Esta es una matriz semisólida que proporciona un sustrato permisivo para el crecimiento axonal y la formación de gradientes de moléculas difusibles con propiedades quimiotrópicas (Guthrie y Lumsden, 1994) para los propósitos descritos en las siguientes secciones. Como fuente de neuronas dopaminérgicas de proyección ascendente se utilizó el núcleo mesencefálico dopaminérgico del mesencéfalo caudal y ventral (Fig. 3A). Una vez obtenidos los explantes dopaminérgicos, fueron montados en un gel de colágena y se mantuvieron en cultivo por 48 horas. En un ensayo típico en las cajas de cultivo de 4 pozos, se ponen 30 µl del gel, esparciéndose hasta formar un disco de aproximadamente 6 mm de diámetro y se deja solidificar 15 minutos en la incubadora. Al término de este tiempo, las cajas se encuentran listas para montar el cultivo, para ello, los explantes ya cortados que se encuentran en solución Ringer se toman con una micropipeta, se colocan sobre el gel de colágena y se extrae el exceso de líquido (Fig. 3B). Posteriormente, se colocan 30 µl de la mezcla de colágena sobre los explantes y se esparce de forma uniforme sobre la superficie del gel que se colocó al inicio, cubriendo por completo los explantes. Por último, se



mantienen 15 minutos en la incubadora para permitir la solidificación de esta segunda capa de gel. Transcurrido este tiempo, se colocan 200  $\mu$ l del medio de cultivo Opti-Mix y se incuban por 48 horas a 37 °C en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%. Al terminar este lapso, los cultivos son fijados con paraformaldehído al 3.5% dentro de las mismas cajas de cultivos de 4 pozos (Fig. 3C). El crecimiento de las neuritas se visualizó mediante la inmunotinción contra tirosina hidroxilasa que nos permitió analizar a las neuritas dopaminérgicas. En algunos experimentos se añadieron 100  $\mu$ g/ml de medio, de anticuerpos específicos contra los receptores a npn-1 y npn-2.



**Figura 3. Cultivos en geles de colágena para axones dopaminérgicos mesencefálicos.** Para cultivar los explantes del núcleo dopaminérgico se realizó un corte que incluyera ambos núcleos y se cultivó en geles de colágena que permiten el crecimiento de las neuritas dopaminérgicas.

## 7. Identificación del tejido fuente de moléculas quimiotrópicas para axones dopaminérgicos mesencefálicos.

Se hicieron cultivos en geles de colágena de explantes del núcleo de las NDM junto con explantes de otras partes del tubo neural. De este modo, se evaluó el efecto de distintas partes del tubo neural sobre el crecimiento de las neuritas dopaminérgicas. En caso de que el explante produjera moléculas quimiorrepelentes, éstas difundirían por el gel, creando un gradiente de concentración que inhibiría o desviaría el crecimiento de las neuritas dopaminérgicas; si se produjesen moléculas quimioatrayentes, el crecimiento se vería favorecido en dirección hacia la fuente de las moléculas atrayentes. Se utilizaron explantes de regiones cercanas al núcleo de las NDM, zonas de las rutas

de proyección y su blanco final. Tomando en cuenta la disposición anatómica del núcleo dopaminérgico, se esperaba que las regiones caudales, como el istmo, repelieran el crecimiento y las rostrales, lo atrajeran.

## Estrategia experimental

### a) Proyección reticuloespinal romboencefálica

Para identificar el papel de la región del istmo sobre la proyección caudal de las neuronas reticuloespinales romboencefálicas realizamos inicialmente cultivos en geles de colágena de explantes de istmo junto con explantes de romboencéfalo rostral (rombómeras 2 y 3, r2-r3), las cuales contienen grupos de neuronas reticuloespinales de proyección caudal en crecimiento. Para llevar a cabo el **Objetivo 1** cultivamos el borde caudal del explante romboencefálico junto al istmo, cultivamos durante dos días y analizamos el efecto de la presencia del istmo sobre el número de neuritas creciendo en el borde caudal del explante.

Para el **Objetivo 2** se realizaron técnicas de inmunohistoquímica para identificar poblaciones neurales que fueran afectadas por el istmo. Utilizamos anticuerpos contra sustancia P, GAD, serotonina y noradrenalina para identificar distintas poblaciones neurales y evaluar el efecto del istmo sobre ellas.

Una vez que se determinó el efecto del istmo sobre el crecimiento caudal de neuronas reticuloespinales romboencefálicas en cultivos *in vitro*, se realizaron microcirugías en embriones de pollo para evaluar el efecto de la ausencia del istmo sobre la proyección reticuloespinal romboencefálica *in vivo*, cumpliendo con el **Objetivo 3**. En este experimento se seccionó el tubo neural a nivel de la unión del istmo con la rombómera 2, provocando una falta de continuidad entre el istmo y el romboencéfalo rostral. Como parte de este objetivo también se realizó un corte a nivel de mesencéfalo caudal, separando el NIC (inicio más rostral del FLM) del romboencéfalo y permitiendo la continuidad entre el istmo y el romboencéfalo rostral, esto permitió evaluar el efecto de la ausencia del tracto pionero sobre la proyección caudal de las neuronas reticuloespinales romboencefálicas.

### b) Proyección nigroestriatal mesencefálica

Para evaluar el efecto sobre el crecimiento neurítico causado por las zonas adyacentes al núcleo de las NDM se utilizaron cultivos en geles de colágena. Esta matriz semisólida permite el crecimiento neurítico y la formación de gradientes

químicos. Los cultivos incluyeron al núcleo bilateral de las NDM junto con explantes de diversas regiones del cerebro en desarrollo. Al término de los cultivos, se realizó inmunohistoquímica contra la hidroxilasa de tirosina. Esto nos permitió evaluar el efecto causado por los explantes experimentales sobre el crecimiento dopaminérgico.

Para llevar a cabo el **Objetivo 4**, se utilizaron embriones de ratas Wistar de 13.5 ó 14.5 días de gestación de los cuales se obtuvieron explantes del núcleo de la sustancia nigra y de las zonas adyacentes a ella, como el istmo y las prosómeras caudales. Se cocultivaron por dos días en geles de colágena para determinar el efecto causado por cada explante sobre el crecimiento de las neuritas dopaminérgicas.

Para el **Objetivo 5**, se realizaron hibridaciones *in situ* utilizando sondas para neuropilina-2, semaforina 3A, 3C, 3E y 3F. Las sondas disponibles para las semaforinas son de ratón, por lo que se tomaron en cuenta los estadios equivalentes en rata. Esto nos permitió identificar aquellas semaforinas cuyo patrón sugiere una función de acuerdo a los resultados del Objetivo 4.

Cuando se identificaron a los candidatos a ejercer los efectos quimiotrópicos sobre el crecimiento dopaminérgico, estos fueron expresados en células HEK293. Se realizaron transfecciones de vectores de expresión para las semaforinas 3A, 3C y 3F, se hicieron agregados de estas células y se cocultivaron junto con explantes del núcleo de la sustancia nigra. Esto permitió evaluar el efecto específico de estas moléculas sobre el crecimiento neurítico como se plantea en el **Objetivo 6**.

Una vez identificadas las semaforinas que presentaban una actividad quimiotrópica *in vitro*, se realizaron ensayos en los cuales se bloquearon los receptores que median su respuesta. Estos ensayos se realizaron en cultivos de las NDM junto con explantes de p1r, de estriado y con agregados celulares transfectados con las semaforinas. Con esto se cumplió el **Objetivo 7**.

## RESULTADOS

### Axones reticuloespinales romboencefálicos

#### 1.- El istmo presenta una actividad difusible que inhibe el crecimiento caudal de axones romboencefálicos.

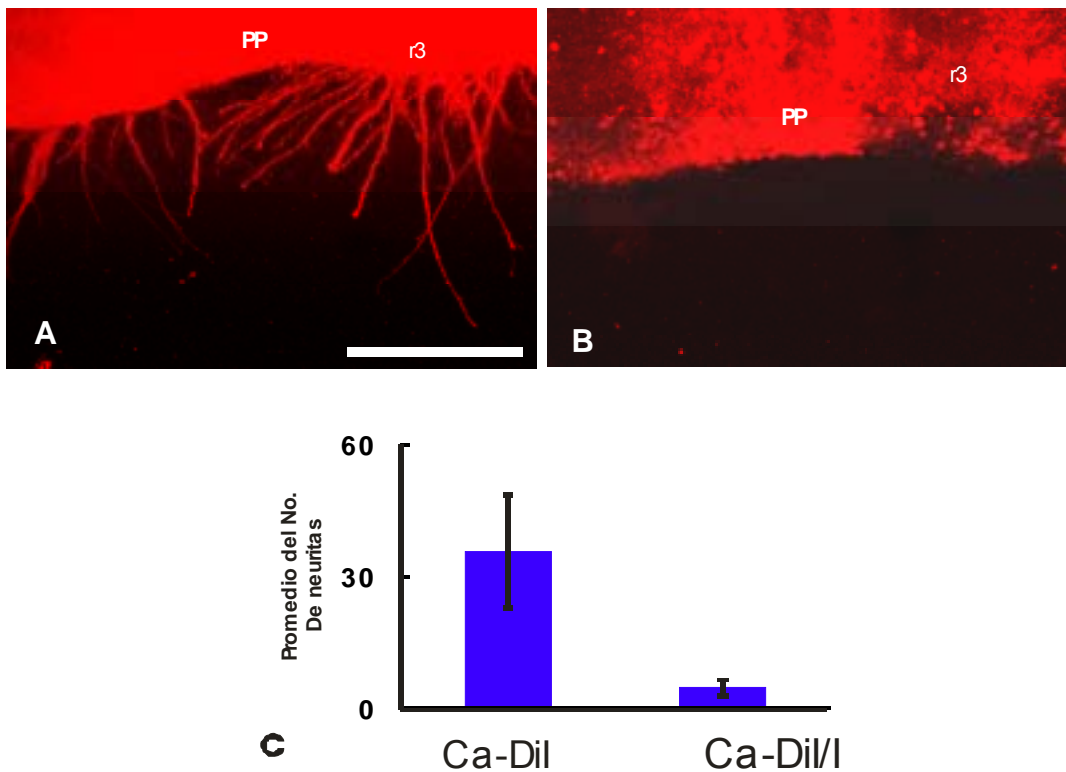
Para evaluar si existen señales moleculares difusibles que orienten el crecimiento caudal de axones romboencefálicos, se cultivaron en geles de colágena, explantes de r2 y r3 provenientes de embriones de rata de E14.5 (Fig. 2B). El gel de colágena es una matriz semisólida que permite el crecimiento de neuritas y el establecimiento de gradientes de moléculas quimiotrópicas.

Cuando estos explantes fueron cultivados por 48 horas, hubo un crecimiento neurítico abundante en todos los bordes del explante. Basados en su trayectoria normal *in vivo*, los axones reticuloespinales de r2 y r3 deberían proyectar por el borde caudal de r3 a ambos lados de la placa del piso. Cuando se realizó el marcaje axonal retrógrado con Dil se observó que las neuronas marcadas proyectaron exclusivamente por el borde caudal del explante romboencefálico, las neuronas marcadas constituyeron sólo el 10% del crecimiento total de este borde caudal. Los axones marcados fueron axones en regeneración, mientras que es muy probable que el resto sean axones de neuronas que aún no habían iniciado su proyección al momento del marcaje.

Estos resultados sugieren que los axones que proyectan caudalmente *in vivo* lo hacen de la misma forma *in vitro* e indica que el explante de r2-r3 mantiene su polaridad rostrocaudal. Las regiones del neuroepitelio que podrían producir señales quimiotrópicas para la proyección longitudinal de axones romboencefálicos en r2-r3 incluyen a zonas rostrales a la r2 y caudales a la r3 (Fig. 2C). Cuando se evaluó el efecto de la r8 ó de la médula espinal cervical sobre el crecimiento del borde caudal del explante de r2-r3, no se encontró ninguna diferencia significativa en comparación con los explantes control, lo que refleja que esta zona no ejerce ningún efecto quimiotrópico (Fig. 5E).

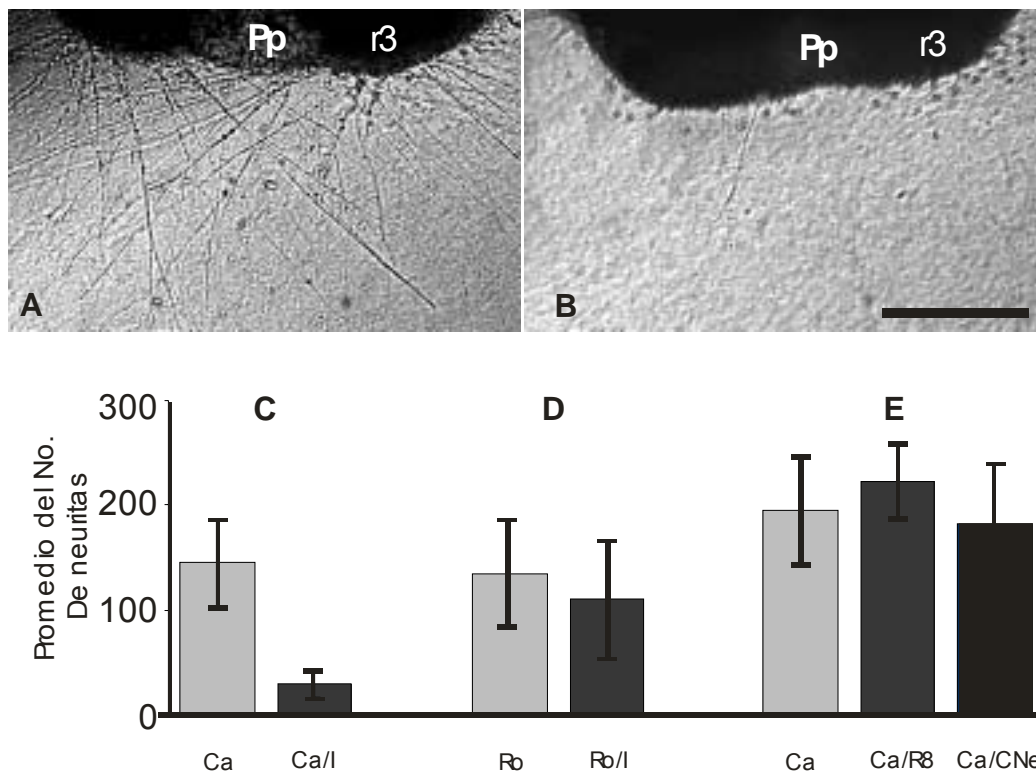
Para evaluar el efecto del istmo como fuente de señales guía, se cocultivó cerca del borde caudal del explante de r2-r3, el cual había sido marcado con Dil

(Fig. 4A). En estos experimentos, el crecimiento de axones del borde caudal del explante romboencefálico disminuyó drásticamente en comparación con los controles y las neuritas marcadas con Dil también se inhibieron de forma significativa ( $P \leq 0.05$ ) (Fig. 4B). La cuantificación de axones no marcados mostró una disminución del crecimiento caudal del 80% (Fig. 4C). Esto sugiere que la región del istmo podría ser una fuente de señales difusibles inhibitoras o repulsivas para axones romboencefálicos de proyección caudal *in vivo* (Fig. 5A y 5B), sin embargo, la activación indirecta de otros mecanismos moleculares también podría explicar estos resultados.



**Figura 4. Crecimiento axonal de explantes marcados con Dil.** (A) Crecimiento axonal del borde caudal de un explante de r2-r3 conteniendo las neuronas de proyección caudal que fueron marcadas retrógradamente previo al cultivo. (B) Crecimiento del borde caudal de un explante de r2-r3 marcado con Dil cocultivado junto con un explante de istmo. (C) Efecto del explante de istmo sobre el crecimiento caudal de neuritas marcadas con Dil. Ca-Dil= cultivos control marcados con Dil (n= 15); Ca-Dil/I= explantes marcados con Dil cocultivados junto con el istmo (n=14). Barra, 200  $\mu$ m.

Para evaluar si el efecto inhibitorio mostrado por el istmo es específico para axones de crecimiento caudal (Fig. 5C), se realizaron cultivos en los cuales el istmo se cultivó junto al borde rostral del explante de r2-r3. Como el crecimiento del borde rostral del explante romboencefálico podría corresponder a axones que *in vivo* se dirigen hacia el istmo, no se esperaba que el istmo causara una disminución del crecimiento neurítico en este borde (Fig. 5D). Los resultados no mostraron efecto alguno. Esto indica una especificidad para el borde caudal e implica que el istmo podría ser responsable de la orientación de las proyecciones longitudinales en sentido caudal a través de un mecanismo repulsivo o inhibitorio.



**Figura 5. El istmo inhibe el crecimiento caudal de los axones romboencefálicos de proyección caudal.** Explantes de romboencefalo rostral (r2-r3) fueron cultivados solos (A) o junto con explantes de istmo (B). Los resultados de los experimentos de los cultivos control y cocultivos son mostrados en (C) (Ca, crecimiento caudal del cultivo control, n=46; Ca/I, crecimiento caudal en presencia de istmo, n=41), (D) (Ro, crecimiento rostral del cultivo control, n=22; Ro/I, crecimiento rostral en presencia de istmo, n=22) y (E) (Ca, crecimiento caudal del cultivo control, n=14; Ca/r8, crecimiento caudal en presencia de r8, n=7; Ca/CNe, crecimiento caudal en presencia de neuroepitelio cervical, n=14).

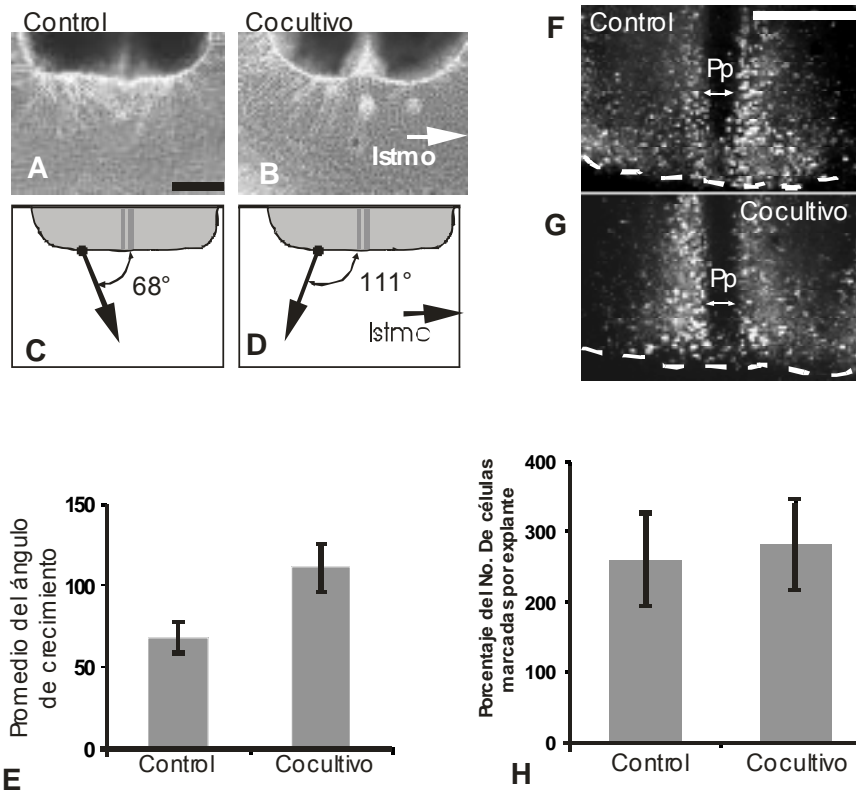
La actividad repulsiva también podría causar un cambio en la dirección del crecimiento de axones de proyección caudal en adición a los efectos de inhibición descritos. Para distinguir entre estas dos posibilidades, se realizaron cultivos en los que el istmo fue colocado perpendicular al borde caudal del explante de r2-r3 (Fig. 6A y 6B). En esta configuración el lado más cercano al istmo es más afectado que el otro. Al comparar el ángulo medio de los axones del lado más lejano al istmo, encontramos que el ángulo de crecimiento del borde caudal de r2-r3 fue diferente en presencia del istmo. La media de los ángulos en los controles fue de  $68^\circ$  (Fig. 6C), mientras que en presencia del istmo, fue de  $111^\circ$  (significativo,  $P \leq 0.05$ ) (Fig. 6D) indicando un cambio en el ángulo de crecimiento, alejándose del istmo (Fig. 6E).

La evidencia sugiere que la región del istmo secretaría moléculas quimiorrepulsivas que participarían en el control de las proyecciones descendentes del rombencéfalo. Esta actividad podría ser la misma que causa inhibición del crecimiento caudal del explante de r2-r3, cuando el borde caudal de r3 es confrontado con la región del istmo en los cultivos *in vitro*.

Experimentos adicionales se llevaron a cabo para descartar que el istmo tuviera efectos negativos en la sobrevivencia de las neuronas reticuloespinales en los explantes de r2-r3. Neuronas reticuloespinales de embriones de rata de E14.5 fueron marcados retrógradamente de forma bilateral mediante la aplicación de dextrán rodamina a nivel de r5 por 3 horas. Al término de este período, el marcador había viajado hasta llegar a la región del istmo, asegurando que el marcaje del explante de r2-r3 había sido completo. Después se obtuvo el explante de r2-r3 y se cultivó solo o con el istmo junto al borde caudal de r3. Después del período de incubación, se contabilizó el número total de cuerpos celulares marcados en todos los explantes de r2-r3. Después del cultivo, encontramos marcaje de forma predominante en dos columnas a cada lado de la placa de piso. En caso de que el istmo afectara la sobrevivencia de las neuronas reticuloespinales, se vería una disminución en el número de células marcadas en los cultivos de r2-r3 con istmo. Los resultados no mostraron diferencias en la media de células marcadas para ambos experimentos (Fig. 6F y 6G). Esto indica



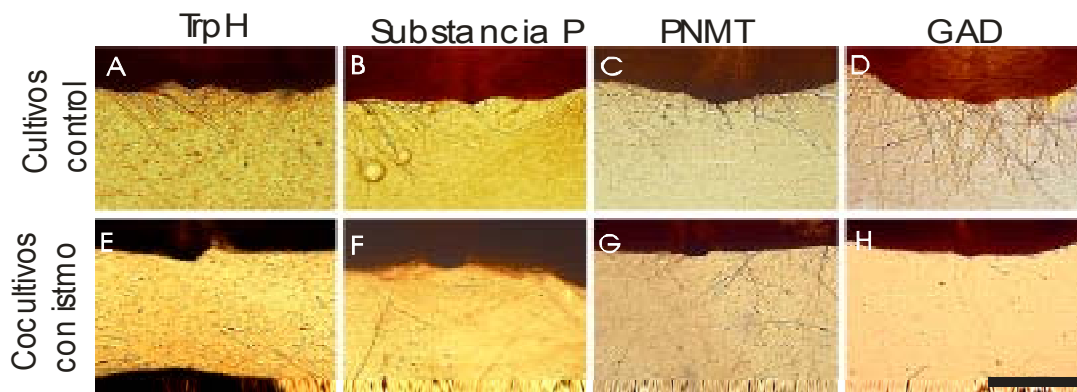
que el istmo no ejerce efectos negativos en la sobrevivencia de las neuronas reticuloespinales (Fig. 6H) y apoya la idea de que los efectos de los experimentos anteriores, afectan específicamente el crecimiento axonal.



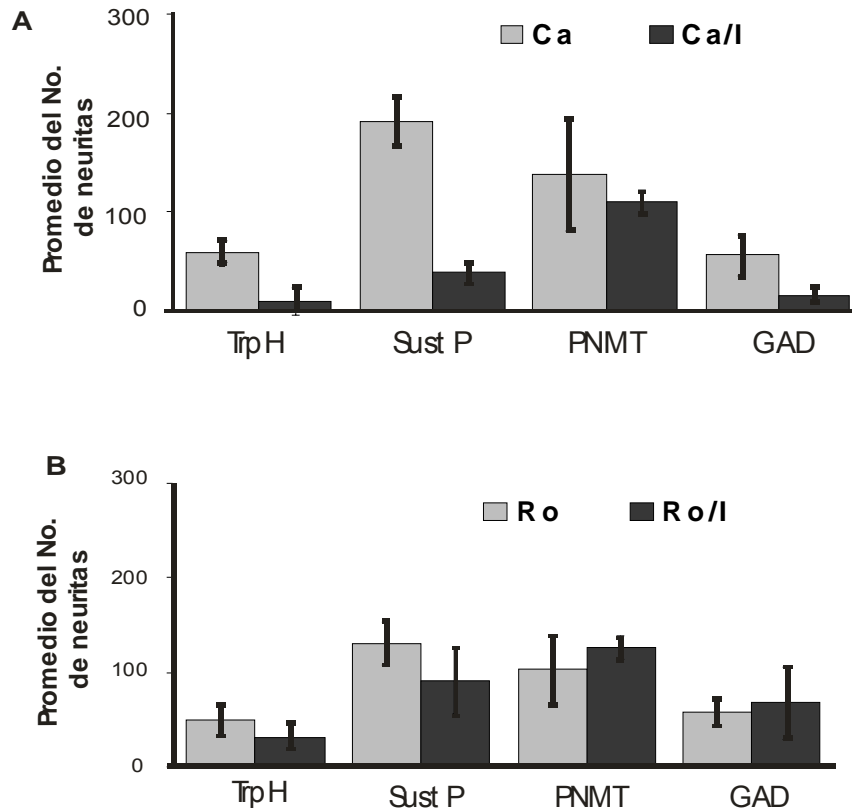
**Figura 6. El istmo repele el crecimiento caudal de los explantes de romboencéfalo rostral (A-E).** Explantes de romboencéfalo fueron cultivados solos (A) o junto con explantes de istmo colocados a un lado y perpendiculares al borde caudal de r3 (al lado derecho del explante en B). En esta configuración, el borde de r3 no fue confrontado con el istmo y uno de los lados (derecho) estuvo más cerca de su influencia que el lado contralateral (izquierdo). Se midieron los ángulos de los axones en crecimiento de la mitad izquierda del borde de r3 tanto en los cultivos control como en los cultivados junto con el istmo y el promedio se muestra en (C) y en (D), controles y cocultivos respectivamente. En (E), control n= 12 y cocultivo n= 12. **El istmo no ejerce efectos negativos sobre la sobrevivencia de las neuronas reticuloespinales (F-H).** Las neuronas reticuloespinales fueron marcadas retrógradamente en el FLM a nivel de r5 con dextrán rodamina. Después del marcaje, se obtuvieron explantes de r2-r3 y se cultivaron solos o junto con explantes de istmo como se muestra en la figura 1. Después de 48 horas de cultivo, se obtuvieron imágenes confocal y se contó el número total de cuerpos celulares marcados en cada uno de los explantes. (F) explante control. (G) explante cocultivo junto con el istmo. En (H), control n= 9. Escala 250  $\mu$ m. La barra en (A) aplica también en (B). La barra en (F) aplica también en (G).

## 2.- El istmo inhibe el crecimiento de neuritas de poblaciones específicas.

Para evaluar si el istmo tenía efectos sobre poblaciones neuronales distintas a las neuronas reticuloespinales, realizamos cultivos en geles de colágena similares a los anteriores, seguidos de inmunohistoquímica con anticuerpos para identificar distintas poblaciones neuronales (Fig. 7). Los anticuerpos dirigidos contra la triptófano hidroxilasa (TrpH) y para la sustancia P, fueron usados para identificar neuronas del rafe (Parent, 1996), el anticuerpo contra feniletanolamina-N-metiltransferasa (PNMT) se usó para neuronas adrenérgicas y el anticuerpo contra la glutamato descarboxilasa para identificar neuronas del rafe y del sistema reticular (Parent, 1996). En cultivos en geles de colágena, el crecimiento caudal de neuronas positivas para TrpH (Fig. 7A y 7E), sustancia P (Fig. 7B y 7F) y GAD (Fig. 7D y 7H) se inhibieron por el explante de istmo (significativo,  $P \leq 0.05$ ), mientras que las neuritas positivas para PNMT no se inhibieron de forma significativa (Fig. 7C y 7G). Los resultados sugieren que el istmo inhibe el crecimiento de proyecciones reticulares y de neuronas del rafe pero no a neuronas adrenérgicas (Fig. 8A). El crecimiento rostral de los cuatro tipos de neuritas no fue afectado por el istmo (Fig. 8B). Así, el efecto del istmo es específico para algunas subpoblaciones neuronales, basado en los patrones anatómicos de proyección y en el fenotipo del neurotransmisor.



**Figura 7. El istmo inhibe el crecimiento caudal de neuronas positivas a serotonina, sustancia P y adrenalina.** Explantes de romboencéfalo (r2-r3) fueron cultivados solos o junto con explantes de istmo adyacentes al borde caudal o rostral de los explantes romboencefálicos. Después del cultivo, se realizó inmunohistoquímica con anticuerpos contra triptófano hidroxilasa (TrpH), sustancia P, feniletanolamina-N-metiltransferasa (PNMT) y descarboxilasa del ácido glutámico (GAD). (A-D) El crecimiento del borde caudal de r3 en los controles. (E-H) Crecimiento del borde caudal de r3 cultivados junto con explantes de istmo. (Barra 250  $\mu$ m).



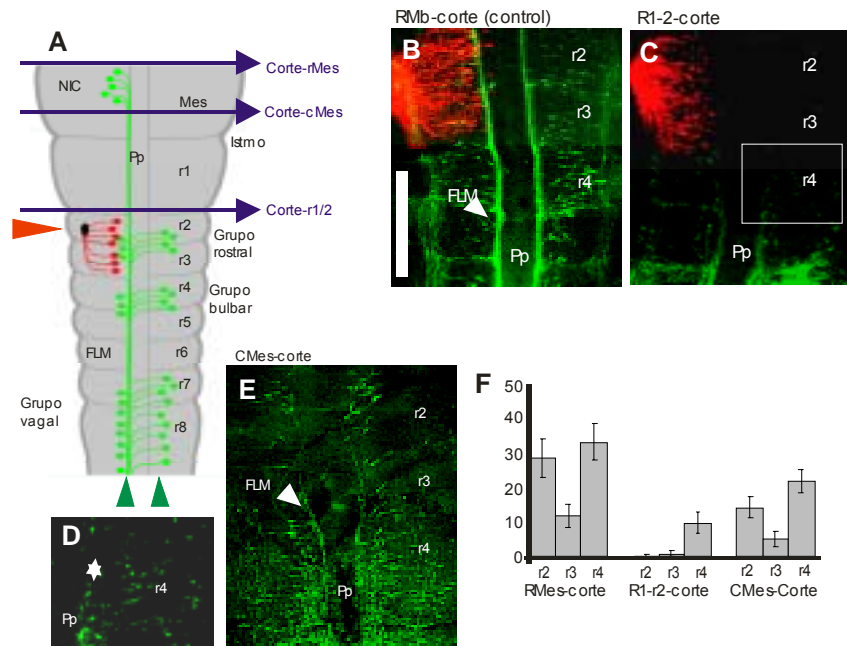
**Figura 8. El istmo inhibe el crecimiento caudal de poblaciones neuronales específicas del romboencéfalo.** (A) Efecto del istmo sobre el crecimiento caudal de neuritas romboencefálicas positivas para triptófano hidroxilasa (TrpH), sustancia P (Sust P), feniletanolamina-N-metiltransferasa (PNMT) y glutamato descarboxilasa (GAD). (B) Efecto del istmo sobre el crecimiento rostral de las poblaciones romboencefálicas definidas en (A). La barra de la izquierda de cada par muestra el promedio de crecimiento de los cultivos control de explantes de r2-r3 (Ca, crecimiento caudal; Ro, crecimiento rostral). La barra del lado derecho muestra el promedio de crecimiento de los cocultivos de r2-r3 junto con el istmo (Ca/I y Ro/I). La *n* para cada set de experimentos fue de: crecimiento caudal: TrpH (14, 14), sustancia P (14, 14), PNMT (14, 14) y GAD (15, 15); crecimiento rostral: TrpH (15, 15), sustancia P (16, 16), PNMT (15, 15) y GAD (14, 14).

### 3.- Las proyecciones caudales del romboencéfalo proyectan de forma aberrante en ausencia del istmo.

Los resultados anteriores indican que el istmo secreta moléculas que inhiben el crecimiento de neuronas de proyección caudal en el romboencéfalo rostral *in vitro*. Para determinar si la presencia del istmo es requerida para la proyección correcta de los axones reticuloespinales *in vivo*, se realizaron cirugías *in ovo* en

embriones de pollo eliminando la región del istmo. Para prevenir la difusión de moléculas del istmo al romboencéfalo rostral, el tubo neural de embriones de pollo del estadio HH12 fue seccionado completamente en la unión de r1 y r2 y se removió una banda de tejido, evitando que la regeneración del tubo neural uniera los dos extremos (Fig. 9A). Así, la operación separa la región del istmo del romboencéfalo caudal en un estadio en que las neuronas reticuloespinales no han proyectado. A los animales control les fue seccionado el tubo neural a nivel más rostral de la unión del mesencéfalo con el diencefalo. Después de las operaciones, los embriones se cultivaron hasta el estadio HH19-22; se seleccionaron los embriones que tuvieran un aspecto normal y con una discontinuidad del tubo neural a nivel del corte. Cuando se marcó el FLM a nivel de la unión de r6-r7 tanto en los controles como en los operados, las neuronas reticuloespinales de los animales control se localizaron en los niveles rostral y bulbar como se describió previamente (Fig. 9A) (Glover y Petursdottir, 1988; Auclair et al., 1999). El FLM marcado podía ser observado a ambos lados de la placa del piso, mientras que los cuerpos celulares se encontraban alineados transversalmente a lo largo del eje longitudinal del tubo neural (Fig. 9B). En la mayoría de los embriones con secciones a nivel de la unión r1-r2, no se detectó marcaje en las neuronas reticuloespinales a nivel de r2 y r3 aún cuando la estructura de las rombómeras presentaba un aspecto normal. A nivel de la r4, el número de neuronas marcadas se encontraba reducido en un 70% y la proyección de los axones presentaba alteraciones (Fig. 9C). Las neuronas reticuloespinales de r5 y r6 se marcaron frecuentemente y presentaban una proyección normal. Estos resultados sugieren que en ausencia del istmo, las neuronas reticuloespinales del romboencéfalo rostral fallan en enviar su proyección caudal, mientras que las neuronas reticuloespinales localizadas caudalmente en el romboencéfalo mantienen su proyección normal. Existen también otras explicaciones posibles para los resultados obtenidos: a) es posible que la falta de istmo pueda causar de forma secundaria, una falla en la proyección reticuloespinal en sentido caudal, debido a una alteración en el patrón de desarrollo a nivel de r2-r4 y por ende la diferenciación de las neuronas reticuloespinales, o b) que se afecten el

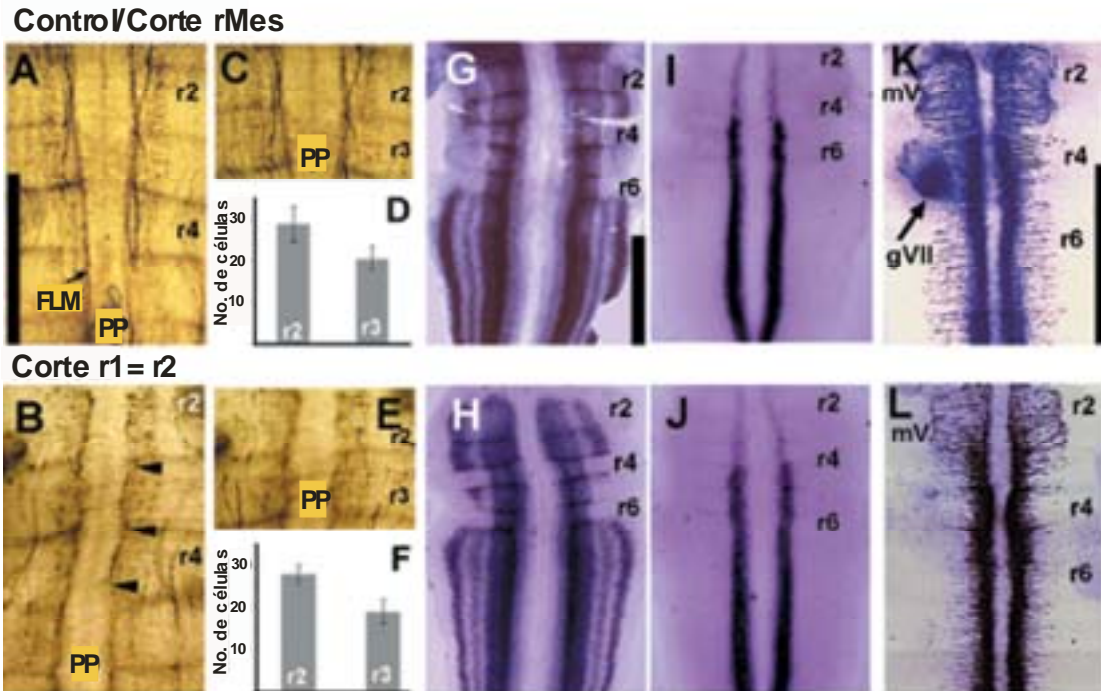
crecimiento y guía de tractos axonales descendentes del mesencéfalo que podrían servir como tractos pioneros para los axones reticuloespinales.



**Figura 9. Las neuronas reticuloespinales romboencefálicas fallan en su proyección caudal en ausencia de las señales derivadas del istmo.** El tubo neural de embriones de pollo en estadio HH 12 fue seccionado *in ovo* en uno de los tres niveles axiales para evaluar el efecto del istmo en la proyección caudal de las neuronas reticuloespinales. Después de la operación, los embriones fueron sellados e incubados por dos días más, al término, se realizó marcaje axonal retrógrado de las neuronas reticuloespinales y de las neuronas motoras del trigémino. (A) Diagrama del romboencéfalo en montaje plano que muestra las líneas azules horizontales en los niveles axiales del tubo neural donde fueron realizados los cortes *in ovo*. A pesar de que el marcaje fue realizado en embriones estadio HH12, los niveles de los cortes se muestran en un embrión más grande. En las cirugías de control, el corte se realizó rostral al mesencéfalo (corte-RMes). En las cirugías experimentales, el corte se realizó en la unión de r1-r2, separando al istmo y r1 del resto del romboencéfalo (corte-r1/2) o rostral al istmo pero caudal al Núcleo Intersticial de Cajal (NIC) (Corte-cMes). Las flechas de color verde indican el sitio donde se aplicó el dextrán-FITC para marcar retrógradamente a las neuronas reticuloespinales, las cuales se muestran en color verde. Para su simplicidad, sólo se indica el lado izquierdo del FLM. Se muestra al NIC y a los grupos reticuloespinales: rostral, bulbar y vagal (Glover y Petursdottir, 1991). La flecha roja indica el sitio donde se aplicó el dextrán-rodamina para marcar el núcleo motor del trigémino (mV), el cual se extiende en r2 y r3. (B) Cirugía control con un corte rostral al mesencéfalo (corte-rMes); tanto las neuronas reticuloespinales como las del trigémino aparecen normales. (C) Cirugía experimental con el corte en la unión r1-r2 (corte-r1/2). Las neuronas reticuloespinales de r2-r3 no pudieron ser marcadas retrógradamente y el núcleo motor del trigémino aparece normal. El área marcada en r4 aparece en (D) a un mayor aumento y con mayor contraste para mostrar los cuerpos celulares marcados que pierden la organización normal vista en los embriones control. (E) Cirugía control con el corte rostral al istmo y caudal al NIC (corte-cMes). Las neuronas reticuloespinales aparecen normales, pero en menor número en comparación con los controles. (F) Efecto de las transecciones a nivel del tubo neural en las proyecciones reticuloespinales. Después de cada cirugía, las neuronas reticuloespinales marcadas retrógradamente fueron contadas en r2, r3 y r4. N en corte-rMes: 6; corte r1/2: 7; corte cMes: 7. Barra en (B, C, E): 500  $\mu$ m.

Para evaluar la posibilidad de que la falta del istmo en las microcirugías afecta el patrón de desarrollo de las rombómeras rostrales y por tanto la diferenciación o sobrevivencia de las neuronas reticuloespinales, se realizaron los siguientes experimentos. La inmunohistoquímica con anticuerpos contra GAD en embriones HH21 marca una subpoblación de neuronas reticulares (Parent, 1996), éstas presentan de forma predominante proyecciones longitudinales en el romboencéfalo rostral, con un fuerte marcaje del FLM (Fig. 10A y 10C). En este estadio, sólo las neuronas reticuloespinales se encuentran proyectando dentro del FLM (Glover y Petursdottir, 1991). Se pueden observar cuerpos neuronales positivos para GAD en la placa basal a nivel de r2-r4 alineados transversalmente a lo largo del eje del romboencéfalo. Este arreglo es semejante al de los marcajes retrógrados de las neuronas reticuloespinales. También se observaron proyecciones ascendentes desde la parte caudal del romboencéfalo, situadas lateralmente al FLM, mostrando conos de crecimiento (Fig. 10C). En general, la inmunotinción contra GAD marca cuerpos neuronales y axones longitudinales en el FLM que parecen corresponder a las neuronas reticuloespinales y axones longitudinales ascendentes del romboencéfalo caudal. La inmunohistoquímica contra GAD de los embriones de HH21 seccionados en r1-r2, reveló cuerpos neuronales en la porción basal de r2-r3 en un número similar al encontrado en los embriones control (Fig 10D y 10F). Sin embargo, encontramos un desarreglo en el sentido de la proyección; las proyecciones fueron cortas, aberrantes y en diversas direcciones (Fig. 10B y 10 E). Algunos axones muestran proyecciones en círculo, ascendentes y de forma lateral, además de que no se formó la proyección del FLM a nivel de r2-r4. Las proyecciones ascendentes de rombómeras caudales también fueron observadas de forma normal. Estos resultados sugieren que el número de neuronas reticuloespinales diferenciadas es normal en los animales seccionados, pero que los axones fallan al proyectar en su trayectoria normal en ausencia de las señales provenientes del romboencéfalo rostral a r2. Los resultados también muestran que las proyecciones ascendentes de las rombómeras caudales no requieren de las señales rostrales provenientes de r1 ó del istmo para poder proyectar hasta la r2. Estudios realizados en paralelo mostraron que

aproximadamente el 15% de las neuronas ipsilaterales y el 30% de las neuronas contralaterales se tiñen con anticuerpos contra los factores de transcripción Lhx1 y Lhx2, mientras que una subpoblación de neuronas ipsilaterales (13%) expresan Lhx3 (Cepeda-Nieto, Pfaff y Varela-Echavarría, 2005). Para evaluar el efecto de la sección a nivel de r1-r2 en la generación de poblaciones neuronales que incluyen a las neuronas reticuloespinales, realizamos hibridaciones *in situ* para Lhx1 y Lhx3 en embriones seccionados (Fig. 10H y 10J) y encontramos que los patrones de expresión son idénticos a los controles (Fig. 10G y 10 I). Estos resultados sugieren que la diferenciación reticuloespinal no se afecta por la microcirugía. En otro experimento para evaluar la diferenciación neuronal correcta en los embriones, observamos el patrón de proyección del núcleo motor del trigémino, el cual se encuentra a nivel de r2-r3. Realizamos marcaje axonal retrógrado del núcleo motor del trigémino en los embriones seccionados (Fig. 9C) y encontramos que el patrón de proyección es igual al encontrado en los controles (Fig. 9B). Además, la hibridación *in situ* de *Islet-1*, un marcador de neuronas motoras (Tsuchida et al., 1994; Varela-Echavarría, Pfaff y Guthrie, 1996), mostró una distribución normal de las neuronas motoras en los embriones seccionados (Fig. 10K y 10L). Estos resultados sugieren que la microcirugía con sección a nivel de r1-r2 no produce defectos en la diferenciación, y que la ausencia de marcaje de neuronas reticuloespinales en r2-r3 podría ser debida a una guía axonal aberrante. Es decir, las neuronas reticuloespinales se diferencian de forma normal pero fallan al proyectar en sentido caudal.



**Figura 10. La falta del istmo altera la proyección descendente de axones positivos a GAD en el romboencéfalo pero no alteran la expresión de marcadores para neuronas reticuloespinales ni de neuronas motoras.** Se utilizaron inmunohistoquímicas con anticuerpos anti-GAD en embriones control (A,C) y con sección en r1-r2 (B, E). Las imágenes en (A) y en (B) fueron obtenidas enfocándose en los cuerpos celulares positivos a GAD y en el FLM. Las imágenes en (C) y en (E) fueron obtenidas de los mismos especímenes mostrados en (A) y en (B), respectivamente, pero enfocándose en las proyecciones ascendentes. Las flechas en (B) muestran la discontinuidad en las proyecciones longitudinales. Se muestra el número de células positivas a GAD en cada mitad de r2 y r3 en el control (D) y en los embriones seccionados en r1-r2 (F). La *n* fue de: D, 12; F, 9. La hibridación *in situ* fue realizada en embriones seccionados en el mesencéfalo rostral (G, I, K) y en los seccionados en r1-r2 (H, J, L), utilizando sondas para Lhx-1 (G, H), Lhx-3 (I, J) e Islet-1 (K, L). Se indican en cada figura r2, r4 y r6 para referencia. En (E) y (F) se muestran los sitios de salida de los axones motores del trigémino (mV). La flecha en K muestra la localización de un fragmento del ganglio geniculado (gVII) como referencia anatómica. El ganglio se encuentra a nivel de r4, pero debido al proceso del montaje de la pieza aparece en la unión de r4-r5. La barra de escala en (A) (0.5 mm) también aplica en (B), (C) y (E). La barra en (G) (1 mm) también aplica en (H-J). La barra en (K) también aplica en (L).

La segunda posible explicación de los resultados es que las fibras pioneras del FLM que descienden desde el núcleo Intersticial de Cajal (NIC), localizado en la unión del diencéfalo con el mesencéfalo, proveen un substrato para la fasciculación de axones de proyección caudal en el romboencéfalo. Para evaluar el efecto del NIC sobre la proyección de las neuronas reticuloespinales



romboencefálicas se realizó un corte a nivel del mesencéfalo caudal, separando el mesencéfalo caudal del NIC, pero manteniendo la continuidad del istmo con el romboencéfalo rostral. En estos embriones, la proyección caudal de las neuronas reticuloespinales de los niveles r2-r3 se redujo en un 50% y las del nivel r4, en un 30%. Estos experimentos muestran que además de las señales difusibles que provienen del istmo, el FLM interviene en la proyección de las neuronas reticuloespinales.

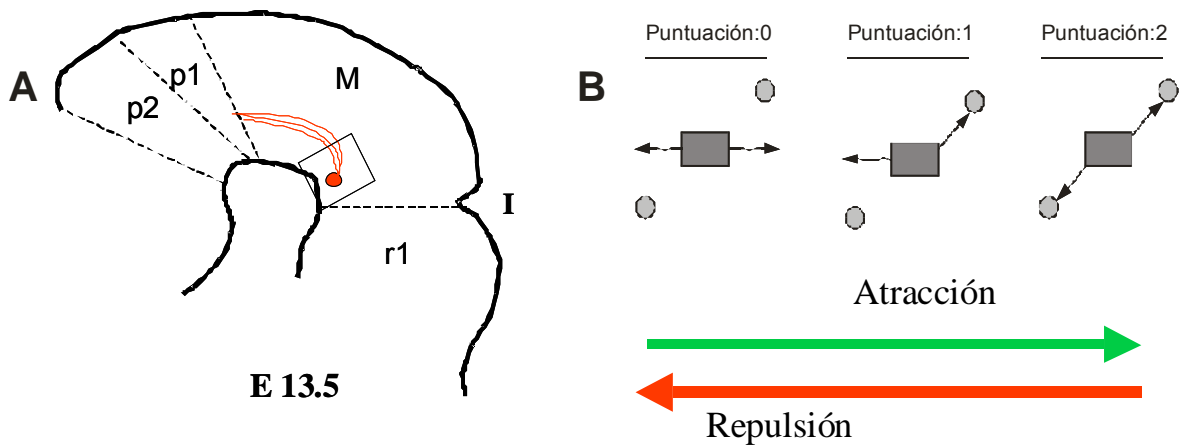
## **Tracto Nigroestriado**

### **1. Sistema de evaluación del efecto quimiotrópico sobre las neuronas dopaminérgicas mesencefálicas (NDM).**

Los cultivos de explantes bilaterales de las NDM mostraron que el crecimiento axonal dopaminérgico *in vitro* ocurre en dos fascículos de axones simétricos en longitud y en ángulo de proyección en relación con el explante. Tomando en cuenta ésto, se diseñó un sistema de cultivo que permitió detectar efectos de atracción ó de repulsión de explantes neuroepiteliales sobre axones dopaminérgicos.

En los cultivos, dos explantes experimentales de la misma región del neuroepitelio se colocaron en una configuración en sentido diagonal con respecto a la línea media de los explantes bilaterales de las NDM como se ilustra en la figura 11B.

Cuando ninguno de los dos fascículos de axones dopaminérgicos de un explante bilateral de las NDM hizo contacto con los explantes experimentales, se dio la calificación de 0; cuando uno solo de los fascículos contactó a uno de los explantes, la calificación fue de 1 y, finalmente, si los dos fascículos dopaminérgicos contactaron ambos explantes, formando una línea diagonal, la calificación fue de 2 (Fig. 11B). Con este sistema, una tendencia a un valor de 0 con respecto a los cultivos control, indica repulsión, mientras que una tendencia a un valor de 2, revela atracción. Con los resultados obtenidos se realizó un análisis no paramétrico con la prueba de Kruskal-Wallis y se analizaron las diferencias entre los grupos mediante una prueba de U de Mann-Whitney. De esta forma, se comparó el efecto de los explantes experimentales sobre el crecimiento de los axones dopaminérgicos.



**Figura 11. Sistema de evaluación del crecimiento dopaminérgico.** El efecto quimiotrópico de los explantes experimentales sobre el crecimiento de neuritas dopaminérgicas fue determinado como se observa en la figura. Un aumento en la frecuencia de calificaciones de cero nos habló de repulsión y el de calificaciones de 2, de atracción.

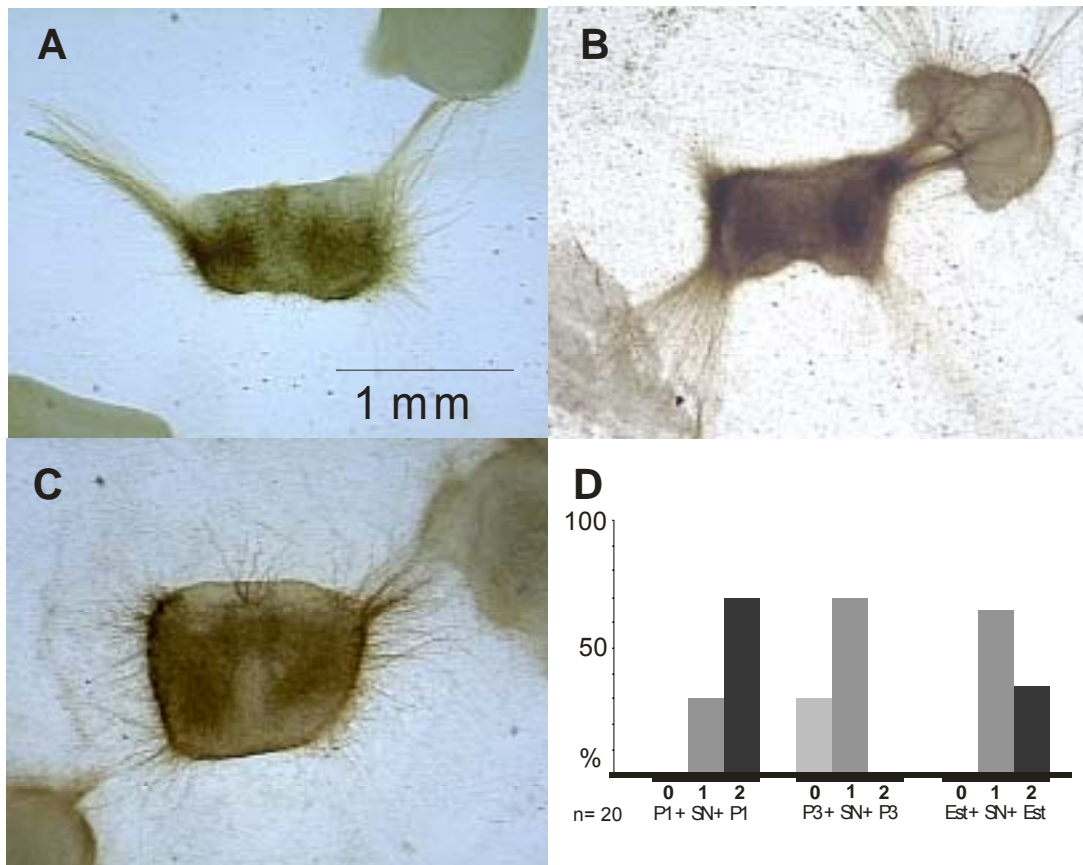
## 2. La p1r y el estriado atraen a las neuritas de las NDM.

Cuando las NDM se cultivaron junto con la p1r (Fig. 12B), se encontraron calificaciones de 2 en el 70% de los casos (n=20) (Fig. 12D). Cuando las NDM se cocultivaron junto con la p3 (Fig. 12A) hubo una ausencia total de respuestas de 2. Estos experimentos fueron comparados con cultivos de NDM junto con explantes de p3 como controles negativos ya que en experimentos previos, no mostraron efecto alguno en los axones dopaminérgicos. Otras de las zonas del neuroepitelio como p2 y el istmo carente de PP no mostraron efectos trópicos sobre los axones dopaminérgicos.

Para evaluar el efecto del blanco final sobre el crecimiento de las NDM se hicieron cultivos en geles de colágena de embriones de rata de E14.5 colocando explantes de estriado junto al explante dopaminérgico (Fig. 12C). En este estadio del desarrollo, las primeras NDM ya se encuentran en el diencéfalo. Estos experimentos mostraron que el estriado también atrae la proyección dopaminérgica, las calificaciones de 2 correspondieron al 35% de los casos (n=20) (Fig. 12D). La tabla 12D muestra que sólo en presencia de la p1r y el estriado, se

encuentran crecimientos en diagonal con calificaciones de 2. La prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis fue significativa.  $H(2, N=60) = 25.89724$ .  $P \leq 0.05$ .

Los resultados anteriores muestran que la p1r podría actuar como una zona organizadora intermedia que atrae el crecimiento de las neuronas dopaminérgicas y que el estriado podría actuar como atrayente para la fase final de la proyección.



**Figura 12. La p1r y el estriado atraen el crecimiento de las neuritas dopaminérgicas.** Cuando realizamos los cultivos de explantes dopaminérgicos junto a la p1r y el estriado, ambos mostraron una atracción del crecimiento. La tabla muestra que ambos explantes tuvieron calificaciones de 2. La prueba de Kruskal-Wallis fue significativa.  $H(2, N=60) = 25.89724$   $p = .0000$ .

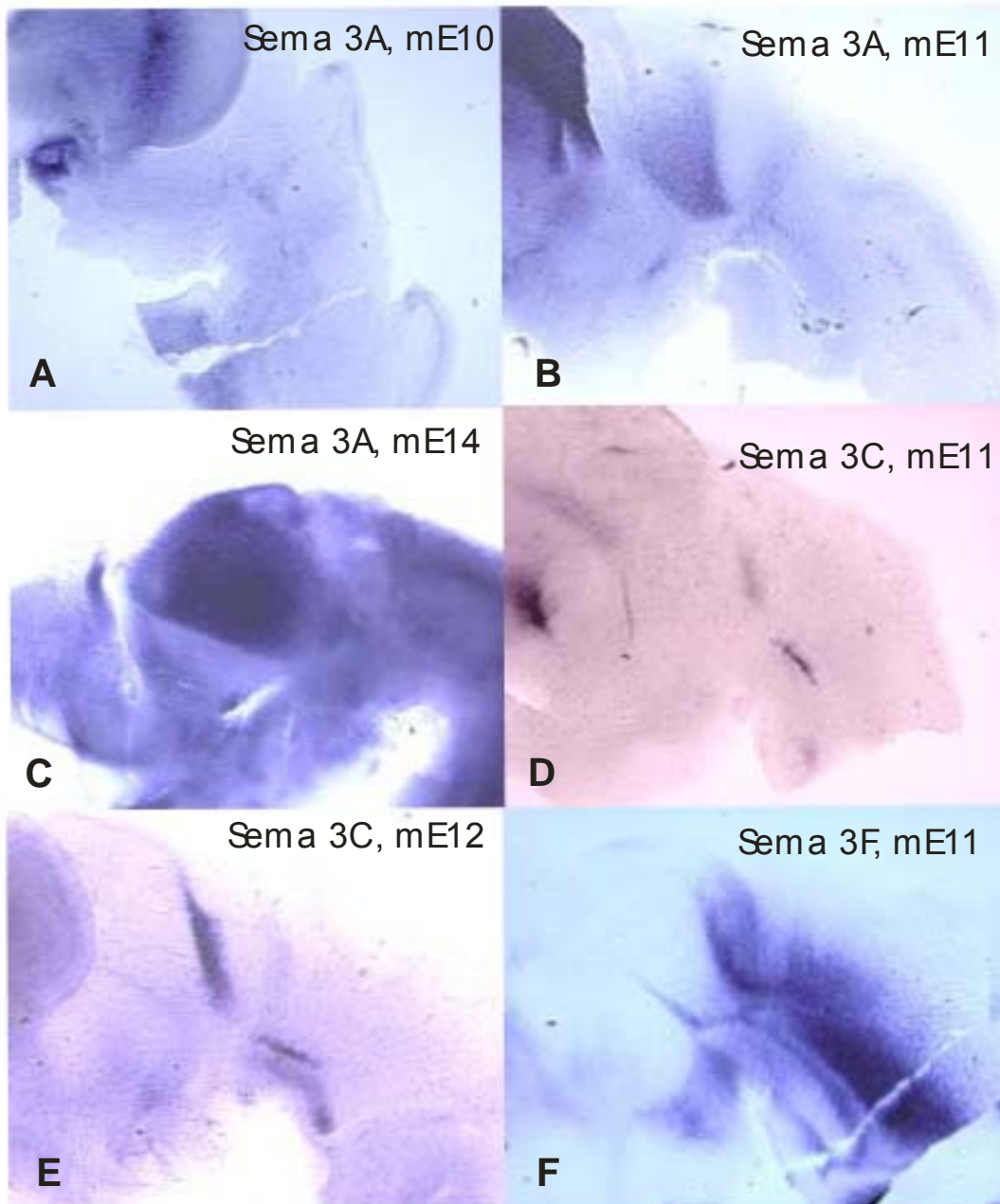
### 3. Las semaforinas 3A, 3C y 3F se expresan en regiones del neuroepitelio con acción trópica sobre la proyección nigroestriatal.

Una vez determinado que las zonas de la p1r y el estriado tienen efectos quimiotrópicos sobre el crecimiento de neuritas dopaminérgicas, analizamos qué

semaforinas se expresan en estas zonas mediante hibridación *in situ* en embriones de ratón. Estos estudios mostraron que las semaforinas 3A, 3C y 3F se expresan en las rutas de proyección de las NDM. La semaforina 3A se expresa en la p2 y en el estriado. En la p2, su expresión inicia alrededor del E10 de ratón (Fig. 13A y 13B) y persiste hasta el E15; en el estriado se expresa en el E14, cuando las NDM arriban a su blanco final (Fig. 13C).

La semaforina 3C se expresa en la región del mesencéfalo ventral, cerca de las NDM. Se encuentran dos franjas de expresión paralelas al eje longitudinal del tubo neural y además se presenta una expresión dorsoventral en la p1r (Fig. 13D y 13E). La semaforina 3F por su parte, se expresa en E12 principalmente en la zona dorsal del mesencéfalo y en la p1r (Fig. 13F). Para el siguiente estadio, la expresión se encuentra localizada sólo en la p1r (Fig. 14A).

Ya que las NDM crecen en sentido rostral cuando la semaforina 3C se expresa en el mesencéfalo ventral y hacia la p1r cuando ésta se encuentra expresando semaforinas 3C y 3F, es probable que estas semaforinas se encuentren involucradas en el control de la proyección rostral de este núcleo.

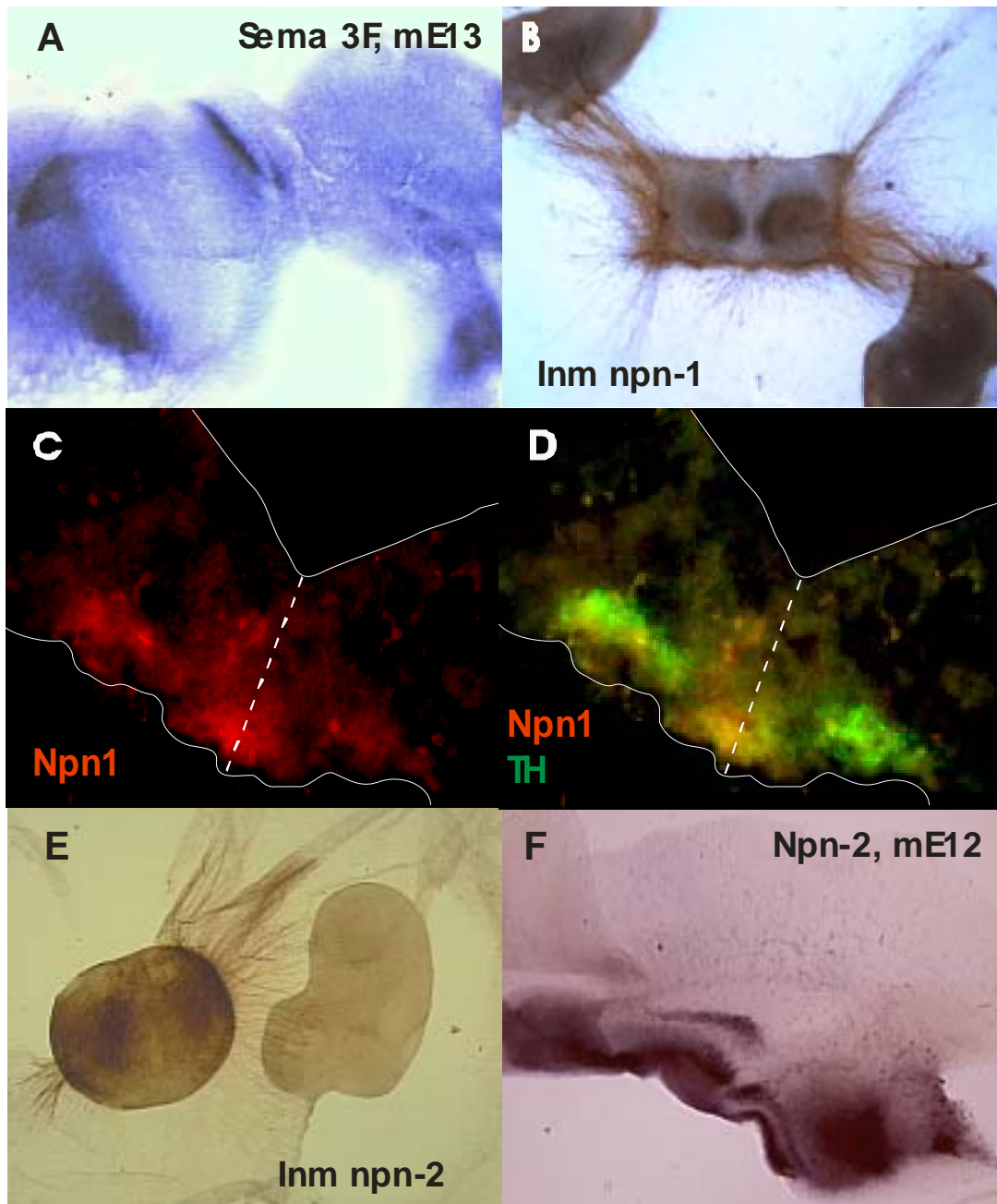


**Figura 13. Las semaforinas 3A y 3C se expresan en las rutas de proyección dopaminérgica.** La semaforina 3A muestra un patrón de expresión en el estriado justo cuando los axones dopaminérgicos llegan a su blanco final. La semaforina 3C muestra un patrón de expresión desde el inicio de la proyección dopaminérgica que podría estar relacionada con el control de la proyección.

Debido a que las semaforinas 3A, 3C podrían ser las responsables de los efectos de atracción y la semaforina 3F de los efectos de repulsión encontrados en los cultivos, se evaluó si las NDM expresaban los receptores para estas moléculas. Las neuropilinas 1 y 2 son los receptores conocidos para las semaforinas 3A, 3C y 3F (Kolodkin y Ginty, 1997; Shimizu et al., 2000). La semaforina 3A se une a un homodímero de npn-1, la semaforina 3C se une a heterodímeros de npn-1 y 2, y la semaforina 3F se une a homodímeros de npn-2 (Giger et al., 1998). Los resultados de hibridación *in situ* para npn-2 mostraron que la región del núcleo de las NDM es positiva (Fig. 14F).

Para evaluar la expresión de la npn-1 y npn-2 en las NDM se realizaron cultivos en geles de colágena y después se les hizo inmunohistoquímica con anticuerpos contra estas moléculas. Los resultados mostraron que muchas de las neuritas que crecen del explante mesencefálico hacia explantes de p1 son positivas para npn-1 y npn-2 (Fig. 14B y 14E). Además, la doble inmunohistoquímica con anticuerpos fluorescentes para npn-1 y TH en el mesencéfalo en E13 (fig 14D) revela neuritas positivas para este receptor en esa región.

Los patrones de expresión de las semaforinas del grupo 3 sugieren su posible papel en el control del crecimiento dopaminérgico hacia el estriado. Los resultados muestran que la semaforina 3A se expresa en el blanco final, la semaforina 3C se expresa en dos franjas longitudinales en el mesencéfalo ventral y en p1 y la semaforina 3F en la región dorsal del mesencéfalo y posteriormente en p1. El explante de NDM usado en los cultivos *in vitro* muestra la expresión de npn-1 y npn-2 en neuritas que responden a p1 y la hibridación *in situ* para npn-2 muestra que en la región del núcleo de las NDM se encuentra un patrón positivo para esta molécula.



**Figura 14. La región del explante mesencefálico expresa los receptores neuropilina 1 y 2 durante el desarrollo. El explante dopaminérgico mesencefálico expresa los receptores a las semaforinas durante la proyección inicial y en su llegada al estriado.**



#### **4. Las semaforinas 3A, 3C y 3F tienen efectos quimiotrópicos sobre las NDM en cultivo.**

Los resultados anteriores mostraron que las semaforinas 3A, 3C y 3F presentan patrones de expresión en zonas con actividad quimiotrópica *in vitro*. Para determinar si los axones dopaminérgicos responden a estas semaforinas, se realizaron cultivos de las NDM junto con agregados celulares expresando estas moléculas. El núcleo de las NDM se cultivó junto con células 293 transfectadas con vectores de expresión para las semaforinas 3A, 3C, 3E ó 3F (Fig. 8).

Los cultivos con agregados celulares expresando la semaforina 3C mostraron una respuesta de atracción similar a la encontrada en el explante de p1r, en el 35% de los casos se observaron calificaciones de 2 (Fig. 15C y 15 F). Este efecto no se encontró en cultivos con agregados de células no transfectadas (Fig. 15A).

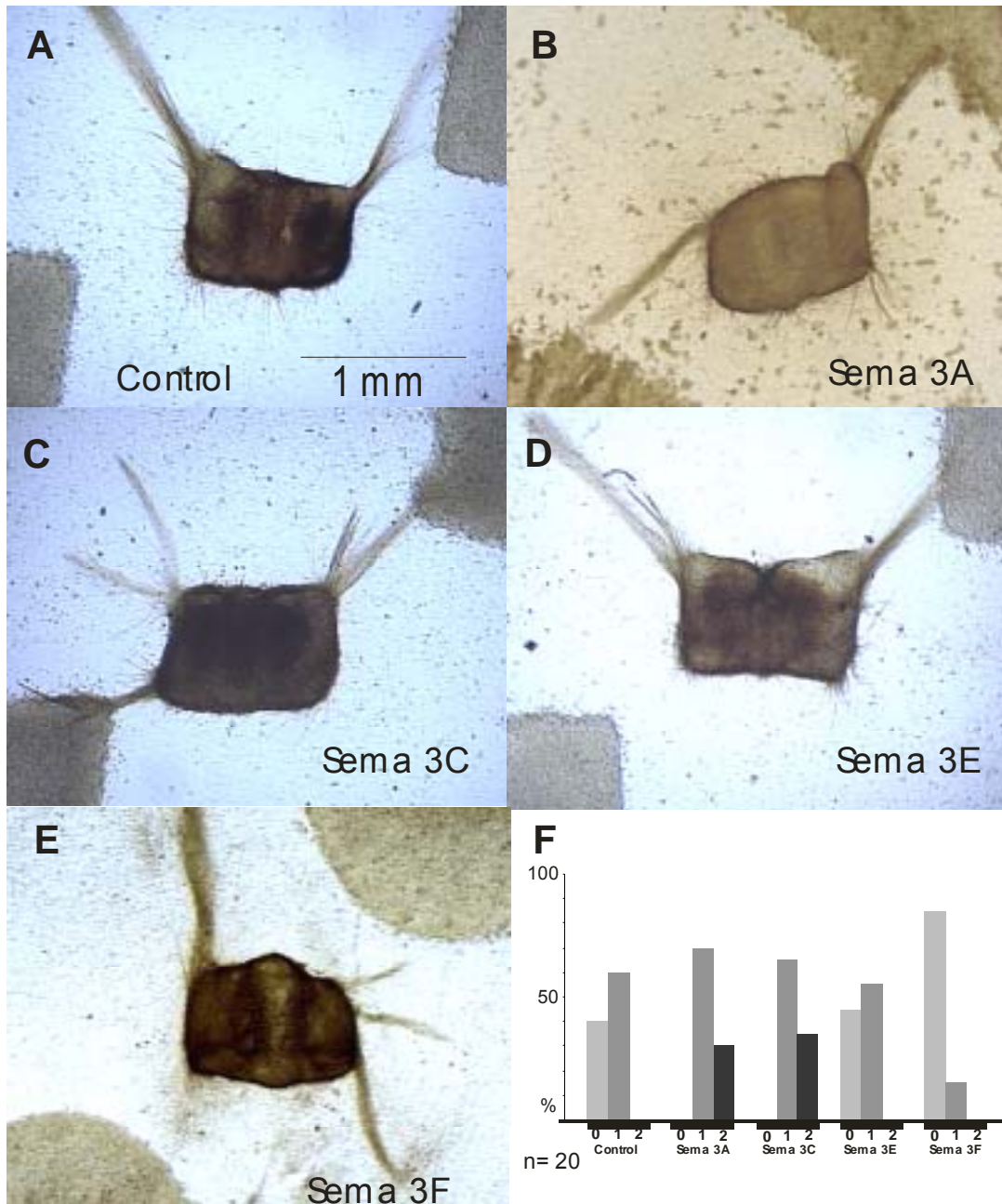
Cuando se cocultivaron células expresando a la semaforina 3F, que se expresa en la p1r, junto con explantes de las NDM, el crecimiento dopaminérgico fue repelido, las calificaciones de 0 se presentaron en el 85% de los casos (Fig. 15E). En la mayoría de los casos, los fascículos de axones dopaminérgicos evitaron a los agregados celulares que expresaban esta semaforina, dando por resultado muchas calificaciones de 0 (Fig. 15F).

Cuando los agregados celulares transfectados con la semaforina 3A fueron cultivados junto con las NDM de embriones de E14.5, la respuesta ejercida fue de atracción, el 30% de los casos presentaron calificaciones de 2 (Fig. 15B y 15F). Se observó un crecimiento dirigido hacia los agregados celulares de cada lado que expresan esta semaforina. Cuando los cultivos se realizaron con NDM de E13.5, no se encontró esta respuesta. Estos datos muestran que *in vitro*, las neuronas dopaminérgicas no responden a la semaforina 3A en estadios tempranos de proyección, pero responden con atracción en estadios posteriores.

También se realizaron los cultivos de las NDM junto con agregados celulares que expresaban a la semaforina 3E como un control negativo. Esta semaforina muestra un patrón de expresión ubicuo en el mesencéfalo y en el diencefalo, lo que sugiere que no se encuentra involucrada en el control de la dirección de la

proyección de las NDM. Cuando los explantes del núcleo de las NDM se cocultivaron junto con agregados celulares que expresaban esta semaforina, no hubo ningún efecto trópico (Fig. 15D). El comportamiento del crecimiento fue similar a cultivos control con células no transfectadas (Fig. 15F).

El efecto de atracción causado por la semaforina 3C que se expresa en la p1r, que también causa atracción, sugiere que esta molécula podría ser la responsable de controlar la proyección rostral *in vivo*. La semaforina 3A expresada en el estriado en desarrollo fue capaz de atraer el crecimiento dopaminérgico *in vitro*, lo que sugiere su participación en la proyección al blanco final. Es probable también que la semaforina 3F se encuentre inhibiendo el crecimiento dorsal de la proyección dopaminérgica al expresarse en la porción alar del neuroepitelio mesencefálico. En análisis estadístico mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis fue significativa,  $H(4, N= 100) = 50.86583$   $p = .0000$ . Mostró un efecto significativo en la atracción de las semaforinas 3A y 3C y en el rechazo ejercido por la semaforina 3F,

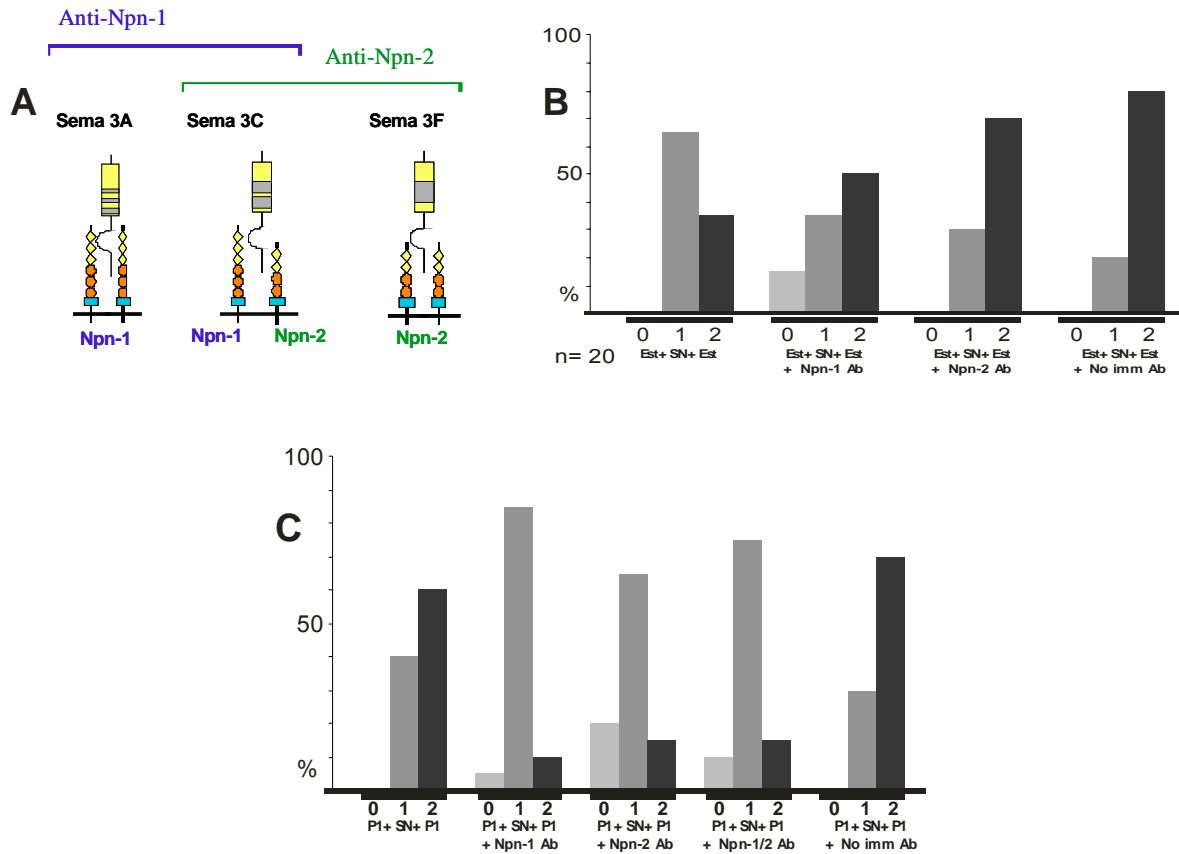


**Figura 15. Las semaforinas 3A, 3C y 3F ejercen efectos quimiotrópicos sobre la proyección dopaminérgica *in vitro*.** Cuando las semaforinas 3A, 3C y 3F fueron expresadas en agregados celulares, mostraron efectos quimiotrópicos de atracción (3A y 3C) y de rechazo del crecimiento (3F). La gráfica muestra las calificaciones de 2 para las semaforinas 3A y 3C, mientras que las calificaciones para la 3F fueron principalmente de 0. Kruskal-Wallis test:  $H(4, N=100) = 50.86583$   $p \leq 0.05$ . La  $n=20$  para cada experimento.

## **5. Anticuerpos contra los receptores para semaforinas reducen los efectos quimiotrópicos causados por la p1r y las semaforinas 3A, 3C y 3F.**

Los resultados anteriores muestran que la p1r, el estriado y las semaforinas 3A, 3C y 3F ejercen efectos quimiotrópicos sobre el crecimiento neurítico de las NDM. Si la atracción de las NDM hacia la p1r y el estriado se encuentra mediada por señales moleculares dependientes de las semaforinas 3A y 3C, respectivamente, y el rechazo de las NDM es mediado por la semaforina 3F, el bloqueo de los receptores para estas moléculas anularía la respuesta detectada en los cultivos (Fig. 16A). Para determinar esto, se realizaron cultivos en geles de colágena, añadiendo al medio de cultivo anticuerpos contra npn-1 y 2 que bloquean la respuesta de las neuritas a las semaforinas 3A, 3C y 3F. Los experimentos se realizaron en el Laboratorio del Dr. Alex L. Kolodkin en el Johns Hopkins Medical School (JHMS) en Baltimore, MD, USA.

En los cocultivos de p1r con las NDM, la adición del anticuerpo contra npn-1 bloqueó casi por completo la atracción observada en los cultivos control de NDM más p1r sin anticuerpo. El grupo control mostró un 60% de calificaciones de 2, mientras que cuando fue añadido el anticuerpo contra npn-1, las calificaciones de 2 sólo se presentaron en el 10% de los casos. Cuando se añadió el anticuerpo contra npn-2, la respuesta de atracción también disminuyó, las calificaciones de 2 se presentaron en el 15% de los casos. Cuando se añadieron los dos anticuerpos simultáneamente, la respuesta fue similar a las anteriores, se bloqueó parcialmente la respuesta de atracción mediada por la p1r, calificaciones de 2 en el 15% de los casos (Fig. 16B). Los valores de 2 encontrados en los cultivos de las NDM junto con la p1r fueron disminuidos de forma significativa con la adición de los anticuerpos al medio de cultivo, la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis fue de:  $H(3, N=100) = 29.76756$   $p = .0000$  (Fig. 12B y 16B).



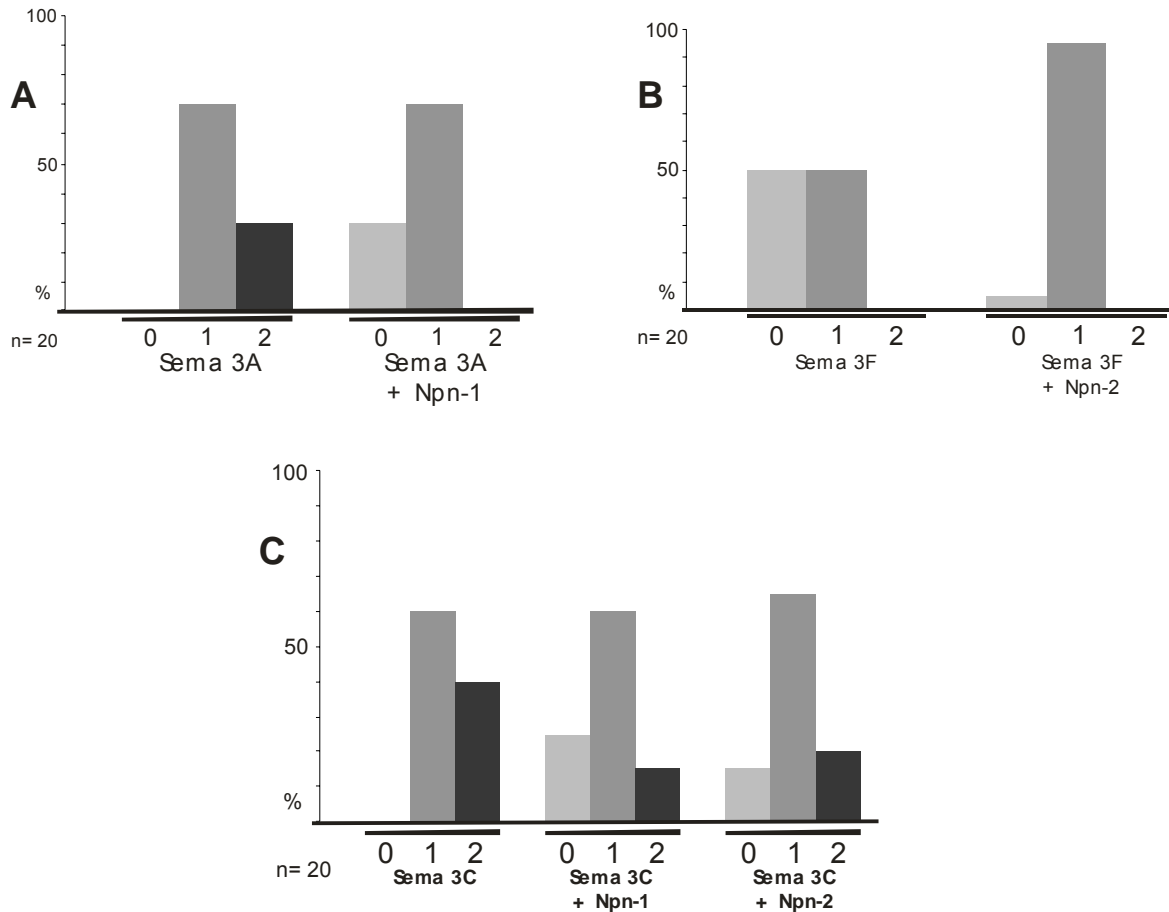
**Figura 16. Los anticuerpos contra los receptores a semaforinas anulan los efectos quimiotrópicos mostrados por la p1r y por el estriado.** Cuando se agregó al medio de cultivo de explantes dopaminérgicos junto con la p1r el efecto de atracción disminuyó de forma significativa, Kruskal-Wallis test:  $H(3, N=100) = 29.76756$   $p \leq 0.05$ ; mientras que para el caso del estriado no hubo efecto significativo.  $n=20$  para cada experimento.

Estudios similares se llevaron a cabo para determinar si el efecto atrayente del estriado es también bloqueado por estos anticuerpos. Dado que la semaforina 3A parece ser la molécula atrayente del estriado, se esperaba que los anticuerpos contra npn-1 bloquearan la respuesta, mientras que los anticuerpos contra npn-2 no tendrían ningún efecto. Los resultados mostraron que los anticuerpos contra npn-1 y npn-2, no fueron capaces de inhibir la respuesta de atracción ejercida por el estriado (Fig. 16C). Esto sugiere que la zona del estriado podría ejercer atracción del crecimiento dopaminérgico por alguna otra molécula, además de la semaforina 3A.

Para confirmar la capacidad de los anticuerpos de bloquear la respuesta quimiotrópica de las semaforinas, se añadieron los anticuerpos al medio de cultivo

de las NDM junto con agregados celulares expresando a la semaforina 3A, 3C y 3F. Cuando las NDM fueron cocultivadas junto con agregados celulares expresando a la semaforina 3A, las calificaciones de 2 fueron del 30%; la adición al medio de cultivo del anticuerpo contra npn-1 bloqueó la respuesta de atracción causada por esta semaforina, las calificaciones de cero fueron nulas, la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis fue significativa:  $H(1, N=40) = 11.70000$   $p = .0006$  (Fig. 17A). También se observó una disminución significativa de la respuesta de atracción causada por la semaforina 3C expresada en agregados celulares con la adición al medio de cultivo de los anticuerpos contra npn-1 ó npn-2, Los controles presentaron un 40% de calificaciones de 2, con una reducción al 15% en presencia del anticuerpo contra npn-1 y de 20% con el anticuerpo contra npn-2. La prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis fue significativa:  $H(2, N=60) = 6.815691$   $p = .0331$  (Fig. 17B).

Cuando se añadió el anticuerpo contra npn-2 al medio de cultivo en cocultivos de las NDM junto con agregados celulares expresando a la semaforina 3F, la respuesta de repulsión causada por esta semaforina fue reducida (Fig. 17C). Los controles mostraron calificaciones de 0 en un 50% de los casos, mientras que en presencia del anticuerpo contra npn-2, las calificaciones de 0 se presentaron sólo en el 0.5% de los casos. La prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis fue significativa:  $H(1, N=40) = 9.902822$   $p = .0017$ . Debido a que la atracción de las NDM causada por la p1r también es bloqueada por anticuerpos contra las neuropilinas, es muy probable que este efecto trópico en la p1r sea mediado por la semaforina 3C.



**Figura 17. Los anticuerpos son específicos para los receptores a semaforinas.** El uso de los anticuerpos dirigidos contra los receptores a semaforinas en cultivos, disminuyeron de manera significativa ( $P= 0.05$ ) los efectos mostrados por las semaforinas *in vitro*. (A) El anticuerpo contra npn-1 disminuye el efecto de atracción ejercido por la semaforina 3A, prueba de Kruskal-Wallis significativa:  $H(1, N= 40) = 11.70000 p \leq 0.05$ . (B) Los anticuerpos contra npn-1 y npn-2, disminuyen el efecto de atracción causado por la semaforina 3C, prueba de Kruskal-Wallis significativa:  $H(2, N= 60) = 6.815691 p \leq 0.05$ . (C) El anticuerpo contra npn-2 bloquea el efecto de repulsión causado por la semaforina 3F, prueba de Kruskal-Wallis significativa:  $H(1, N= 40) = 9.902822 p \leq 0.05$ .

Los resultados anteriores muestran una posible participación de las semaforinas al controlar la proyección longitudinal ascendente de las NDM, sin embargo queda pendiente evaluar esta posibilidad *in vivo* y analizar en detalle los mecanismos de respuesta a estas moléculas.

## DISCUSIÓN

### A. Neuronas reticuloespinales

**El istmo es una fuente de señales difusibles que afectan la proyección de axones romboencefálicos caudales.**

Experimentos *in vitro* mostraron que el crecimiento caudal de explantes de romboencéfalo rostral es inhibido por explantes del istmo. Cuando el istmo fue colocado a un lado del explante de r2-r3, las neuritas viraron creciendo alejándose de él, lo que sugiere un efecto repulsivo del crecimiento caudal. Este efecto parece ser específico para neuronas de proyección caudal positivas para serotonina, sustancia P y GABA. El crecimiento rostral de estos tipos de neuronas no se vio afectado por el istmo y para las neuronas PNMT-positivas ni el crecimiento rostral ni el caudal se afectó. La respuesta diferencial inducida por el istmo sugiere un efecto específico para axones caudales del rafe (positivas a sustancia P y TrpH) y reticuloespinales (positivas a GAD), mientras que las neuronas adrenérgicas no se ven afectadas. Esto sugiere que el istmo podría secretar un componente del sistema de control de navegación longitudinal en el romboencéfalo y ser importante para aquellas neuronas que se desarrollan cercanos al mesencéfalo, r1, r2 y r3. De esta forma, en los embriones de pollo que fueron seccionados *in ovo* a nivel de r1-r2, la proyección caudal de las neuronas reticuloespinales estuvo alterada desde r2 hasta r4, siendo normal en r5. La acción de moléculas derivadas del istmo sobre rombómeras rostrales ha sido observada por la habilidad del istmo y FGF-8 para inhibir la expresión de *Hox-A2* en r1 (Irving y Mason, 2000).

La ausencia de la proyección reticuloespinal en los embriones seccionados a nivel de r1-r2 también podría ser debida a defectos en la diferenciación reticuloespinal ocasionados por la ausencia del istmo. Se ha demostrado que el FGF-8 secretado por el istmo regionaliza a r1 y esta influencia podría afectar indirectamente a r2 y r3 (Irving y Mason, 2000). Sin embargo, este morfógeno no parece ejercer sus efectos a través de los límites de las rombómeras. Estudios de transplante de rombómeras en embriones de pollo han mostrado que la identidad



de las rombómeras rostrales es muy refractaria a los cambios locales en el ambiente al tiempo en que se realizaron las cirugías en nuestro estudio (Guthrie et al., 1992; Kuratani y Eichele, 1993; Itasaki et al., 1996; Grapin-Botton, Bonnín y Le Duourain, 1997). Por esta razón, es difícil que la identidad de las rombómeras pudiera cambiar por la ausencia del istmo. Es importante recordar que no se encontraron cambios en el número de neuronas positivas para GAD (reticuloespinales) en los embriones seccionados cuando los comparamos con los controles. Tampoco se encontraron cambios en los patrones de expresión en el romboencéfalo rostral de Lhx1 y Lhx3, que son marcadores para subpoblaciones de neuronas reticuloespinales (Tsuchida, et al., 1994). Además, la diferenciación, migración y guía axonal del núcleo motor del trigémino en r2-r3 fue normal en los embriones seccionados a nivel de r1-r2. Así, es probable que la falta de proyecciones caudales reticuloespinales se deba a la ausencia de señales que difunden desde el istmo y que directa o indirectamente afectan la proyección caudal. Estos resultados son consistentes con el papel del istmo como organizador de la proyección caudal de neuronas reticuloespinales mediante la producción de moléculas difusibles quimiorrepelentes o no permisivas que determinan la proyección caudal de forma normal en el romboencéfalo rostral.

### **Los axones mesencefálicos del FLM participan en la proyección reticuloespinal romboencefálica.**

En los experimentos en los que se seccionó el FLM del NIC sin alterar la continuidad entre el istmo y el romboencéfalo rostral, encontramos que la proyección de los axones reticuloespinales del romboencéfalo rostral se redujo en un 50% a nivel de r2-r3 y un 30% a nivel de r4 comparado con los controles no operados. Esto implica que el tracto formado por el NIC juega un papel importante en la proyección romboencefálica a lo largo del FLM, quizás proveyendo una ruta pionera sobre la cual fascicula el crecimiento axonal. Esto sugiere que la falla en la proyección reticuloespinal de los embriones seccionados a nivel de r1-r2 es un efecto compuesto por la falta de señales derivadas del istmo y por la ausencia del tracto pionero provisto por el FLM. En contraste, la ablación con láser del

equivalente del NIC en embriones del pez *cebra*, el núcleo mlf, no afecta la proyección de las neuronas reticuloespinales romboencefálicas (Metcalf y Hatta, 1989). A pesar de que los axones mesencefálicos no parecen ser necesarios para la proyección correcta de los axones romboencefálicos en el pez *cebra*, estos axones parecen ser necesarios para la correcta proyección reticuloespinal en el cerebro de pollo.

### **Naturaleza de las señales guía para los axones longitudinales pioneros.**

La naturaleza molecular de la actividad de guía axonal de la región del istmo o las moléculas involucradas en el crecimiento fasciculado al FLM no fue determinado en este estudio. De las moléculas que se expresan y secretan en el istmo, el FGF-8 no parece ser el causante debido a su restricción funcional por los límites de las rombómeras (Irving y Mason, 2000). Wnt-1, del cual se sabe que se asocia a la matriz extracelular (Jue et al., 1992; Schryver, Hinck y Papkoff, 1996), es poco probable que alcance el nivel de r2-r4 donde sería requerido como molécula responsable para controlar la proyección caudal a este nivel. De las familias conocidas de moléculas guía secretadas, algunos miembros de las semaforinas de la clase 3 muestran patrones de expresión consistentes con este papel (datos no mostrados). Sin embargo, en estudios realizados en nuestro laboratorio encontramos que la electroporación ectópica de las semaforinas 3A, 3C, 3F y 3E en pollo no mostraron ningún efecto en el patrón de proyección de los axones reticuloespinales (Meléndez y Varela-Echavarría, resultados no publicados).

Estudios futuros de éstas y otras moléculas involucradas en la guía axonal en el romboencéfalo en desarrollo, incluyendo aquellas que afectan al NIC, podrían permitirnos identificar componentes de los sistemas de guía longitudinal en el cerebro en desarrollo. En el romboencéfalo, se propone que estas señales involucran moléculas difusibles que se forman en la región del istmo y que podrían actuar como señales inhibitorias o quimiorrepelentes junto con señales ancladas en axones mesencefálicos descendentes que sirven como un sustrato para el crecimiento fasciculado.

## **B. Neuronas dopaminérgicas mesencefálicas**

El tracto nigroestriado sigue principalmente una proyección rostral a lo largo del eje longitudinal del tubo neural. Durante su proyección inicial, este tracto proyecta en dirección dorsal en el mesencéfalo y, cerca del *surco limitante*, cambia de dirección para proyectar en sentido ascendente hacia su blanco final ubicado en la prosómera 5, que finalmente constituirá al estriado.

### **Zonas del neuroepitelio embrionario atraen el crecimiento de las NDM.**

Nuestro trabajo se centró en estudiar inicialmente cuáles son las zonas del neuroepitelio que tienen un efecto trópico sobre la proyección rostral de las neuritas dopaminérgicas mesencefálicas (NDM). Utilizando cultivos en geles de colágena, pudimos identificar a la prosómera 1 rostral como una zona que atrae el crecimiento dopaminérgico *in vitro*. Cuando se cultivaron explantes conteniendo NDM junto al explante de p1r, las neuritas dopaminérgicas crecieron hacia la ubicación del explante prosomérico, esta conducta de crecimiento no se observó en los controles ni con el resto de las zonas evaluadas (p2, p3 e Istmo). Cuando los cultivos de NDM se realizaron junto con el estriado, el blanco final de la proyección nigroestriatal, las neuritas dopaminérgicas también fueron atraídas hacia el estriado. Los resultados sugieren que existen zonas localizadas a lo largo de la ruta de proyección dopaminérgica que, mediante atracción, guían la proyección en sentido ascendente.

### **Las semaforinas ejercen efectos quimiotrópicos sobre axones dopaminérgicos.**

Una vez determinadas a la p1r y el estriado como zonas que ejercen efectos quimiotrópicos para los axones dopaminérgicos, lo siguiente fue identificar si las zonas que mostraban un efecto sobre el crecimiento expresaban moléculas quimiotrópicas. Los análisis mediante hibridación *in situ* mostraron que la semaforina 3A se expresa en el estriado, el blanco final de la proyección dopaminérgica. La semaforina 3C muestra un patrón de expresión en el

mesencéfalo ventral y en la p1r. La semaforina 3F tiene una expresión en el mesencéfalo dorsal y en la p1r.

Cuando estas moléculas fueron expresadas en agregados celulares y cultivadas junto con las NDM encontramos que ejercían efectos quimiotrópicos sobre el crecimiento neurítico. Las semaforinas 3A y 3C causaron atracción del crecimiento, y la semaforina 3F produjo rechazo.

Para determinar la especificidad de los efectos causados por estas semaforinas sobre el crecimiento de las NDM añadimos anticuerpos específicos contra los receptores de las semaforinas 3A, 3C y 3F. Los anticuerpos fueron capaces de disminuir la respuesta de atracción de la semaforina 3A pero no la causada por el estriado. Cuando los anticuerpos se añadieron a los cultivos de las NDM con agregados expresando semaforina 3C o con p1r, el efecto de atracción también disminuyó de forma significativa. En los cultivos de agregados expresando semaforina 3F con las NDM, el rechazo del crecimiento también disminuyó de forma significativa.

Los resultados sugieren la participación de las semaforinas en el control de la proyección dopaminérgica. La expresión de las semaforinas concuerda con la ruta y con el tiempo de desarrollo en el cual se lleva a cabo la proyección. En el inicio de la proyección, la semaforina 3F podría ser la encargada de restringir a los axones dopaminérgicos a la región basal del neuroepitelio, limitando la proyección más allá del *surco limitante*. En la p1r, la semaforina 3C podría ejercer un efecto de atracción sobre los axones dopaminérgicos. No es claro, sin embargo, cuál sería el papel de la semaforina 3F, dado que ésta tiene efectos repelentes y los explantes de p1r, que expresan ambas semaforinas, tuvieron un efecto neto de atracción. Entre las posibilidades se puede mencionar que la respuesta a semaforina 3F se module o inhiba por la presencia de semaforina 3C, que una mayor abundancia de semaforina 3C resulte en un efecto atractivo neto o que la función de la semaforina 3F sea la de inhibir el crecimiento dopaminérgico hacia la región dorsal del diencefalo. En ratones con mutaciones nulas de Pax-6, un factor de transcripción (Mastick et al., 1997; Pratt et al., 2000; Jones et al., 2002), las NDM proyectan aberrantemente hacia la región dorsal de p1 y p2 (Mastick et al.,

1996; Kawano et al., 1999; Vitalis et al., 2000). Si el efecto de la semaforina 3F es inhibir esa proyección dorsal, es posible entonces que la ausencia de Pax6 resulte también en la ausencia de expresión de semaforina 3F.

La semaforina 3A estaría atrayendo la proyección hacia el estriado. Los resultados de este estudio mostraron que las NDM de embriones E14.5 respondieron a semaforina 3A y no así las de E12.5. Esto puede deberse a que las NDM comienzan a responder a la semaforina 3A hasta que su proyección longitudinal se encuentra más allá de la p2, siendo entonces atraídas por el estriado. Por esto es probable que la semaforina 3A expresada en la p2 no participe activamente en el control de la proyección dopaminérgica. En consistencia con esta idea, explantes de p2 no tuvieron efectos trópicos sobre los axones dopaminérgicos.

A pesar de que los anticuerpos específicos para neuropilina-1 bloquearon parcialmente el efecto de semaforina 3A sobre axones dopaminérgicos, el efecto atrayente del estriado no fue inhibido. Esto sugiere la existencia de otras moléculas en el estriado que podrían ser responsables del efecto atrayente del estriado junto con semaforina 3A. Los resultados de este estudio nos hacen suponer que la semaforina 3F podría contribuir, junto con la netrina-1 y las proteínas slit (Funato, Saito-Nakasato y Takahashi, 2000; Bagri et al., 2002; Marillat et al., 2002; Lin, Rao e Isacson, 2005) a determinar la posición y proyección dorsal inicial en el mesencéfalo de los axones dopaminérgicos. La netrina-1 y las proteínas slit, expresadas en la porción ventral del mesencéfalo y la placa del piso, repelerían a los axones dopaminérgicos dirigiendo su crecimiento en sentido dorsal mientras que la semaforina 3F, expresada en el mesencéfalo dorsal, impediría la proyección al mesencéfalo alar. La semaforina 3C intervendría en la proyección longitudinal ascendente mediante su expresión longitudinal en el mesencéfalo y seguiría atrayendo el crecimiento fuera del mesencéfalo mediante su expresión en la p1r. La semaforina 3A contribuiría, junto con otras moléculas aún no conocidas, a la atracción del crecimiento dopaminérgico al blanco final, lugar donde la efrina B2 organizaría la especificidad final de las neuronas dopaminérgicas estriatales al estriado dorsolateral (Yue et al., 1999).

### **Mecanismos de proyección axonal longitudinal en el SNC en desarrollo.**

Los resultados obtenidos sugieren la existencia de un sistema de control multimolecular de la navegación axonal para axones longitudinales que podría consistir en fuentes de moléculas guía a lo largo del eje longitudinal del tubo neural.

La evidencia obtenida *in vitro* e *in vivo* muestra que la proyección caudal de los axones originados en el romboencéfalo rostral es en parte controlada por señales que difunden de la región del istmo. La existencia de otras fuentes de señales para el control de la proyección de axones longitudinales en el romboencéfalo también se sugiere por la proyección normal ascendente de otras poblaciones neuronales en ausencia del istmo. El NIC, el origen más rostral del FLM, también parece formar parte del sistema que guía la proyección reticuloespinal romboencefálica. El NIC inicia su proyección de forma más temprana que las neuronas reticuloespinales. La ausencia de su proyección provoca una disminución de la proyección reticuloespinal en el romboencéfalo rostral. Esto podría deberse a que el NIC sirve como tracto pionero dentro del romboencéfalo para la proyección reticuloespinal rostral.

En cuanto a la proyección dopaminérgica mesencefálica, estudios previos llevados a cabo por Nakamura y colaboradores (2000) mostraron que la ausencia del istmo y el diencéfalo no alteraban el sentido de la proyección rostral de este tracto en cultivos organotípicos. Ellos propusieron que las señales que guían la proyección de los axones dopaminérgicos en el mesencéfalo no dependen de zonas rostrales o caudales a éste y que son las señales polarizadas dentro del mesencéfalo las que determinan esa proyección. Nuestros resultados sugieren que la semaforinas 3C y 3F, expresadas en el mesencéfalo podrían controlar la proyección longitudinal aún en ausencia del resto del neuroepitelio.

En resumen, los resultados de este trabajo sugieren que el control de la proyección longitudinal en el cerebro en desarrollo involucra zonas específicas a lo largo de este eje que actúan como blancos intermedios y organizan el crecimiento axonal de manera diferencial de distintas poblaciones neurales. Sin embargo, el control de la proyección longitudinal en la médula espinal parece involucrar otros

mecanismos. En la médula espinal de roedores, existe una expresión en gradiente rostro-caudal decreciente de *Wnt4* en la región ventral del tubo neural que determina que los axones comisurales viren en dirección rostral una vez que han cruzado la placa del piso (Lyuksyutova et al., 2003). Estudios adicionales son necesarios a fin de averiguar si además existen a lo largo de la médula espinal regiones discretas que, como en el cerebro en desarrollo, determinen el crecimiento a lo largo del eje longitudinal de otras poblaciones neuronales.

## CONCLUSIONES

El istmo funciona como una zona que organiza la proyección descendente de las neuronas reticuloespinales romboencefálicas. Afecta de forma específica a algunas subpoblaciones neuronales, inhibiendo el crecimiento caudal de proyecciones reticulares y de neuronas del rafe pero no a neuronas adrenérgicas ni tampoco las proyecciones rostrales.

El NIC participa en el control de la proyección caudal de las neuronas reticuloespinales romboencefálicas rostrales probablemente al proporcionar un sustrato para su crecimiento fasciculado.

Las regiones de la p1r y del estriado tienen efectos trópicos sobre axones nigroestriatales dopaminérgicos y probablemente participan en su proyección *in vivo*.

Las semaforinas 3A y 3C atraen el crecimiento en las NDM mientras que la semaforina 3F repele el crecimiento de las NDM en cultivos *in vitro*.

Las semaforinas 3A (estriado), 3C (mesencéfalo y p1r) y 3F (mesencéfalo dorsal y p1r) podrían estar involucradas en el control de la proyección de las NDM a su blanco final.

El control de la proyección longitudinal en el cerebro en desarrollo involucra zonas discretas a lo largo de este eje que organizan el crecimiento axonal de manera diferencial de distintas poblaciones neurales.



## REFERENCIAS

- Aitken A. y Tork I. (1988) Early development of serotonin-containing neurons and pathways as seen in wholemount preparations of the fetal rat brain. *J. Comp. Neurol.* 274: 32-47.
- Antonopoulos J., Dori I., Dinopoulos A., Chiotelli M. y Parnavelas G. (2002) Postnatal development of the dopaminergic system of the striatum in the rat. *Neuroscience.* 110: 245-256.
- Auclair F., Marchand R. y Glover J. (1999) Regional patterning of reticulospinal and vestibulospinal neurons in the hindbrain of mouse and rat embryos. *J. Comp. Neurol.* 411: 288-300.
- Augsburger A., Schuchardt A., Hoskins S., Dodd J. y Butler S. (1999) BMPs as mediator of roof plate repulsion of commissural neurons. *Neuron.* 24, 127-141.
- Bagri A., Marín O., Plump A., Mak J., Pleasure S., Rubenstein J. y Tessier-Lavigne. (2002) Slit proteins prevent midline crossing and determine the dorsoventral position of major axonal pathways in the mammalian forebrain. *Neuron.* 33:233-248.
- Beckstead R., Domesick V. y Nauta W. (1979) Efferent connections of the substantia nigra and ventral tegmental area in the rat. *Brain Res.* 175: 191-217.
- Bélanger M., Auclair F., Bertrand L. y Marchand R. (1997) The early neuronal organization predicts the path followed by some major axonal bundles in the embryonic brainstem. *Neuroscience.* 78: 259-270.
- Braisted J., Catalano S., Stimac R., Kennedy T., Tessier-Lavigne M., Shatz C. y O'Leary D. (2000) Netrin-1 promotes thalamic axon growth and is required for proper development of the thalamocortical projection. *J. Neurosci.* 20: 5792-5801.
- Brose K. y Tessier-Lavigne M. (2000) Slit protein: key regulators of axon guidance, axonal branching and cell migration. *Curr. Opin. Neurobiol.* 10: 95-102.
- Cepeda-Nieto A., Pfaff S. y Varela-Echavarría A. (2005) Homeodomain transcription factors in the development of subsets of hindbrain reticulospinal neurons. *Mol. Cell Neurosci.* 28: 30-41.

Chan S., Zheng H., Su M. Wilk R. Killen M. Hedgecock E. y Culotti J. (1996) UNC-40, a *C. elegans* homolog of DCC (Deleted in Colorectal Cancer), is required in motile cells responding to UNC-6 netrin cues. *Cell*. 87: 187-195.

Clarke J. y Lumsden A. (1993) Segmental repetition of neuronal phenotype sets in the chick embryo hindbrain. *Development*. 118: 151-162.

Colamarino S. y Tessier-Lavigne M. (1995) The axonal chemoattractant netrin-1 is also a chemorepellent for trochlear motor axons. *Cell*. 81: 621-629.

Dalhström A. y Fuxe K. (1964) Evidence for the existence of monoamine-containing neurons in the CNS. I. Demonstration of monoamines in the cell bodies of brainstem neurons. *Acta Physiol. Scand*. 62: 1-55.

Daston M. y Koester S. (1996) Transcriptional regulation of axon pathfinding. *Neuron*. 17: 5-8.

Easter S. y Frankfurter A. (1993) Initial tract formation in the mouse brain. *J. Neurosci*. 13: 285-299.

Funato H., Saito-Nakasato Y. y Takahashi H. (2000) Axonal growth from the habenular nucleus along the neuromere boundary region of the diencephalon is regulated by semaphorin 3F and netrin-1. *Mol. Cell. Neurosci*. 16: 206-220.

Giger R., Urquhart E., Gillespie S., Levensgood D., Ginty D. y Kolodkin A. (1998) Neuropilin-2 is a receptor for semaphorin IV: insight into the structural basis of receptor function and specificity. *Neuron*. 21: 1079-1092.

Glover J. (1993) The development of brain stem projections to the spinal cord in the chicken embryo. *Brain Res. Bull*. 30: 265-271.

Glover J. y Petursdottir G. (1988) Pathways specificity of reticulospinal and vestibulospinal projections in the 11-day chicken embryo. *J. Comp. Neurol*. 270: 25-38.

Glover J. y Petursdottir G. (1991) Regional specificity of developing reticulospinal, vestibulospinal, and vestibulo-ocular projections in the chicken embryo. *J. Neurobiol*. 22: 353-376.

Grapin-Botton A., Bonnin M. y Le Duourain N. (1997) Hox gene induction in the neural tube depends on three parameters: competence, signal supply and paralogue group. *Development*. 124: 849-859.

Guthrie S., Muchamore I., Kuroiwa A., Marshall H., Krumlauf R. y Lumsden A. (1992) Neuroectodermal autonomy of hox-2.9 expression revealed by rhombomere transpositions. *Nature*. 356: 157-159.

Guthrie, S. y Lumsden, A. (1994) Collagen gel coculture of neural tissue. *Neuroprotocols*. 4: 116-120.

Hamasaki T., Goto S., Nishikawa S. y Ushio Y. (2001) A role of netrin-1 in the formation of the subcortical structure striatum: repulsive action on the migration of late-born striatal neurons. *J. Neurosci*. 21: 4272-4280.

Hamburger V. y Hamilton H. (1951) A series of normal stages in the development of chick embryo. *J. Comp. Neurol*. 88: 49-87.

Hibbard E. (1965) Orientation and directed growth of Mauthner's cell axons from duplicated vestibular nerve roots. *J. Exp. Neurol*. 13: 289-301.

Houart C., Westerfield M. y Wilson S. (1998) A small populations of anterior cells patterns the forebrain during zebrafish gastrulation. *Nature*. 391: 788-792.

Irvin C. y Mason I. (2000) Signaling by FGF8 from the isthmus patterns anterior hindbrain and establishes the anterior limit of Hox gene expression. *Development*. 127: 177-186.

Itasaki N., Sharpe J., Morrison A. y Krumlauf R. (1996) Reprogramming Hox expression in the vertebrate hindbrain: influence of paraxial mesoderm and rhombomere transposition. *Neuron*. 16: 487-500.

Jones L., López-Bendito G., Stoykova A. y Molnar Z. (2002) Pax-6 is required for the normal development of the forebrain axonal connections. *Development*. 129: 5041-5052.

Jue S., Bradley R., Rudnicki J., Varmus H. y Brown A. (1992) The mouse Wnt-1 gene can act via a paracrine mechanism in transformation of mammary of epithelial cells. *Mol. Cell. Biol*. 12: 321-328.

Kanki J. y Kuwada J. (2000) Growth cones utilize both widespread and local directional cues in the zebrafish brain. *Dev. Biol*. 219: 364-372.

Kaprielain Z., Imondi R. y Runko E. (2000) Axon guidance at the midline of the developing CNS. *The Anatomical Record*. 261: 176-197.

Kawano H., Fukuda T., Kubo K., Horie M., Uyemura K., Takeuchi K., Osumi N., Eto K. y Kawamura K. (1999) Pax-6 is required for thalamocortical pathway formation in fetal rats. *J. Comp. Neurol.* 408: 147-160.

Kennedy T., Serafini T., de la Torre J. y Tessier-Lavigne M. (1994) Netrins are diffusible chemotropic factors for commissural axons in the embryonic spinal cord. *Cell.* 78: 425-435.

Kidd T., Bland S. y Goodman C.S. (1998) Slit is the midline repellent for the robo receptor in *Drosophila*. *Cell.* 96: 785-794.

Kolodkin, A. L. y Ginty, D. D. (1997) Steering clear of semaphorins: neuropilins sound the retreat. *Neuron.* 19: 1159-1162.

Kuratani S. y Eichele G. (1993) Rhombomere transplantation repatterns the segmental organization of cranial nerves and reveals cell-autonomous expression of a homeodomain protein. *Development.* 117: 105-117.

Kury P., Gale N., Connor R., Pasquale E. y Guthrie S. (2000) Eph receptors and ephrin expression in cranial motor neurons and the branchial arches of the chick embryo. *Mol. Cell. Neurosci.* 15: 123-140.

Larsen C., Zeltser L. y Lumsden A. (2001) Boundary formation and compartment in the avian diencephalon. *J. Neurosci.* 21: 4699-4711.

Lee S., Danielian P., Fritsch B. y McMahon A. (1997) Evidence that FGF signaling from the midbrain-hindbrain junction regulates growth and polarity in the developing midbrain. *Development.* 124: 959-969.

Lin J. y Rosenthal A. (2003) Molecular mechanisms controlling the development of dopaminergic neurons. *Cell. Dev. Biol.* 14: 175-180.

Lin L., Rao Y. y Isacson O. (2005) Netrin-1 and slit-2 regulate and direct neurite growth of ventral midbrain dopaminergic neurons. *Mol. Cel. Neurosci.* 28: 547-555.

Livesey F. y Hunt S. (1997) Netrin and netrin receptor expression in the embryonic mammalian nervous system suggests roles in retinal, striatal, nigral and cerebellar development. *Mol. Cell. Neurosci.* 8: 417-429.

Lumsden A. y Krumlauf R. (1996) Patterning the vertebrate neuraxis. *Science.* 274: 1109-1115.

Lyuksyutova A., Chin-Chun L., Milanesio N., King L., Guo N., Wang Y., Nathans J., Tessier-Lavigne M. y Zou Y. (2003) Anterior-posterior guidance of commissural axons by Wnt-Frizzled signaling. *Science*. 12: L 1984-1988.

Marillat V., Cases O., Nguyen-ba-charvet K., Tessier-Lavigne M., Sotelo C. y Chédotal A. (2002) Spatiotemporal expression patterns of slit and robo genes in the rat brain. *J. Comp. Neurol.* 442: 130-155.

Marín O., Yaron A., Bagri A., Tessier-Lavigne M. y Rubenstein J. (2001) Sorting of striatal and cortical interneurons regulated by semaphorin-neuropilin interactions. *Science*. 293: 872-875.

Martínez S., Crossley P., Cobos I., Rubenstein J. y Martin G. (1999) FGF8 induces formation of an ectopic isthmic organizer and isthmocerebellar development via a repressive effect on Otx2 expression. *Development*.\* 126: 1189-1200.

Mastick G., Davis N., Andrew G. y Easter S. (1997) Pax-6 functions in boundary formation and axon guidance in the embryonic mouse forebrain. *Development*. 124: 1985-1997.

Mastick G., Fan C., Tessier-Lavigne M., Serbedzija G., McMahon A. y Easter S. Jr. (1996) Early deletion of neuromeres in Wnt-1 (-/-) mutant mice: evaluation by morphological and molecular markers. *J. Comp. Neurol.* 374: 246-258.

Mastick G y Easter S. (1996) Initial organization of neurons and tracts in the embryonic mouse fore- and midbrain. *Dev. Biol.* 173: 79-94.

Metcalfe W. y Hatta K. (1989) Formation of the medial longitudinal fascicle in wild-type and mutant zebrafish embryos. *Soc. Neurosci. Abstr.* 15 (Part 1): 959.

Moore R. y Bloome F. (1978) Central catecholamine neurons systems: anatomy and physiology of the dopamine systems. *Ann. Rev. neurosci.* 1: 129-169.

Mueller B. (1999) Growth cone guidance: first steps towards a deeper understanding. *Annu. Rev. Neurosci.* 22: 351-388.

Nakamura S., Ito Y., Shirasaki R. y Murakami F. (2000). Local directional cues control growth polarity of dopaminergic axons along the rostrocaudal axis. *J. Neurosci.* 20: 4112-4119.

Parent A. (1996) *Carpenter's Human Anatomy*. Williams & Wilkins, Philadelphia.

Páginas

Polleux F., Morrow T. y Ghosh A. (2000) Semaphorin 3A is a chemoattractant for cortical apical dendrites. *Nature*. 404: 567-573.

Pratt T., Vitalis T., Warren N., Edgar J., Mason J. y Price D. (2000) A role for Pax-6 in the normal development of dorsal thalamus and its cortical connections. *Development*. 127: 5167-5178.

Puelles L. y Rubenstein J. (1993) Expression patterns of homeobox and other putative regulatory genes in the embryonic Mouse forebrain suggest a neuromeric organization. *Trends Neurosci*. 16: 472-479.

Rajagolapan S., Nicolas E., Vivancos V., Berger J. y Dickson B. (2000) Crossing the midline: roles and regulation of robo receptors. *Neuron*. 28: 767-777.

Ren X., Kim S., Fox E. y Hedgecock E. (1999). Role of netrin UNC-6 in patterning the longitudinal nerves of *Caenorhabditis elegans*. *J. Neurobiol*. 39: 107-118.

Rothberg J., Jacobs J., Goodman C. y Artavanis-Tsakonas S. (1990) Slit: an extracellular protein necessary for development of midline glia and commissural axon pathways contains both EGF and LRR domains. *Genes Dev*. 4: 2169-2187.

Rubenstein J., Shimamura K., Martínez S. y Puelles L. (1998) Regionalization of the prosencephalic neural plate. *Annu. Rev. Neurosci*. 21: 445-477.

Schryver B., Hinck L. y Papkoff J. (1996) Properties of Wnt-1 protein that enable cell surface association. *Oncogene*. 13: 333-342.

SECOFI, 1999, Catálogo de Normas Oficiales Mexicanas, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio, NOM-062-ZOO-1999, pag 37 a 44.

Serafini T., Colamarino S., Leonardo E., Wang H., Beddington R, Skarnes W. y Tessier-Lavigne M. (1996) Netrin-1 is required for commissural axon guidance in the developing vertebrate nervous system. *Cell*. 87: 1001-1014.

Shimada S., Takatsuji K. y Wanaka A. (1998) The catecholaminergic system. Noradrenergic-adrenergic systems, En: Tohyama, M., Takatsuji K. (Eds), *Atlas of the Neuroactive Substances and Their Receptors in the Rat*. Oxford University Press, New York, pp: 32-35.

Shimizu M., Murakami Y., Suto F. y Fujisawa H. (2000). Determination of cell adhesion sites of Neuropilin-1. *J. Cell Biol*. 148: 1283-1293.

Tamada A., Shirasaki R. y Murakami F. (1995) Floor plate chemoattracts crossed axons and chemorepels uncrossed axons in the vertebrate brain. *Neuron*. 14: 1083-1093.

Tanabe Y. y Jessell T. (1996) Diversity and pattern in the developing spinal cord. *Science*. 274: 1115-1123.

Tessier-Lavigne, M. y Goodman C. (1996) The molecular biology of axon guidance. *Science*. 274: 1123-1133.

Tsuchida T., Ensini M., Morton S., Baldassare M., Edlund T., Jessell T. y Pfaff S. (1994) Topographic organization of embryonic motor neurons defined by expression of LIM homeobox genes. *Cell*. 79: 957-970.

Van der Kooy D. (1979) The organization of the thalamic, nigral and raphe cells projecting to the medial and lateral caudate putamen in rat. A fluorescent retrograde double-labeling study. *Brain Res*. 169: 381-387.

Van Vactor D. y Flanagan J. (1999) The middle and the end: slit brings guidance and branching together in axon pathway selection. *Neuron*. 22: 649-652.

Varela-Echavarría A. y Guthrie, S. (1997) Molecules making waves in axon guidance. *Genes Dev*. 11: 545-557.

Varela-Echavarría A., Pfaff S. y Guthrie S. (1996) Differential expression of LIM homeobox genes among motor neuron subpopulations in the developing chick brain stem. *Mol. Cell Neurosci*. 8: 242-257.

Vertes R., Fortin W. y Crane A. (1999) Projections of the median raphe nucleus in the rat. *J. Comp. Neurol*. 407: 555-582.

Vitalis T., Cases O., Engelkamp D., Verney C. y Price D. (2000) Defects of tyrosine hydroxylase-immunoreactive neurons in the brains of mice lacking the transcription factor pax-6. *J. Neurosci*. 20: 6501-6516.

Wang K., Brose K., Arnott D., Kidd T, Good C., Henzel W. y Tessier-Lavigne M.(1999). Biochemical purification of a mammalian slit protein as a positive regulator of sensory axon elongation and branching. *Cell*. 96: 771-784.

Wassarman K., Lewandoski M., Campbell K., Joyner A., Rubenstein J., Martínez S. y Martin G. (1997) Specification of the anterior hindbrain and establishment of a

normal mid/hindbrain organizer is dependent on Gbx2 gene function. *Development*. 124: 2923-2934.

Yue Y., Widmer D., Halladay A., Cerreti D., Wagner., Dreyer J. y Zhou R. (1999) Specification of distinct dopaminergic neural pathways: roles of the Eph family receptor EphB1 and ligand ephrin B2. *J. Neurosci*. 19: 2090-2101.



## Diffusible signals and fasciculated growth in reticulospinal axon pathfinding in the hindbrain

Hebert L. Hernández-Montiel,<sup>a</sup> Esperanza Meléndez-Herrera,<sup>a</sup> Ana C. Cepeda-Nieto,<sup>a</sup> Carmen Mejía-Viggiano,<sup>a</sup> Jorge Larriva-Sahd,<sup>a</sup> Sarah Guthrie,<sup>b</sup> and Alfredo Varela-Echavarría<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> *Institute for Neurobiology, Universidad Nacional Autónoma de México, Campus UNAM-UAQ Juriquilla, Querétaro 76230, Mexico*

<sup>b</sup> *MRC Centre for Developmental Neurobiology, 4th floor, New Hunt's House, King's College, Guy's Campus, London SE1 1UL, UK*

Received for publication 1 July 2002, revised 30 October 2002, accepted 30 October 2002

### Abstract

We have addressed the control of longitudinal axon pathfinding in the developing hindbrain, including the caudal projections of reticular and raphe neurons. To test potential sources of guidance signals, we assessed axon outgrowth from embryonic rat hindbrain explants cultured in collagen gels at a distance from explants of midbrain–hindbrain boundary (isthmus), caudal hindbrain, or cervical spinal cord. Our results showed that the isthmus inhibited caudally directed axon outgrowth by 80% relative to controls, whereas rostrally directed axon outgrowth was unaffected. Moreover, caudal hindbrain or cervical spinal cord explants did not inhibit caudal axons. Immunohistochemistry for reticular and raphe neuronal markers indicated that the caudal, but not the rostral projections of these neuronal subpopulations were inhibited by isthmic explants. Companion studies in chick embryos showed that, when the hindbrain was surgically separated from the isthmus, caudal reticulospinal axon projections failed to form and that descending pioneer axons of the medial longitudinal fasciculus (MLF) play an important role in the caudal reticulospinal projection. Taken together, these results suggest that diffusible chemorepellent or nonpermissive signals from the isthmus and substrate-anchored signals on the pioneer MLF axons are involved in the caudal direction of reticulospinal projections and might influence other longitudinal axon projections in the brainstem.

© 2003 Elsevier Science (USA). All rights reserved.

**Keywords:** Axon guidance; Axon pathfinding; Hindbrain; Isthmus; Reticulospinal neurons; Raphe neurons; Inhibition, Chemorepulsion, MLF

### Introduction

During the early development of the vertebrate neural tube, the first axonal tracts are established in a stereotypical manner, following either circumferential or longitudinal pathways. Combinations of these two basic types of projection set up an axon “scaffold,” which subsequently gives rise to the more complex pathways observed in later neural development. In the spinal cord and brainstem, several guidance cues have been implicated in the control of circumferential pathfinding decisions (Mueller, 1999; Tessier-Lavigne and Goodman, 1996; Varela-Echavarría and Guthrie, 1997), while the systems controlling axon growth along longitudinal routes have remained

more elusive. Axon projections in the hindbrain offer a suitable model for the study of longitudinal axon guidance; ascending or descending longitudinal projections originate from ipsilateral or contralateral neurons which follow medial or lateral longitudinal tracts (Fig. 1A) (Clarke and Lumsden, 1993). Neurons of the reticular formation give rise to a number of projections, including a reticulospinal pathway originating in reticulospinal neurons, which either joins the ipsilateral medial longitudinal fasciculus (MLF) or extends across the floor plate to join the contralateral MLF (Auclair et al., 1999; Glover and Petursdottir, 1988; Parent, 1996). In both chick and rodent embryos, reticulospinal neurons are organized in longitudinal columns with particular nuclei located at specific axial levels (Auclair et al., 1999; Glover and Petursdottir, 1988). Two columns are present in the medulla (rhombomeres r6–r8), one projecting ipsilaterally and the other projecting contralaterally.

\* Corresponding author. Fax: +52-442-238-1038.

E-mail address: [varela@calli.inb.unam.mx](mailto:varela@calli.inb.unam.mx) (A. Varela-Echavarría).

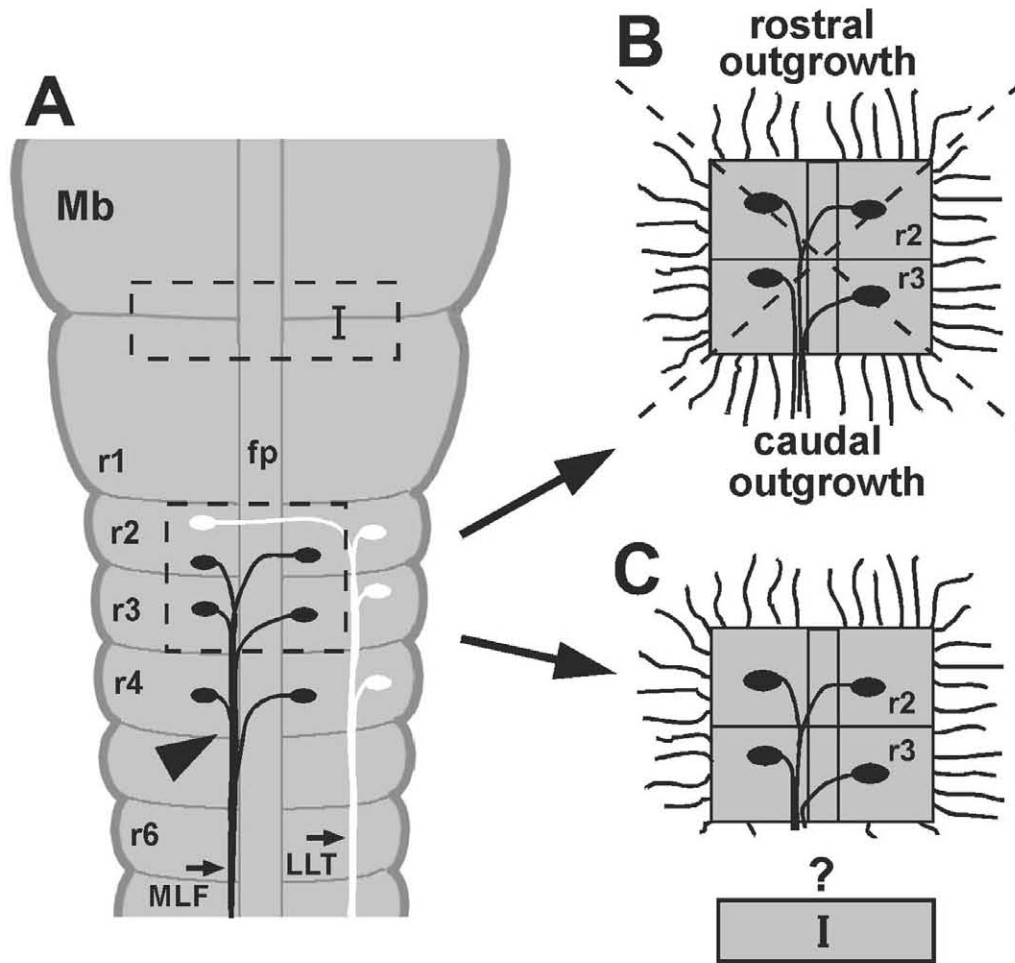


Fig. 1. General types of descending projections from the hindbrain and a culture system for their study. (A) Two main types of projections representative of r2–r4 are shown on a diagram of a flat-mounted brainstem. Ipsilaterally and contralaterally projecting neurons that follow a medial tract, the medial longitudinal fasciculus (MLF), are shown in black. Ipsilaterally and contralaterally projecting neurons that follow a lateral pathway, the lateral longitudinal tract (LLT), are shown in white. Reticulospinal neurons follow the MLF en route to spinal targets as indicated by the black neurons (Glover and Petrusdottir, 1991). Ascending projections are not shown. All neuronal populations are symmetrical, but each one is shown here on only one side of the hindbrain for simplicity. Figure adapted from Clarke and Lumsden, 1993. The diagram also shows the origin of the r2–r3 and isthmus explants employed for culture in collagen gels to study longitudinal axon projection. The black arrowhead shows the point in the r4–r5 boundary where the fluorescent tracer DiI was applied to the MLF for the retrograde labeling of r2–r3 neurons with caudal projection. A diagram of an r2–r3 explant (B) and a similar explant cocultured with an explant from the isthmus (C) are shown. The crossed dashed lines in (B) illustrate the way in which the crosshair graticule was placed to divide the explant into four quadrants. The rostral and the caudal outgrowths are indicated on the rostral and the caudal edges of the explant, respectively. Mb, midbrain; I, isthmus; r1–r6, rhombomeres 1–6; fp, floor plate.

The ipsilateral column continues into the pons (r1–r5) while the contralateral one is interrupted at the level of r5. Other neuronal types which follow longitudinal pathways in the developing hindbrain are the serotonergic and the adrenergic neurons. The serotonergic neurons that develop in the rostral hindbrain give rise to the caudal linear nucleus, the dorsal raphe nucleus, the median raphe nucleus, and the B9 group of Dahström and Fuxe (Aitken and Tork, 1988; Dalhström and Fuxe, 1964). Although the main projections of these nuclei are ascending, the dorsal and the median raphe nuclei also have clearly defined descending projections in the adult rat (Vertes et al., 1999). The caudal serotonergic nuclei, in contrast, have predominantly caudal projections (Parent, 1996). The phenylethanolamine-*N*-methyltransferase (PNMT)-positive neu-

rons which develop in the rostral hindbrain are likely to give rise to the adrenergic centers in the pons, which have both rostral and caudal projections (Shimada et al., 1998).

Early experiments on the developing amphibian hindbrain indicated that the direction of growth of axons of the reticulospinal, Mauthner neurons is influenced by the longitudinal polarity of the neural tube. Mauthner neurons contained in hindbrain grafts that were reversed along their rostrocaudal axis initially projected in an ascending pathway according to the original polarity of the graft. Most of them, however, eventually turned caudally to follow the normal projection according to the polarity of the host neural tube (Hibbard, 1965). The source of such axon guidance information is unclear, but

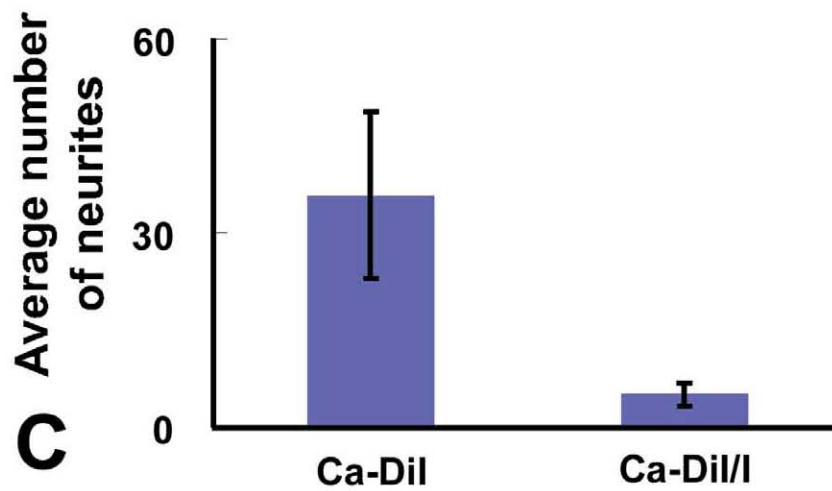
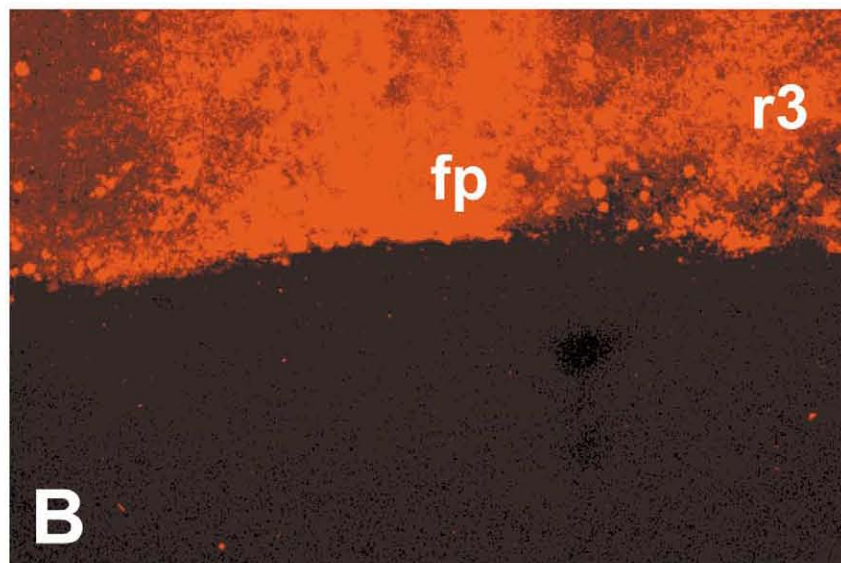
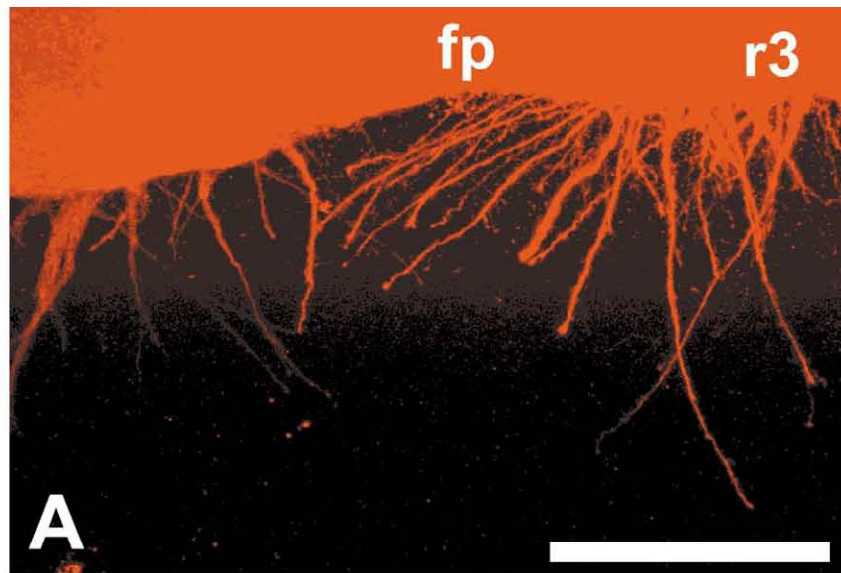


Fig. 2. Axon outgrowth from DiI-labeled explants. (A) Axon outgrowth from the caudal edge of an r2-r3 explant containing caudally projecting neurons that were labeled retrogradely with DiI prior to culture. (B) Axon outgrowth from the caudal edge of a DiI-labeled r2-r3 explant cocultured with an explant from the isthmus. (C) Effect of the isthmus explants on the caudal outgrowth of DiI-labeled neurites. Ca-DiI, DiI-labeled control cultures ( $n = 15$ ); Ca-DiI/I, DiI-labeled explants cultured with isthmus explants ( $n = 14$ ). Scale bar, 200  $\mu\text{m}$ .

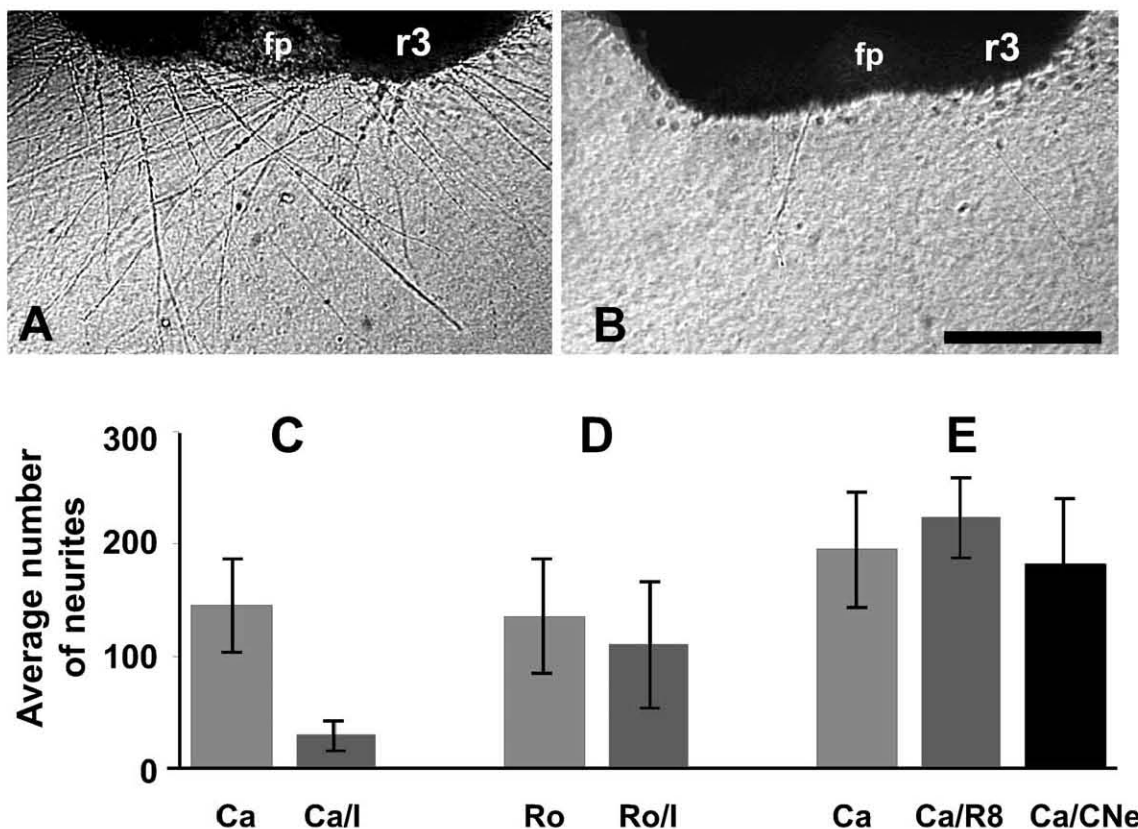


Fig. 3. The isthmus inhibits caudal outgrowth of longitudinally projecting hindbrain axons. Explants from the rostral hindbrain (r2-r3) were cultured in collagen gels alone (A) or adjacent to explants from the isthmus (B). The results from several experiments with control cultures and cocultures are shown in (C) (Ca, caudal edge cultured alone,  $n = 46$ ; Ca/I, caudal edge cocultured with isthmus,  $n = 41$ ), (D) (Ro, rostral edge alone,  $n = 22$ ; Ro/I, rostral edge with isthmus,  $n = 22$ ), and (E) (Ca, caudal edge alone,  $n = 14$ ; Ca/r8, caudal edge with r8 explants,  $n = 7$ ; Ca/CNe, caudal edge with cervical neuroepithelium,  $n = 14$ ).

might reside in local patterning information, in preexisting pioneer tracts, or in a few discrete organizing centers at distinct positions along the neuraxis, producing long-range, diffusible guidance cues. The latter idea is particularly appealing since one organizing center, the floor plate, has been shown to have both patterning and axon guidance influences across the dorsoventral axis of the neural tube (Tanabe and Jessell, 1996; Tessier-Lavigne and Goodman, 1996). Other organizing centers that pattern the rostrocaudal axis include the midbrain-hindbrain boundary, or isthmus, a forebrain patterning region (Houart et al., 1998; Lumsden and Krumlauf, 1996; Rubenstein et al., 1998), and possibly the zona limitans intrathalamica (Larsen et al., 2001; Zeltser et al., 2001). The possible role of these regions in influencing axon projections has not been investigated, however. In this study, we have examined a possible axon guidance role of the isthmus, which has been shown in numerous studies to act as an organizer in the patterning and differentiation of the midbrain, cerebellum, and rostral hindbrain (Irving and Mason, 2000; Lee et al., 1997; Martinez et al., 1999; Wassarman et al., 1997). We also investigated whether descending MLF axons that originate in the midbrain might provide guidance information. Using

both *in vitro* and *in vivo* approaches, we found that the isthmus is a source of diffusible signals that influence the growth of specific populations of caudally projecting hindbrain axons, including those of reticulospinal and raphe neurons, and that the descending MLF axons from the midbrain play a critical role in reticulospinal caudal projection. These findings implicate the isthmus as an axon growth organizer by producing guidance or inhibitory molecules or activating guidance systems that govern descending projections from the rostral rhombomeres. Our results also indicate that the MLF acts as a pioneer tract for descending brainstem projections.

## Materials and methods

### Animals

For *in vitro* assays, E14.5 Wistar rat embryos were used; the day of detection of the vaginal plug was defined as day 0.5. White Leghorn chick embryos were incubated to the desired Hamburger and Hamilton (HH) stage (Hamburger and Hamilton, 1951) for fluorescent dextran labeling, *in ovo* surgery, or *in situ* hybridization.

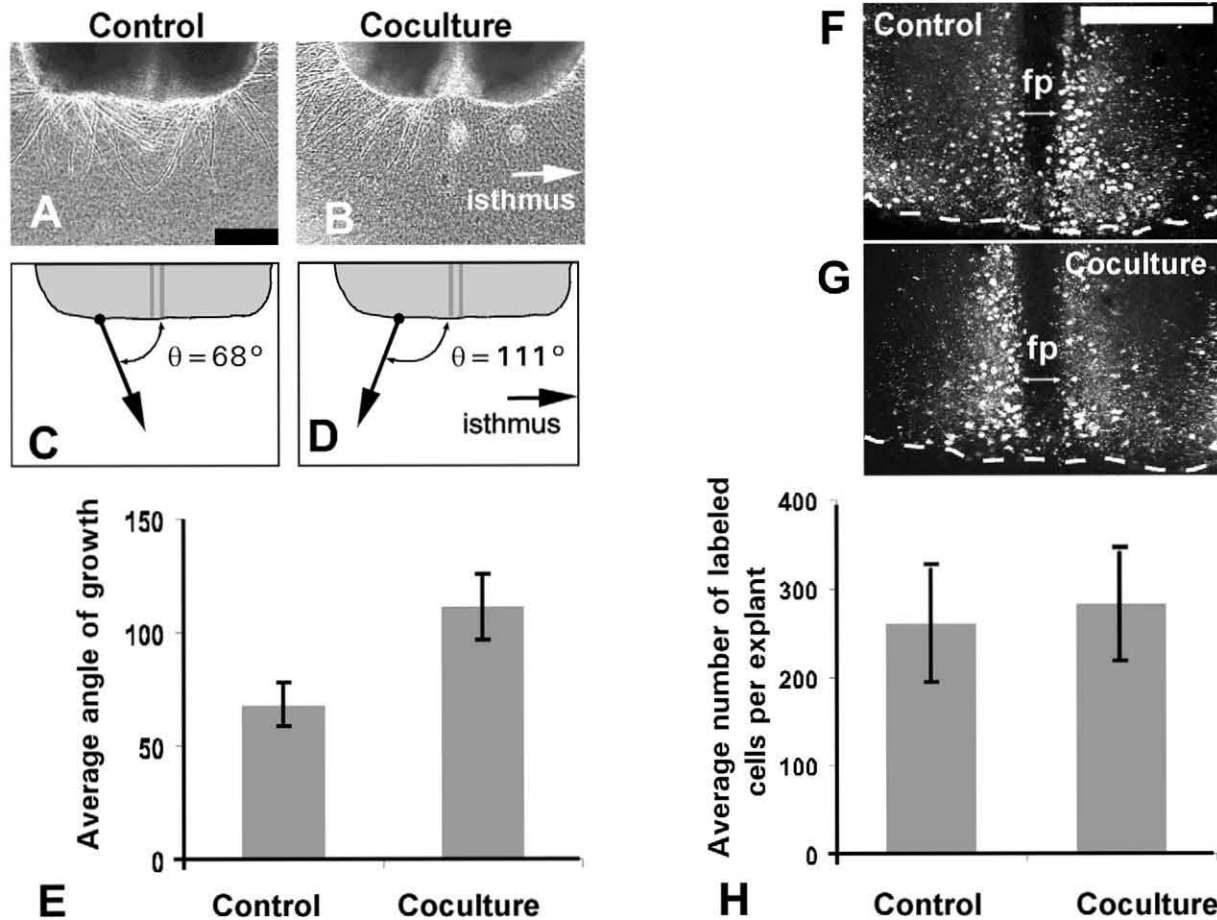


Fig. 4. The isthmus deflects caudal outgrowth from hindbrain explants (A–E). Hindbrain explants (r2–r3) were cultured alone (A) or with an isthmus explant placed to one side and perpendicular to the caudal edge of r3 (to the right of the explant in B). In this configuration, the r3 edge was not confronted with the isthmus and one side (right) was closer to its influence than the contralateral one (left). The angles ( $\theta$ ) of all the axons growing from the left half of the r3 edge in both control cultures and cocultures were measured, and their average was calculated as shown in (C) and (D), which correspond to control and cocultures, respectively. In (E), control  $n = 12$  and coculture  $n = 12$ . The isthmus does not have a negative effect on the survival of reticulospinal neurons (F–H). Reticulospinal neurons were labeled retrogradely from the MLF in r5 with rhodamine–dextran. Following the labeling, r2–r3 explants were obtained and cultured in collagen alone or adjacent to isthmus explants as shown in Fig. 1. After 48 h of culture, confocal images were obtained and the total number of labeled cell bodies were counted in each explant. (F) A control explant. (G) A coculture with isthmus. In (H), control  $n = 9$  and coculture  $n = 9$ . Scale bars, 250  $\mu\text{m}$ . Bar in (A) applies also to (B). Bar in (F) applies also to (G).

### Collagen gel cultures

Explants of E14.5 rat embryo brainstem were dissected free of mesenchyme and cultured for 48 h in collagen gels as previously described (Varela-Echavarría et al., 1997). The region used for the test explant (containing hindbrain longitudinally projecting neurons) was rhombomere 2 (r2) and r3 (Fig. 1). The rostral end of each explant was labeled with carmine powder by using a tungsten needle prior to dissection. These explants were cultured 200–500  $\mu\text{m}$  away from explants of isthmus (containing caudal midbrain and rostral r1; Fig. 1A and C), rhombomere 8, or cervical neuroepithelium. After the culture period, gels were observed under phase contrast and then fixed in 4.5% paraformaldehyde in PBS for immunostaining. Axon counts of unstained explants were scored blind under phase contrast as follows. A graticule with crosshairs was placed such that its axes ran

diagonally to the explant borders (Fig. 1B). Axons extending from the explant were then drawn with a camera lucida, and the total number of axons or axon fascicles extending from the rostral or caudal quadrants were counted. The mean outgrowth from rostral and caudal quadrants was then determined for each culture condition, and statistical comparisons ( $P = 0.05$  level) were made by using the Student's  $t$  test.

Some r2–r3 explants were labeled retrogradely with DiI before culture (see below). These cultures were analyzed by using confocal microscopy assembling images obtained at 5–10  $\mu\text{m}$  z-intervals into a single image. Axon counts were determined as described above.

To determine the angle of axon growth from cultured explants, camera lucida drawings of the outgrowth from caudal explant borders were made by using phase contrast microscopy. Digital images of the drawings were imported

into a graphics program, and straight lines were drawn on top of each axon or axon bundle since most of them had straight pathways. In the case of axons that did not grow in a straight line, a line was drawn that best fit the distal third of the axon. The angle of each line was digitally measured relative to the caudal explant border. Axons were grouped into two categories, those growing on either side of the explant floor plate. A mean angle of growth was then determined for each category. Statistical comparisons of the average angle of growth were made by using the Student's *t* test ( $P = 0.05$ ).

#### *Antibodies and immunostaining*

After culture, collagen gels were fixed in 4.5% paraformaldehyde and immunostained as previously described (Varela-Echavarría et al., 1997) with antibodies against the following proteins: tryptophan hydroxylase (AB15567, 1:50; Chemicon International Inc., Temecula, CA), phenylethanolamine-*N*-methyltransferase (PNMT) (AB110, 1:100; Chemicon International Inc.), glutamic acid decarboxylase (GAD) (AHP360, 1:2000; Serotec, Raleigh, NC), substance P (AB1566, 1:5000; Chemicon International Inc.), and the appropriate secondary antibodies coupled to horseradish peroxidase (1:1000, goat anti-mouse and goat anti-rabbit; Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., West Grove, PA). Color developing was performed with diaminobenzidine. Axons were counted as described for unstained cultures in the previous paragraph. The polarity of control r2–r3 explants cultured alone was marked by making cuts at the rostral edge of each gel.

#### *In ovo operations in chick embryos*

In ovo microsurgery of stage 12 chick embryos was performed by making a window in the eggshell with curved scissors and injecting 10% china ink in PBS (Pelikan) into the yolk underneath the embryo to visualize it. Surgeries involved either cutting transversely across the hindbrain at the r1–r2 boundary, to separate the isthmus from the remaining hindbrain, or sectioning completely across the midbrain at rostral or caudal levels (see Fig. 7A). In each case, a small strip of tissue was removed in order to ensure that the two edges of the neuroepithelium did not heal together. After the surgery, a few drops of Howard's Ringer solution containing penicillin–streptomycin (Life Technologies, Rockville, MD) at a 1:50 dilution were dispensed on top of the embryo, and the piece of eggshell removed was placed back on the window, sealing it with cellophane adhesive tape. This was followed by incubation for 2 days in a humidified incubator at 39°C, after which time the embryos reached stages 19–22. Only those embryos with normal appearance after the 2-day incubation period were further analyzed. Embryos were then used for retrograde labeling of motor or reticulospinal neurons, in situ hybridization, or GAD immunostaining. Labeled reticulospinal cells in each

half of rhombomeres 2, 3, and 4 were counted under a fluorescent microscope, and statistical comparisons ( $P = 0.05$  level) were made by using the Student's *t* test.

#### *Retrograde labeling with fluorescent dyes*

DiI labeling of caudally projecting rat hindbrain neurons was performed by pinning E14.5 rat embryos ventral side up in silicon gel immersed in Ringer solution, exposing the hindbrain, and sectioning its ventral aspect (approximately at r4–r5 boundary) with a tungsten needle followed by local application of 1  $\mu$ l of DiI solution (0.5% in DMSO; Molecular Probes, Inc., Eugene, OR). After incubation of the whole dish at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> incubator for 2 h, neuroepithelial explants (r2–r3) were obtained and cultured in collagen gels as described above. For labeling with rhodamine-conjugated dextran (10,000 M.W; Molecular Probes, Inc.), embryos were pinned down as above and a crystal attached to the tip of a minuten pin was applied to the MLF in r5. Embryos were incubated for 3 h at 30°C in a Ringer solution bubbled with 95% O<sub>2</sub> and 5% CO<sub>2</sub> (Auclair et al., 1999). After this incubation period, r2–r3 explants were obtained and used for culture in collagen gels in the presence or absence of the isthmus. Following 48 h of culture, confocal optical sections at 10- $\mu$ m *z* intervals spanning the whole thickness of the explant were obtained and projected onto a single image, and the number of labeled cell bodies was counted. The mean number of labeled cells per explant from control cultures and cocultures with isthmus was then determined, and statistical comparisons ( $P = 0.05$  level) were made by using the Student's *t* test.

Retrograde labeling of chick hindbrain reticulospinal neurons was performed as previously described (Varela-Echavarría et al., 1996), using FITC and Rhodamine-conjugated dextran. Dextran labeling of reticulospinal neurons was performed on chick embryos which were pinned down ventral side up in D-MEM medium by transecting the MLF bilaterally at r6–r7 levels and applying tracer to the cut neuroepithelial edge using fine forceps. Labeling of trigeminal motor neurons was done by using the same procedure applying the fluorescent tracer to the proximally transected trigeminal ganglion. Following labeling, the embryos were incubated for 2 h in the same medium at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere and fixed in 4.5% paraformaldehyde. This labeling method was used to visualize reticulospinal and trigeminal motor neurons in chick embryos following in ovo surgery.

#### *Probes and in situ hybridization*

Chick embryos were fixed and in situ hybridized as described (Varela-Echavarría et al., 1996) using probes for *Lhx-1*, *Lhx-3*, and *Isl1-1* (Tsuchida et al., 1994) (kind gift of Dr. S.L. Pfaff).

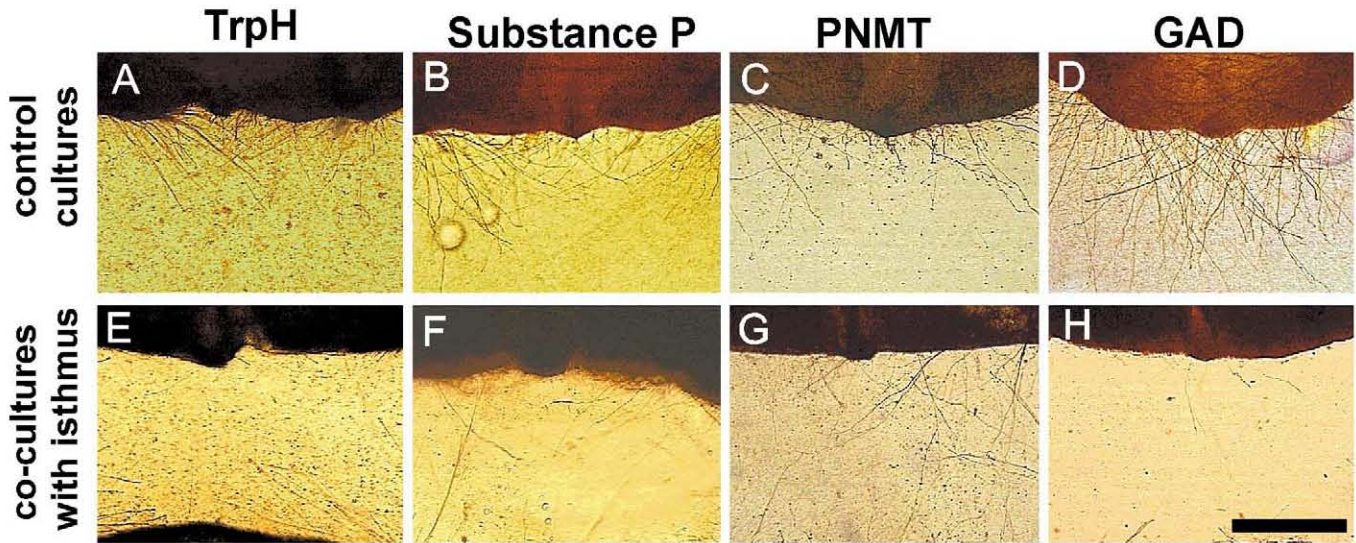


Fig. 5. The isthmus inhibits the caudal outgrowth of specific hindbrain neuronal populations. Hindbrain explants (r2–r3) were cultured alone or with explants from the isthmus adjacent to their caudal or rostral edge followed by immunostaining with antibodies for tryptophan hydroxylase (TrpH), substance P (sP), phenylethanolamine-*N*-methyltransferase (PNMT), and glutamic acid decarboxylase (GAD). (A–D) The caudal outgrowth from the r3 edge of explants cultured alone. (E–H) The caudal outgrowth of explants cultured with isthmus explants. Scale bar, 250  $\mu$ m.

## Results

### *The isthmus has a diffusible activity which inhibits the outgrowth of caudally projecting hindbrain axons*

In order to test whether diffusible cues control caudal axon projections in the rat developing brainstem, we cultured bilateral r2–r3 hindbrain explants from E14.5 rat embryos in a collagen matrix which is permissive for axon growth. To keep track of the polarity of the explants, their rostral edges were labeled with carmine powder. When such explants were cultured alone for 48 h, we observed abundant outgrowth extending from all four sides of the explants. Based on their normal trajectory *in vivo*, r2–r3 reticulospinal axons should extend from the caudal r3 explant border on either side of the floor plate (included in our explants). To test this idea, caudally projecting r2–r3 neurons were labeled retrogradely from the MLF at the r4–r5 boundary in intact rat embryos by using the lipophilic tracer DiI (Fig. 1A). Applying the dye at the r4–r5 boundary ensured the labeling within r2–r3 of only those neurons with a caudal longitudinal projection. Embryos were incubated until the dye traveled into r3, at which time r2–r3 explants were obtained and cultured in a collagen gel. At the end of the culture period, the neurons thus labeled projected exclusively from the caudal explant border, although labeled neurites constituted only about one-tenth of the total caudal outgrowth (Fig. 2A). This is not surprising since DiI-labeled axons are by definition regenerating, while a number of other axons will grow *de novo* from the explants. In a small number of cases, a few labeled neurites projected from rostral explant borders, which could correspond to the rostral branch of bifurcating axons labeled from their caudal

branch. This result supports the idea that axons which extend caudally *in vivo* also do so *in vitro* and indicates that the r2–r3 explants retain their rostrocaudal polarity; it also seems likely that rostrally projecting neurons maintain their normal pathways, although we did not test this directly. Quantitation of the total number of unlabeled axons or axon bundles showed that, in these control explants, cultured alone, there were approximately equal numbers of axons growing from the rostral and caudal explant borders (Fig. 3C and D).

Regions of the neuroepithelium that might produce guidance cues for the longitudinally projecting hindbrain neurons in our explants include those rostral to r2 or caudal to r3. We tested the effect of juxtaposing r8 or cervical spinal cord explants with r2–r3 explants on caudally projecting neurons and observed no change in the numbers of axons relative to controls, reflecting neither an inhibitory effect or a growth-enhancing activity (Fig. 3E). We tested the potential role of the midbrain–hindbrain boundary or isthmus as a source of axon guidance cues, by coculturing isthmus explants adjacent to the caudal border of an r2–r3 explant, which had been labeled with DiI as described above. In these experiments, axon outgrowth from caudal explant borders was drastically inhibited relative to controls (Fig. 2), and quantitation of the labeled axons showed that this result was significant. Similar quantitation on unlabeled explants revealed that the isthmus caused an 80% inhibition of caudal outgrowth (Fig. 3A–C). This suggests that the isthmus region could be a source of diffusible inhibitory or repulsive cues for caudally directed hindbrain axons *in vivo*, although an indirect effect by the activation by the diffusible signal of other guidance systems could also be invoked to explain these results.

To test the specificity of the isthmic inhibition on the caudal outgrowth, similar cultures were done in which the rostral explant border was placed adjacent to the isthmic explants. Since the outgrowth from this r2 edge would be expected to correspond with axons which grow toward the isthmus *in vivo*, no inhibition would be expected in this culture configuration. Nevertheless, a slight, nonsignificant reduction in the rostral axon outgrowth was observed (Fig. 3D). This inhibition, which was studied no further, may correspond to a small number of caudally projecting neurons from rostral r2 which project into the gel rostrally when the continuity with r1 and the isthmus is interrupted. Thus, the isthmus did not inhibit rostral outgrowth significantly, indicating specificity for the caudal axon outgrowth and implying that the isthmus might be responsible for orienting the caudal longitudinal axon projections via an inhibitory or chemorepulsive mechanism. It may be noted that, by quantitating effects on caudal outgrowth, we are documenting effects of the isthmus on reticulospinal axons which may have already made the choice to grow caudally in response to preexisting isthmic signals or other cues. Thus, we have revealed the ability of axons to reiterate their pathfinding behavior *in vitro*.

A repulsive activity might also be expected to cause a change in the direction of growth of caudal axons in addition to the inhibitory effect described. To distinguish between these two possibilities, cultures were done in which the isthmic explant was placed to one side and perpendicular to the caudal edge of the r2–r3 explant. In this configuration, the r3 caudal edge was not facing the isthmus and one side was closer to its influence than the contralateral one. In such cultures, the growth on the side closest to the isthmus showed a reduced outgrowth compared with the side away from it (Fig. 4B). For this reason, the average angle of caudal growth (relative to the caudal explant border) was then determined for the contralateral side of the explant and compared with the equivalent measurement of a randomly selected side in control explants cultured alone. The average angle of growth in control explants was found to be 68°, while in cultures with the isthmus, it was found to be significantly different at 111°, indicating a change in the direction of growth away from the isthmus (Fig. 4A–E). Although we did not measure growth cone turning in these assays, this evidence suggests that the midbrain–hindbrain region might secrete chemorepulsive molecules that could be involved in descending projections from the hindbrain. This activity may be the same activity that causes inhibition of caudal growth when the r3 edge is confronted with the isthmus in culture. In our cultures, the isthmic effect was more easily quantitated with the culture configuration that caused inhibition of growth. For this reason, we continued our studies with this configuration.

Experiments were also done to rule out the possibility of negative effects of the isthmus on reticulospinal neuron survival in the r2–r3 explants. Reticulospinal neurons from

E14.5 rat embryos were labeled from the MLF (bilaterally) at r5 level with rhodamine–dextran for 3 h. At the end of this period, the dye had been transported as far as the isthmic region, indicating that labeling at r2–r3 was complete. The r2–r3 explants were then obtained and cultured in collagen gels alone or with the isthmus adjacent to their r3 edge. After the incubation period, the total number of labeled cell bodies within the explants was counted blind. Fig. 4F shows a low-magnification view of a control explant cultured alone in which the cell bodies can be seen predominantly in two columns adjacent to the floor plate. If the isthmus had a negative effect on reticulospinal neuron survival, a smaller number of labeled cells would be expected in the coculture with isthmus (Fig. 4G) than in the culture of r2 alone. No significant difference was found between the average number of cells in cocultures and cultures of r2–r3 alone (Fig. 4H). This indicates that the isthmus does not have a negative effect on reticulospinal neuron survival and supports the view that the effects observed in the previous experiments are directly on axonal growth. It should be noted that the use of rhodamine–dextran did not allow the visualization of axonal processes after culture, since, within a few hours of incubation, a particulate distribution of the dye in the axons was observed and later it only remained in the cell bodies. This contrasts with the results obtained with DiI under similar culture conditions in which axonal processes were still detected after the 48-h culture period.

#### *Outgrowth of specific populations of hindbrain neurites is inhibited by isthmic explants*

In the experiments on caudal outgrowth, the total axon outgrowth was quantitated, perhaps conflating differential responses by specific neuronal populations. We therefore conducted similar culture experiments followed by immunostaining with antibodies which label several neuronal populations. Antibodies for tryptophan hydroxylase (TrpH) and substance P were used to identify subpopulations of raphe neurons (Parent, 1996), anti-phenylethanolamine-*N*-methyltransferase (PNMT) was used for adrenergic neurons, and anti-glutamate decarboxylase (GAD) for GABAergic neurons which form part of the raphe or reticular system (Parent, 1996). In collagen cocultures, the caudal outgrowth of TrpH-, substance P-, and GAD-positive axons was inhibited by isthmic explants, while PNMT-positive axon outgrowth was not inhibited significantly (Figs. 5 and 6A). The rostral outgrowth of all four types of neurites was largely refractory to the effect of the isthmus (Fig. 6B). Taken together, these data suggest that the isthmus inhibits the growth of caudally projecting reticular and raphe neurons, but not those of adrenergic neurons. Thus, the effect of the isthmus is specific to some neuronal subpopulations, based on their anatomical projection pattern and neurotransmitter phenotype.



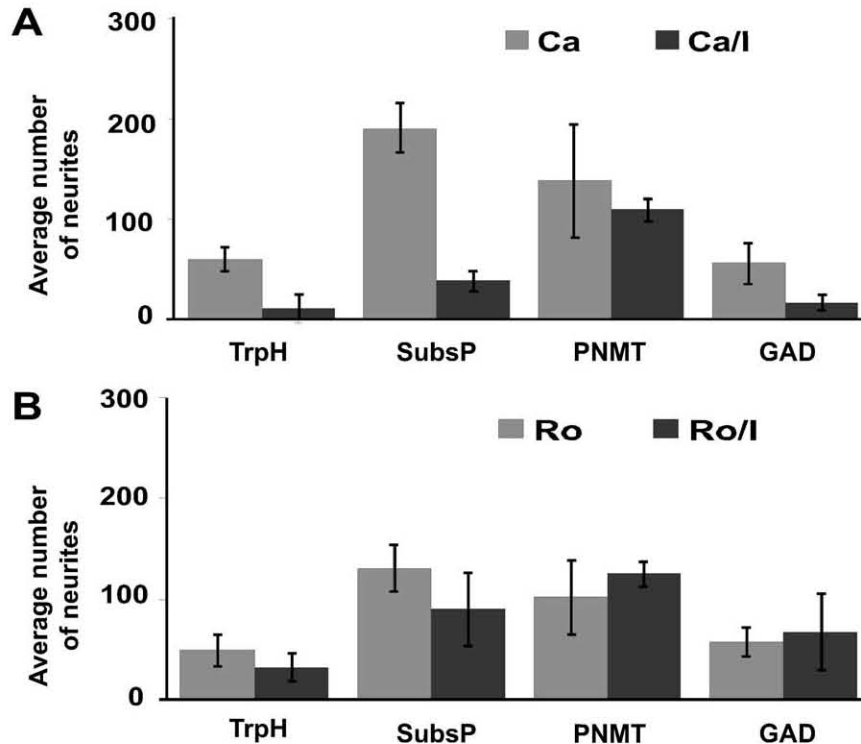


Fig. 6. The isthmus inhibits the outgrowth of hindbrain specific neuronal populations. (A) Effect of the isthmus on the caudal outgrowth of hindbrain neurites positive for tryptophan hydroxylase (TrpH), substance P (sP), phenylethanolamine-*N*-methyltransferase (PNMT), and glutamate decarboxylase (GAD). (B) Effect of the isthmus on the rostral outgrowth of hindbrain neuronal populations defined as in (A). The bar on the left of each pair shows the average outgrowth of control cultures of r2–r3 explants alone (Ca, caudal outgrowth; Ro, rostral outgrowth). The bar on the right shows the average outgrowth of cocultures with isthmus (Ca/I and Ro/I). The *n* numbers for each data set were: Caudal outgrowth: TrpH (14, 14), substance P (14, 14), PNMT (14, 14), and GAD (15, 15); Rostral outgrowth: TrpH (15, 15), substance P (16, 16), PNMT (15, 15), and GAD (14, 14).

#### *Caudally projecting hindbrain axons project aberrant in the absence of isthmic signals*

Our results indicate that the isthmus secretes molecules that inhibit the outgrowth of caudally projecting brainstem neurons *in vitro*. To determine whether the isthmus is required for the correct caudal projection of reticulospinal axons, we attempted to remove the isthmus by microsurgery on chick embryos *in ovo*. To prevent the diffusion of molecules from the isthmus to the rostral hindbrain, the neural tube of stage 12 embryos was sectioned completely at the r1–r2 boundary and a small strip of tissue was removed (r1–2-cut, Fig. 7A). It should be noted that this stage (HH12) corresponds with a time before the first reticulospinal neurons become postmitotic (HH14; Lumsden and Keynes, 1989). Thus, this operation separated the isthmus region from the hindbrain (from r2 caudally) at a stage when the reticulospinal projection has not begun. Control operations were performed by sectioning transversely the midbrain near its rostral end (rMb-cut, Fig. 7A). After the operations, the embryos were incubated to stage 19–22, and inspection showed that the cut ends had healed over separately, resulting in complete discontinuity between the two regions of the neuroepithelium. When the MLF was labeled at the level of the r6–r7 boundary in control and operated

embryos, reticulospinal neurons were labeled in control embryos throughout the hindbrain and were particularly localized to rostral and bulbar levels, as previously described (Fig. 7A and B). (Auclair et al., 1999; Glover and Petursdottir, 1988). The MLF was labeled and could be observed flanking the floor plate, while the cell bodies of labeled reticulospinal neurons were aligned transversely relative to the long axis of the neural tube. In most of the r1–r2 transected embryos, however, such labeling failed to reveal reticulospinal neurons in r2 and r3, although the rhombomeric structure had a normal appearance (Fig. 7C and F). In r4, the number of labeled neurons was reduced by approximately 70%, and their long axis showed a random orientation (box in Fig. 7C, and Fig. 7D and F). Reticulospinal neurons were often labeled within r5 and r6 and projected normally. These results suggest that, in the absence of the isthmus influence, rostral hindbrain reticulospinal neurons fail to project caudally, while more caudal neurons can still pursue their normal pathway.

Two factors complicate this simple interpretation; it is possible that removal of the isthmus influence might cause the failure of reticulospinal projections secondarily, due to changes in neuronal patterning and differentiation at the r2–r4 level, or to changes in the growth and guidance of

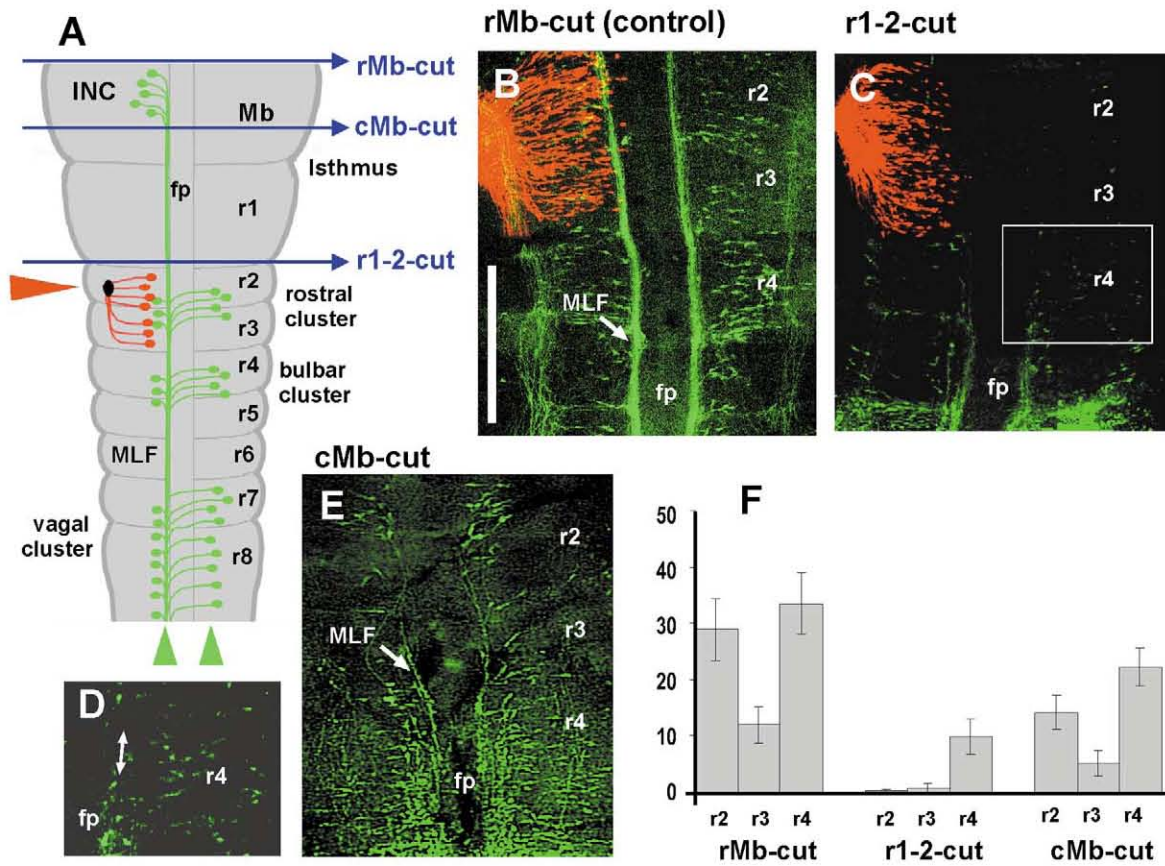


Fig. 7. Hindbrain reticulospinal neurons fail to project in the absence of isthmus-derived signals. The neural tube of stage 12 chick embryos was sectioned *in ovo* at one of three axial levels to assess the effect of the isthmus in reticulospinal neuron caudal projection. After the operation, the eggs were sealed and incubated for 2 more days when retrograde labeling of reticulospinal neurons and trigeminal motor neurons was performed. (A) Diagram of a flat-mounted chick hindbrain shown with blue horizontal lines at the axial levels where the neural tube was sectioned *in ovo*. Although the labeling was done in stage 12 embryos, the levels at which the cuts were made are shown in an older embryo. In control operations, the cut was made just rostral to the midbrain (rMb-cut). In the experimental operations, the cut was made at the r1-r2 boundary, separating the isthmus and r1 from the rest of the hindbrain (r1-2-cut) or rostral to the isthmus but caudal to the interstitial nucleus of Cajal (INC) (cMb-cut). Green arrowheads indicate the point where FITC-dextran was applied to label retrogradely the reticulospinal neurons, which are also shown in green. The diagram shows cells labeled from the MLF on the left for simplicity. The INC and the rostral, bulbar, and vagal clusters are shown (Glover and Petursdottir, 1991). The red arrowhead indicates the point where rhodamine-dextran was applied to label the trigeminal motor nucleus (mV), which is also shown in red spanning r2 and r3. Other abbreviations as in Fig. 1. (B) Control operation with the cut at the rostral midbrain (rMb-cut). Both reticulospinal neurons and the trigeminal motor nucleus appear normal. (C) Experimental operation with the cut at the r1-r2 boundary (r1-2-cut). Reticulospinal neurons fail to be labeled in r2-r3, but the trigeminal motor nucleus appears normal. The boxed area in r4 is shown in (D) at a higher magnification and with the contrast enhanced to show some labeled cells which lack the normal organization seen in control embryos. (E) Control operation with the cut rostral to the isthmus and caudal to the interstitial nucleus of Cajal (cMb-cut). Reticulospinal neurons appear normal, but their number is smaller relative to controls. (F) Effect of neural tube transections in reticulospinal projection. Retrogradely labeled reticulospinal neurons were counted in r2, r3, and r4 for each of the transections performed. *N* numbers for each transection were: rMb-cut, 6; r1-2-cut, 7; cMb-cut, 7. Scale bars (B, C, E), 500  $\mu$ m.

other axon tracts which might serve as pioneer tracts for reticulospinal neurons.

We first set out to analyze the possibility of untoward effects of the operations in reticulospinal neuron differentiation in the rostral rhombomeres. Immunostaining of stage 21 chick embryos with anti-GAD antibodies which recognize subpopulations of reticular neurons (Parent, 1996) revealed predominantly longitudinal projections in the rostral end of the hindbrain, including strong immunostaining in the MLF. At this stage, only reticulospinal neurons are known to project into the MLF (Glover and Petursdottir, 1991). GAD-positive somata were observed in the basal plate of r2-r4 aligned transversely relative to the long axis

of the hindbrain (Fig. 8A). This array is reminiscent of retrogradely labeled reticulospinal neurons. Ascending projections from the caudal end of the hindbrain were also detected lateral to the MLF with morphologically distinguishable growth cones (Fig. 8C). Overall, GAD immunostaining of control embryos revealed neuronal somata and longitudinal axons in the MLF that appear to correspond to reticulospinal neurons and ascending lateral axons from the caudal rhombomeres. In contrast, immunostaining of r1-r2 transected embryos incubated to reach stage 21 revealed GAD-positive neurons in the basal plate of r2 and r3 in numbers similar to those found in control embryos (Fig. 8D and F) but in noticeable disarray and with their short axons

## control / rMb-cut

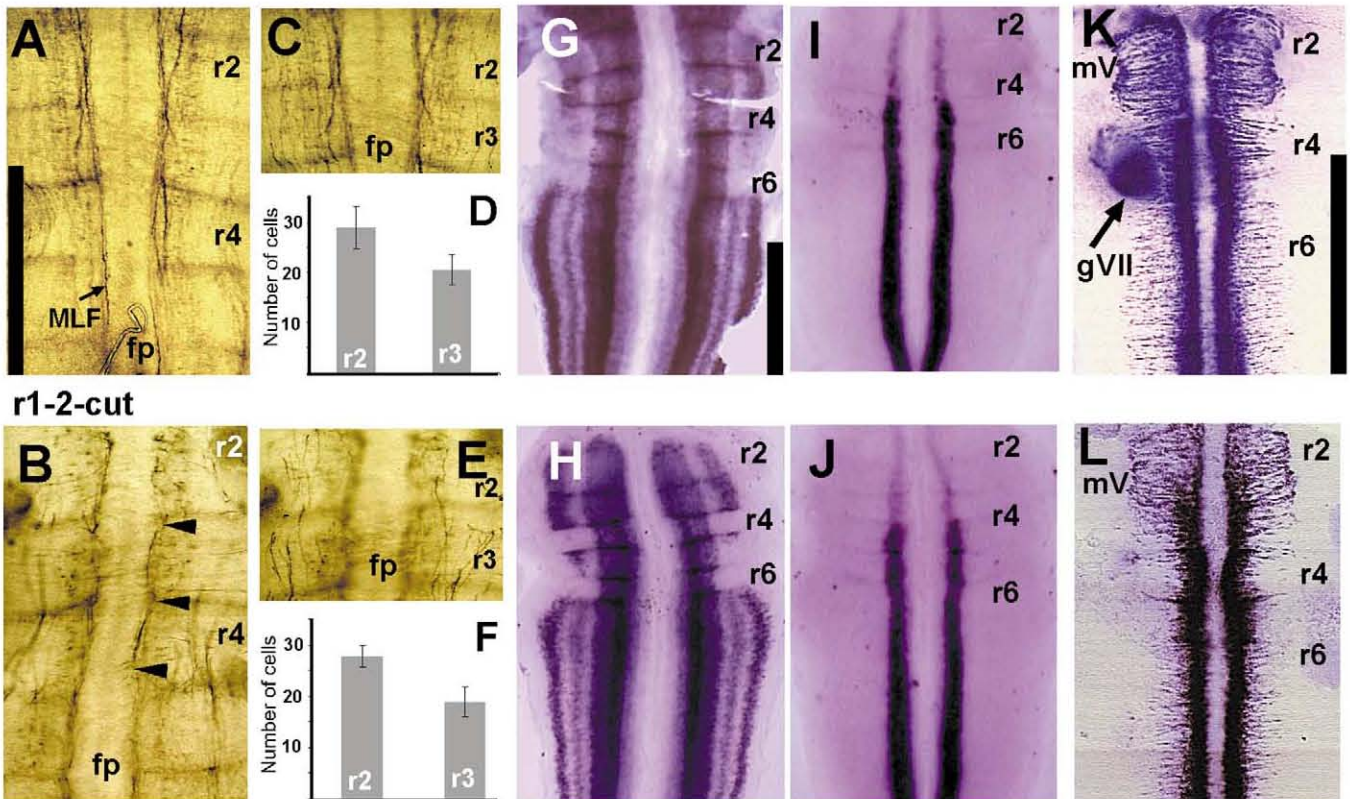


Fig. 8. Neural tube transections impair the projection of GAD-positive descending axons in the hindbrain but do not affect expression of reticulospinal neuron and motor neuron markers. Immunostaining was performed in control embryos (A, C) and r1-2-cut (B, E) embryos by using anti-GAD antibodies. Images in (A) and (B) were obtained by focusing on GAD-positive cell bodies and the MLF. Images in (C) and (E) were obtained from the same specimens shown in (A) and (B), respectively, but focusing on ascending projections. Arrowheads in (B) indicate discontinuities in longitudinal projections. The numbers of GAD-positive cells in each half of r2 and r3 in control (D) and r1-2-cut embryos (F) are shown. *N* numbers were: D, 12; F, 9. In situ hybridization was performed in rMb-cut (G, I, K) and r1-2-cut (H, J, L) embryos by using probes for Lhx-1 (G, H), Lhx-3 (I, J), and Islet-1 (K, L). r2, r4, and r6 are indicated in each picture for reference. In (E) and (F), exit points for trigeminal motor axons (mv) are shown. Arrow in (E) indicates the location of a fragment of the geniculate ganglion (gVII) for anatomical reference. This ganglion is attached to r4, but due to the mounting process, appears at the r4–r5 boundary. Scale bar in (A) (0.5 mm) also applies to (B), (C), and (E). Bar in (G) (1 mm) also applies to (H–J). Bar in (K) (1 mm) also applies to (L).

projecting aberrantly in several directions (Fig. 8B). Axons with sharp turns, lateral or ascending projections, not detected in control embryos were also observed in operated embryos. Some axons projected for short distances into the region normally occupied by the MLF in control embryos, but no continuous axonal tract was formed in the MLF in r2–r4. The lateral ascending projections from the caudal rhombomeres were observed to reach the rostral end of the transected hindbrain (Fig. 8E). Thus, these results suggest that reticulospinal neurons differentiate in normal numbers in r2 and r3 in the r1–r2 transected embryos but fail to follow their normal pathway in the absence influences from the neuroepithelium rostral to r2. These results also revealed that ascending axons from the caudal rhombomeres do not require rostral signals from r1 or the isthmus to follow their ascending path up to r2.

In parallel studies, we have found that, among reticulospinal neurons, 15% of all ipsilateral and 40% of all contralateral neurons are stained with an antibody that rec-

ognizes the Lhx1 and Lhx2 transcription factors, while a different population of ipsilateral neurons (20%) expresses Lhx3 (A.C.C.-N. J. Glover, S.L. Pfaff, and A.V.-E., unpublished observations). To assess the effect of the r1–r2 transections in the generation of neuronal populations that include subsets of reticulospinal neurons, we performed in situ hybridization analysis for Lhx1 and Lhx3 in r1–r2 transected embryos and found their expression patterns to be undistinguishable from unoperated embryos (Fig. 8G–J). These results suggest that reticulospinal differentiation is not likely to be affected by r1–r2 transections. As an additional test for normal neuronal differentiation in the transected embryos, we examined the neuronal patterning of the trigeminal motor nucleus, which lies within r2 and r3, and can be retrogradely labeled from the trigeminal ganglion (Fig. 7A). Labeling of embryos sectioned at r1–r2 or the rostral midbrain revealed normal patterning and axon projection of the trigeminal nucleus compared with the nonoperated embryos (Fig. 7B and C; and data not shown).

Moreover, *in situ* hybridization with a probe for *Islet-1*, a motor neuron marker (Tsuchida et al., 1994; Varela-Echavarría et al., 1996), revealed a normal distribution of developing motor neurons in embryos sectioned at r1–r2 or the rostral midbrain (controls) (Fig. 8K and L). Together, these results and those obtained by immunostaining with GAD antibodies support the idea that sectioning at the r1–r2 boundary does not produce major patterning defects and that the absence of reticulospinal projection from r2 and r3 is more likely to be a consequence of aberrant axonal pathfinding. Reticulospinal neurons are likely to differentiate normally but fail to project caudally to the point where their retrograde labeling can be achieved.

The second possible explanation for our results that we wish to examine is that the pioneer MLF descending fibers from the interstitial nucleus of Cajal (INC), located at the midbrain–diencephalon boundary, provide a substrate for fasciculated caudal axon growth in the hindbrain. In the embryos sectioned at the r1–r2 boundary, this descending tract is severed, which might result in the failure of the reticulospinal projection. To assess this possibility, operations were performed in which the caudal midbrain was sectioned transversely, separating the isthmus and the INC such that the caudal projection of the latter was severed without affecting continuity between the isthmus and the hindbrain (Fig. 7A). In such operated embryos, the caudal projection of reticulospinal neurons from r2 and r3 was reduced by approximately 50% and from r4 by 30% (Fig. 7E and F). These experiments show that, in addition to a diffusible signal from the isthmus that might act directly or indirectly on hindbrain descending axons, the MLF plays a critical role in the caudal projection of reticulospinal neurons, perhaps by providing a substrate for descending fasciculated growth.

## Discussion

### *The isthmus is a source of diffusible signals that affect hindbrain caudally projecting axons*

Our *in vitro* experiments show that caudal outgrowth of neurons from rostral hindbrain explants was inhibited by explants from the isthmus. A change in the angle of growth was observed when the isthmus was placed lateral to the r2–r3 explants, therefore suggesting a repulsive effect on caudal axons although a nonpermissive effect remains an important possibility. This effect appeared to be specific for caudally projecting serotonergic, substance P-positive, and GABAergic neurons. The rostral outgrowth of these neuronal types was not inhibited by the isthmus, and for adrenergic axons, neither rostral nor caudal growth was affected. The differential response to the isthmus suggests a specific effect on caudal axons of raphe (TrpH- and Substance P-positive) and reticulospinal (GAD-positive) neurons, while adrenergic neurons are not affected. Our studies sug-

gest then that the isthmus might secrete a component of a system of signals governing longitudinal pathfinding in the hindbrain and may be more important for those neurons which develop closest to the midbrain, in r1, r2, and r3. Thus, in embryos in which the neural tube was sectioned at the r1–r2 boundary, caudal projection of reticulospinal neurons was drastically impaired from r2 to r4, but it was normal from r5. The distance from the isthmus to r5 (approximately 450  $\mu\text{m}$  at the time reticulospinal projection begins) means that diffusion of molecules from the isthmus is less likely to operate at this level than at more rostral levels. Such an action of isthmus-derived signals on the rostral rhombomeres has been observed in the ability of the isthmus and FGF8 to inhibit the expression of *Hox-a2* in r1 (Irving and Mason, 2000). It should be noted that the severing of the MLF is also responsible for the drastic reduction of reticulospinal projection in the r1–r2 transected embryos (see below).

The absence of reticulospinal projection in the r1–r2 transected embryos could also be due to patterning defects in r2–r4 caused by the absence of the isthmus signals. Fgf8 secreted by the isthmus has been demonstrated to pattern r1, although its influence might indirectly extend into r2 and r3 (Irving and Mason, 2000). This morphogen, however, does not appear to signal directly across rhombomeric boundaries. Rhombomere transposition studies in chick embryos have also shown that the identity of rostral rhombomeres is largely refractory to local changes in environmental signals unless they are transposed far caudally into the hindbrain (Grapin-Botton et al., 1997; Guthrie et al., 1992; Itasaki et al., 1996; Kuratani and Eichele, 1993). For these reasons, it is unlikely that the identity of the rostral rhombomeres would change in r1–r2 transected embryos. This is in keeping with the finding that cell bodies immunostained with an anti-GAD antibody which identified reticulospinal neurons were found in similar numbers in r2 and r3 in control and r1–r2 transected embryos. Moreover, no changes were detected in the transected embryos in the patterns of expression in the hindbrain of *Lhx-1* and *Lhx-3*, which are markers for subpopulations of reticulospinal neurons. Furthermore, trigeminal motor neuron differentiation, migration, and axon guidance were found to occur normally in the r2–r3 territory in r1–r2 transected embryos as in control embryos. Hence, the absence of reticulospinal projection from r2 to r4 is probably due to the absence of a signal that diffuses from the isthmus and directly or indirectly affects caudal growth rather than patterning defects in the operated embryos which could result in impaired reticulospinal differentiation.

Overall, our results are consistent with a role of the isthmus in controlling reticulospinal axon projection by producing diffusible chemorepellent or nonpermissive molecules which determine the caudal projection of these axons in the rostral hindbrain. It is also possible that the signal that emanates from the isthmus activates the guidance system that governs caudal projection in the rostral end of the hindbrain.

### *Midbrain MLF axons are crucial for hindbrain reticulospinal projection*

Our observations on embryos in which the MLF tract from the INC was sectioned without disrupting the continuity between the isthmus and the hindbrain showed that rostral hindbrain reticulospinal axon projections were reduced by approximately 50% in r2 and r3 and by 30% in r4 compared with unoperated controls. This implies that this axon tract plays an important role in the reticulospinal axon projection, perhaps by providing a pioneer pathway for fasciculated axon growth. This also implies that the failure of the reticulospinal projection of r1–r2 transections is the compounded effect of the absence of the isthmic-derived signal and the absence of the pioneer pathway provided by the MLF. In contrast, however, laser ablation of the INC equivalent in zebrafish embryos, the *mlf* nucleus, did not affect the projection of the hindbrain reticulospinal axons (Metcalf and Hatta, 1989). Hence, even though mesencephalic MLF axons appear not to be essential for the projection of hindbrain reticulospinal neurons in zebrafish, in the avian brain, these axons seem to be critical for stereotypical reticulospinal pathfinding. This pioneer pathway, however, is less likely to be involved in the early caudal projection of other neuronal groups whose axons do not join the MLF and follow instead lateral descending routes.

### *Mechanisms of longitudinal axon projection in the developing CNS*

A mechanism for pioneer longitudinal axon pathfinding might be envisaged to consist of longitudinally restricted sources of guidance cues distributed along the long axis of the neural tube followed by the projection of later born neurons along the pioneer tracts. This idea would predict the existence of several of these sources due to the length of the neuraxis and the limited range of action of secreted cues. A second alternative is that the polarity of growth of pioneer axons depends on a continuous gradient of diffusible or anchored axon guidance signals along the rostrocaudal axis. Our results are in part consistent with the first alternative, since the evidence obtained from *in vitro* and *in vivo* experimental approaches suggests that the caudal projection of axons originating in the rostral region of the hindbrain is in part controlled by signals that diffuse from the midbrain–hindbrain boundary region. In consonance with this idea is the finding that the characteristic rostral turning of zebrafish epiphyseal axons is prevented when these neurons are transplanted caudally into the tectum (Kanki and Kuwada, 2000). It is therefore likely that the projection of pioneer longitudinal tracts in the developing brain is controlled by longitudinally restricted sources of guidance molecules. The existence of other sources of cues for the guidance of longitudinal axons in the brainstem is also suggested by the normal ascending projection of GAD-positive axons and normal descending projection of reticulospinal axons, both

originating from the caudal rhombomeres in the r1–r2 transected embryos.

### *Nature of the cues guiding pioneer longitudinal axons*

The molecular nature of the axon guidance activity of the midbrain–hindbrain boundary region or the molecules involved in the fasciculated MLF growth was not determined in this study. Of the molecules expressed and secreted at the isthmus, FGF8 is not a likely candidate for the chemorepulsive activity since its effect seems to be limited by rhombomeric boundaries (Irving and Mason, 2000). Wnt-1, which is known to associate tightly to the extracellular matrix (Jue et al., 1992; Schryver et al., 1996), is unlikely to reach r2–r4 as it would be required for the molecule responsible for controlling caudal guidance in this region. Of the known families of secreted guidance molecules, some members of the class 3 semaphorins stand out as potential candidates for this activity since their expression and that of their receptor *Npn-2* are consistent with such a role (data not shown). Future studies of the role of these and other molecules in guiding axons in the developing brainstem, including those of the INC, will allow us to identify components of the longitudinally restricted guidance systems in the developing brain. In the hindbrain, we propose that these signals involve diffusible molecules from the midbrain–hindbrain boundary region that may act as chemorepellent or inhibitory signals along with signals anchored in descending midbrain axons that serve as substrate for fasciculated growth.

### **Acknowledgments**

We thank Rafael Favila, Leopoldo González, Pilar Galarza, and Martín García Servín for technical support. We thank Pilgrim's Pride de México, S.A. de C.V. for providing fertile chick eggs. This work was supported by CONACYT (31882-N), a Human Frontier Science Program Grant RG145/98, and a Wellcome Trust International Research Development Fellowship (055194/Z/98) (to A.V.-E).

### **References**

- Aitken, A.R., Tork, I., 1988. Early development of serotonin-containing neurons and pathways as seen in wholemount preparations of the fetal rat brain. *J. Comp. Neurol.* 274, 32–47.
- Auclair, F., Marchand, R., Glover, J.C., 1999. Regional patterning of reticulospinal and vestibulospinal neurons in the hindbrain of mouse and rat embryos. *J. Comp. Neurol.* 411, 288–300.
- Clarke, J.D., Lumsden, A., 1993. Segmental repetition of neuronal phenotype sets in the chick embryo hindbrain. *Development* 118, 151–162.
- Dalhström, A., Fuxe, K., 1964. Evidence for the existence of monoamine-containing neurons in the CNS. I. Demonstration of monoamines in the cell bodies of brainstem neurons. *Acta Physiol. Scand.* 62, 1–55.
- Glover, J.C., Petrusdottir, G., 1988. Pathway specificity of reticulospinal and vestibulospinal projections in the 11-day chicken embryo. *J. Comp. Neurol.* 270, 25–38 60–61.

- Glover, J.C., Petrusdottir, G., 1991. Regional specificity of developing reticulospinal, vestibulospinal, and vestibulo-ocular projections in the chicken embryo. *J. Neurobiol.* 22, 353–376.
- Grapin-Botton, A., Bonnini, M.A., Le Douarin, N.M., 1997. Hox gene induction in the neural tube depends on three parameters: competence, signal supply and paralogous group. *Development* 124, 849–859.
- Guthrie, S., Muchamore, I., Kuroiwa, A., Marshall, H., Krumlauf, R., Lumsden, A., 1992. Neuroectodermal autonomy of Hox-2.9 expression revealed by rhombomere transpositions. *Nature* 356, 157–159.
- Hamburger, V., Hamilton, H.L., 1951. A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J. Comp. Neurol.* 88, 49–87.
- Hibbard, E., 1965. Orientation and directed growth of Mauthner's cell axons from duplicated vestibular nerve roots. *J. Exp. Neurol.* 13, 289–301.
- Houart, C., Westerfield, M., Wilson, S.W., 1998. A small population of anterior cells patterns the forebrain during zebrafish gastrulation. *Nature* 391, 788–792.
- Irving, C., Mason, I., 2000. Signalling by FGF8 from the isthmus patterns anterior hindbrain and establishes the anterior limit of Hox gene expression. *Development* 127, 177–186.
- Itasaki, N., Sharpe, J., Morrison, A., Krumlauf, R., 1996. Reprogramming Hox expression in the vertebrate hindbrain: influence of paraxial mesoderm and rhombomere transposition. *Neuron* 16, 487–500.
- Jue, S.F., Bradley, R.S., Rudnicki, J.A., Varmus, H.E., Brown, A.M., 1992. The mouse Wnt-1 gene can act via a paracrine mechanism in transformation of mammary epithelial cells. *Mol. Cell. Biol.* 12, 321–328.
- Kanki, J.P., Kuwada, J.Y., 2000. Growth cones utilize both widespread and local directional cues in the zebrafish brain. *Dev. Biol.* 219, 364–372.
- Kuratani, S.C., Eichele, G., 1993. Rhombomere transplantation repatterns the segmental organization of cranial nerves and reveals cell-autonomous expression of a homeodomain protein. *Development* 117, 105–117.
- Larsen, C.W., Zeltser, L.M., Lumsden, A., 2001. Boundary formation and compartment in the avian diencephalon. *J. Neurosci.* 21, 4699–4711.
- Lee, S.M., Danielian, P.S., Fritsch, B., McMahon, A.P., 1997. Evidence that FGF8 signalling from the midbrain–hindbrain junction regulates growth and polarity in the developing midbrain. *Development* 124, 959–969.
- Lumsden, A., Keynes, R., 1989. Segmental patterns of neuronal development in the chick hindbrain. *Nature* 337, 424–428.
- Lumsden, A., Krumlauf, R., 1996. Patterning the vertebrate neuraxis. *Science* 274, 1109–1115.
- Martinez, S., Crossley, P.H., Cobos, I., Rubenstein, J.L., Martin, G.R., 1999. FGF8 induces formation of an ectopic isthmus organizer and isthmocerebellar development via a repressive effect on Otx2 expression. *Development* 126, 1189–1200.
- Metcalfe, W.K., Hatta, K., 1989. Formation of the medial longitudinal fascicle in wild-type and mutant zebrafish embryos. *Soc. Neurosci. Abstr.* 15 (Part 1), 959.
- Mueller, B.K., 1999. Growth cone guidance: first steps towards a deeper understanding. *Annu. Rev. Neurosci.* 22, 351–388.
- Parent, A., 1996. *Carpenter's Human Anatomy*. Williams & Wilkins, Philadelphia.
- Rubenstein, J.L., Shimamura, K., Martinez, S., Puelles, L., 1998. Regionalization of the prosencephalic neural plate. *Annu. Rev. Neurosci.* 21, 445–477.
- Schryver, B., Hinck, L., Papkoff, J., 1996. Properties of Wnt-1 protein that enable cell surface association. *Oncogene* 13, 333–342.
- Shimada, S., Takatsuki, K., Wanaka, A., 1998. The catecholaminergic system. Noradrenergic-adrenergic systems, in: Tohyama, M., Takatsuki, K. (Eds.), *Atlas of the Neuroactive Substances and Their Receptors in the Rat*. Oxford University Press, New York, pp. 32–35.
- Tanabe, Y., Jessell, T.M., 1996. Diversity and pattern in the developing spinal cord [published erratum appears in *Science* 1997 Apr 4;276(5309):21]. *Science* 274, 1115–1123.
- Tessier-Lavigne, M., Goodman, C.S., 1996. The molecular biology of axon guidance. *Science* 274, 1123–1133.
- Tsuchida, T., Ensini, M., Morton, S.B., Baldassare, M., Edlund, T., Jessell, T.M., Pfaff, S.L., 1994. Topographic organization of embryonic motor neurons defined by expression of LIM homeobox genes [see comments]. *Cell* 79, 957–970.
- Varela-Echavarría, A., Guthrie, S., 1997. Molecules making waves in axon guidance. *Genes Dev.* 11, 545–557.
- Varela-Echavarría, A., Pfaff, S.L., Guthrie, S., 1996. Differential expression of LIM homeobox genes among motor neuron subpopulations in the developing chick brain stem. *Mol. Cell. Neurosci.* 8, 242–257.
- Varela-Echavarría, A., Tucker, A., Puschel, A.W., Guthrie, S., 1997. Motor axon subpopulations respond differentially to the chemorepellents netrin-1 and semaphorin D. *Neuron* 18, 193–207.
- Vertes, R.P., Fortin, W.J., Crane, A.M., 1999. Projections of the median raphe nucleus in the rat. *J. Comp. Neurol.* 407, 555–582.
- Wassarman, K.M., Lewandoski, M., Campbell, K., Joyner, A.L., Rubenstein, J.L., Martinez, S., Martin, G.R., 1997. Specification of the anterior hindbrain and establishment of a normal mid/hindbrain organizer is dependent on Gbx2 gene function. *Development* 124, 2923–2934.
- Zeltser, L.M., Larsen, C.W., Lumsden, A., 2001. A new developmental compartment in the forebrain regulated by Lunatic fringe. *Nat. Neurosci.* 4, 683–684.