



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

INSTITUTO DE NEUROBIOLÓGÍA

**CARACTERIZACIÓN DE FACTORES QUIMIORREPELENTES
PARA AXONES ROMBENCEFÁLICOS EN DESARROLLO**

T E S I S

QUE PRESENTA

ESPERANZA MELÉNDEZ HERRERA

COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

TUTOR: DR. ALFREDO VARELA ECHAVARRÍA

MÉXICO, D.F. 2006



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Varela quien no sólo fue un tutor y guía en mi formación académica, sino también una pieza fundamental en mi desarrollo personal

A los miembros de mi comité tutorial quienes a lo largo de mi entrenamiento doctoral participaron activamente en mi formación académica. Gracias Gabriel y Mauricio!

A Bryan quien siempre está ahí para mí

A mi preciosa mamá quien ha financiado mi formación personal y a mi hermanito

A Carmen, Liliana, Paty, Enrique, Rita, Ada, Lulú, Isa, Alejandra, Luis XIV y Ximena, amigos entrañables con quienes no sólo comparto el interés por la ciencia sino la imperiosa necesidad de disfrutar los placeres de la vida

A mis compañeros de laboratorio con quienes compartí momentos relevantes en mi desarrollo personal y académico

A todos los miembros del comité sinodal quienes me proporcionaron invaluable y pertinentes comentarios en la edición del presente manuscrito

A Leonor y Carmen, quienes siempre lograron lo imposible

A la DGEP por su apoyo económico

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS

ABSTRACT	1
RESUMEN	2
I. INTRODUCCIÓN	4
II. ANTECEDENTES	
1. Guía axonal	9
2. Moléculas guía	10
2.1. Semaforinas	11
2.2. Netrinas	11
2.3. Slit	12
3. Crecimiento axonal	12
4. Neurómeras y límites interneurómicos	14
5. Crecimiento axonal sobre rutas longitudinales	15
5.1. Tracto de la comisura postóptica (TPOC)	15
5.2. Fascículo longitudinal medial	16
5.3. Tracto mesencefálico del trigémino	16
5.4. Tracto mamilotegmental (MTT)	16
6. Tractos mesencefálicos longitudinales	17
6.1. Neuronas reticuloespinales	17
6.2. Neuronas del TMESV	18
7. El istmo como organizador del crecimiento axonal longitudinal	19
7.1. El istmo como fuente de moléculas que regulan la proyección axonal longitudinal	20
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	22
IV. HIPÓTESIS	23
V. OBJETIVO GENERAL	23
VI. OBJETIVOS PARTICULARES	23
VII. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	24
1. Análisis de los patrones de expresión de semaforinas y sus receptores en el cerebro en desarrollo de ratón y pollo	24
2. Estudios de ganancia de función	25
3. Estudios de pérdida de función	26

VIII. MATERIALES Y MÉTODOS	28
1. Hibridación <i>in situ</i>	28
2. Inmunohistoquímica	32
3. Electroporación <i>in ovo</i>	34
4. Marcaje axonal retrógrado	34
IX. RESULTADOS	35
1. Análisis de la expresión de las semaforinas y sus receptores en el prosencéfalo y mesencéfalo en desarrollo	35
1. 1. Las semaforinas clase III y sus receptores son expresados en neurómeras y límites interneuroméricos en el prosencéfalo y mesencéfalo de embriones de ratón	35
1. 1. 1. Semaforina 3A	35
1. 1. 2. Semaforina 3C	36
1. 1. 3. Semaforina 3F	36
1. 1. 4. Neuropilina 1	38
1. 1. 5. Neuropilina 2	38
1. 2. Las semaforinas clase III y sus receptores son expresados en límites interneuroméricos en el prosencéfalo y mesencéfalo de embriones de pollo	40
1. 2. 1. Semaforina 3A	40
1. 2. 2. Semaforina 3C	40
1. 2. 3. Semaforina 3F	41
1. 2. 4. Neuropilina 1	41
1. 2. 5. Neuropilina 2	43
2. Análisis de la expresión de las semaforinas de secreción y sus receptores en el rombencéfalo en desarrollo de embriones de ratón y pollo	44
2. 1. Las semaforinas y sus receptores son expresados en núcleos motores específicos en el rombencéfalo en desarrollo de ratón	44
2. 1. 1. Semaforina 3A	44
2. 1. 2. Semaforina 3C	45
2. 1. 3. Semaforina 3F	45
2. 1. 4. Neuropilina 1	48
2. 1. 5. Neuropilina 2	48
2. 2. Las semaforinas secretadas y sus receptores no presentan dominios de expresión restringidos a grupos neuronales específicos en el rombencéfalo en desarrollo de embriones en estadios análogos a aquéllos estudiados en ratón	49
2. 2. 1. Semaforina 3A	49
2. 2. 2. Semaforina 3C	49
2. 2. 3. Semaforina 3F	49
2. 2. 4. Neuropilina 1	50
2. 2. 5. Neuropilina 2	50
3. La expresión ectópica de las semaforinas de la clase III en el rombencéfalo de embriones de pollo no altera la proyección de las neuronas reticuloespinales	52

4. La expresión ectópica de un miembro de la familia de las semaforinas provoca aberraciones en la proyección de los axonas del TMESV en el mesencéfalo en desarrollo de embriones de pollo	55
5. Estudios de pérdida de función: electroporación <i>in ovo</i> de los cDNAs que codifican para el receptor npn-2	58
X. DISCUSIÓN	62
1. Las semaforinas de secreción son expresadas en límites interprosoméricos en el prosencéfalo y mesencéfalo en desarrollo de embriones de pollo y ratón	62
2. Coexpresión de semaforinas y neuropilinas en núcleos neuronales	63
3. Expresión de semaforinas en el istmo de embriones de ratón y pollo en estadios relevantes a la proyección de las neuronas reticuloespinales y del TMESV	67
4. La expresión ectópica de las semaforinas en el rombencéfalo en desarrollo de pollo no afecta la proyección de los axones reticuloespinales	68
5. La electroporación de sema-3F en el mesencéfalo ventral altera la proyección de los axones del TMESV	68
6. La pérdida de función de sema-3F a través de la electroporación del receptor npn-2 provoca aberraciones en la proyección de los axones del TMESV que cursan sobre el LLF	69
XI. CONCLUSIONES	71
XII. REFERENCIAS	72

ABSTRACT

Reticulospinal neurons and mesencephalic trigeminal neurons (TMESV) are the first neuronal populations that send their axons over a longitudinal pathway in the developing brainstem. Despite their relevance in the formation of important axon pathways of the central nervous system (CNS), the molecular signals that control their descending projection are unknown.

Semaphorins are chemotropic factors with multiple functions in the development of the CNS. To date no relationship has been suggested between members of the semaphorin family and the establishment of reticulospinal or TMESV neuronal projection. The present work has as a general objective the characterization of the mechanisms that control the longitudinal descending projection in the developing brainstem; to fulfill this aim the expression patterns of semaphorins and their neuropilin receptors in mice and chick brains were analyzed during the establishment of the projections of reticulospinal or TMESV neurons.

Our results revealed that semaphorins and their neuropilin receptors are expressed in domains restricted to specific neuromeres and their interneuromeric boundaries. Specifically, semaphorin (sema) -3F mRNA was identified in the chick embryo isthmus during developmental stages relevant to the projection of reticulospinal and TMESV neurons. The action of sema-3F over both axonal populations was evaluated by its ectopic expression by electroporation in regions where the axons of each population normally course. Our results indicate that sema-3F has no chemorepellent effect over the reticulospinal rhombencephalic populations that course the medial longitudinal fascicle (MLF). In contrast, the ectopic expression of sema-3F caused alterations in the projection of TMESV axons that incorporate into the lateral longitudinal fascicle (LLF). Such alterations included a reduction in the number of axons and aberrations in their trajectory such as wandering and projection in the rostral direction. Moreover, the electroporation of an expression vector for npn-2, the sema3F receptor, caused TMESV axons to project aberrantly into ventral territories and disorganized crosses at the level of the isthmus, which suggests that sema-3F expression in this structure limits the projection of TMESV axons excluding those from the ventral aspect of the midbrain and confining them to cross the mid-hindbrain boundary at a specific point.

RESUMEN

Las neuronas reticuloespinales y las neuronas del tracto mesencefálico del trigémino (TMESV) son las primeras poblaciones que envían sus axones sobre vías longitudinales en el tallo cerebral en desarrollo. A pesar de su relevancia en la formación de importantes vías axonales del sistema nervioso central (SNC), no se conocen las señales moleculares que controlan su proyección descendente.

Las semaforinas son factores quimiotrópicos con múltiples actividades en el desarrollo del SNC. Hasta el momento no se conoce una relación entre algún miembro de la familia de las semaforinas y el establecimiento de la proyección de las neuronas reticuloespinales o del TMESV. El presente trabajo tiene como objetivo general caracterizar los mecanismos que controlan la proyección longitudinal descendente en el tallo cerebral en desarrollo, para lo cual fueron analizados los patrones de expresión de las semaforinas y sus receptores neuropilinas en el cerebro de ratón y pollo durante el establecimiento de la proyección de las neuronas reticuloespinales y del TMESV. Nuestros resultados revelan que las semaforinas y sus receptores son expresados en dominios restringidos a neurómeras específicas y a sus límites interneuroméricos. Particularmente, el RNAm de semaforina (sema) -3F fue identificado en el istmo de embriones de pollo en estadios relevantes a la proyección de las neuronas reticuloespinales y del TMESV. La acción de sema-3F sobre ambas poblaciones axonales fue evaluada mediante su expresión ectópica en regiones por donde cursan normalmente los axones de cada población. Nuestros resultados indican que sema-3F no tiene efecto sobre las poblaciones reticuloespinales rombencefálicas que cursan sobre el fascículo longitudinal medial (MLF por sus siglas en inglés). Por el contrario, la expresión ectópica de sema-3F provocó alteraciones en la proyección de los axones del TMESV que se incorporan al fascículo longitudinal lateral (LLF por sus siglas en inglés). Dichas alteraciones incluyeron una reducción en el número de axones y aberraciones en su trayectoria, tales como desplazamiento azaroso y proyección rostral. Más aún, la electroporación del vector de npn-2, el principal receptor de sema-3F, provocó que los axones del TMESV proyectaran aberrantemente en territorios ventrales, así como cruces desorganizados a nivel del istmo, lo que sugiere que la expresión de sema-3F en esta estructura limita la proyección de los axones del TMESV confinándolos a cruzar en un punto.

I. INTRODUCCIÓN

El SNC está formado por una complicada red neural cuyo patrón principal se establece desde etapas tempranas del desarrollo embrionario. La formación de esta red requiere de la habilidad del axón en crecimiento de responder a las moléculas guía que se encuentran en el medio y que pueden ser atrayentes o repelentes.

En años recientes se han identificado numerosas moléculas capaces de guiar a los axones hacia sus células blanco. Estas moléculas incluyen a proteínas de la matriz extracelular (ECM por sus siglas en inglés), proteínas transmembranales y proteínas difusibles que se agrupan en familias de acuerdo a sus características bioquímicas y funcionales. Entre estas familias se encuentran las semaforinas, las netrinas (Varela-Echavarría et al., 1997) y las proteínas slit (Brose et al., 1999).

Durante los estadios tempranos del desarrollo del tubo neural es posible definir dos tipos básicos de crecimiento axonal: el circunferencial y el longitudinal (**Figura 1**). Algunos de los mecanismos moleculares que controlan la navegación axonal circunferencial se conocen ampliamente (Tessier-Lavigne y Goodman, 1996; Varela-Echavarría et al., 1997; Kidd et al., 1999). Sin embargo, los mecanismos que controlan la navegación sobre rutas longitudinales no han sido estudiados con detalle, a pesar de las distintas evidencias que señalan su existencia (Glover y Pettusdottir, 1991; Wightman et al., 1996).

Existen diversas proyecciones axonales a lo largo de rutas longitudinales. Particularmente, el mesencéfalo en formación es el principal origen de dos tractos longitudinales pioneros, el MLF y el TMESV. Ambos tractos nacen en diferentes sitios del mesencéfalo y prosómera (p) 1 y proyectan caudalmente hacia diferentes regiones del rombencéfalo y médula espinal, constituyendo las dos principales rutas descendentes en el tallo cerebral en desarrollo (**Figura 1**).

El MLF y el LLF son encabezados por axones del núcleo intersticial de Cajal (niC) y del núcleo trigeminal mesencefálico, respectivamente (Easter et al., 1993). El MLF se encuentra constituido por al menos seis poblaciones celulares que se unen en diferentes niveles del fascículo; y una de ellas es la población de neuronas reticuloespinales, la cual surge de cuatro grupos neuronales localizados en el mesencéfalo y rombencéfalo en desarrollo (**Figura 2A**) (Glover y Petusdottir, 1988; 1991; Glover, 1993). Por su parte, el núcleo trigeminal se encuentra constituido por

tres (ratón) y cuatro (pollo) grupos neuronales localizados principalmente en el mesencéfalo (**Figura 2B**) (Sánchez et al., 2002).

Hasta el momento se sabe poco acerca de los mecanismos que guían la proyección de ambos tractos. En un intento por elucidar la naturaleza de dichos mecanismos, un trabajo previo de nuestro grupo identificó al límite mesencéfalo/rombencéfalo (istmo) como una fuente de factores que regulan el crecimiento de axones reticuloespinales rombencefálicos sobre vías longitudinales descendentes (Hernández-Montiel et al., 2003).

Por su parte, Molle et al. (2004) identificaron las señales que mantienen a los fascículos longitudinales medial y lateral separados el uno del otro y alejados de la línea media, y sugirieron la presencia de una señal no identificada, localizada en la región dorsal del istmo/rombómera (r) 1, que funciona como repelente de ambos tractos.

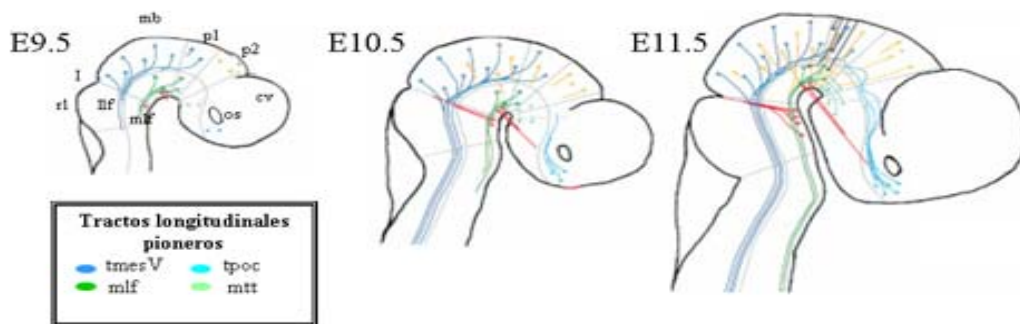


Figura 1. Esquema de la formación de tractos pioneros en el mesencéfalo y prosencéfalo de embriones de ratón. Cada dibujo representa la formación de los tractos pioneros en función de los estadios arriba señalados. Cabe señalar que la distribución de los tractos es semejante en ratón y pollo, con algunas diferencias descritas en el apartado 5. “Crecimiento axonal sobre rutas longitudinales”. Los tractos circunferenciales pioneros son mostrados en rojo, amarillo y gris, pero su descripción queda fuera de los alcances del presente trabajo. Cv, vesícula cerebral; I, istmo; LLF, fascículo longitudinal lateral; mb, mesencéfalo; MLF, fascículo longitudinal medial; MTT, tracto mamilotegmental; os, tallo óptico; p, prosómera; TMESV, tracto mesencefálico del trigémino; TPOC, tracto de la comisura postóptica. Esquema modificado de Mastick y Easter, 1996.

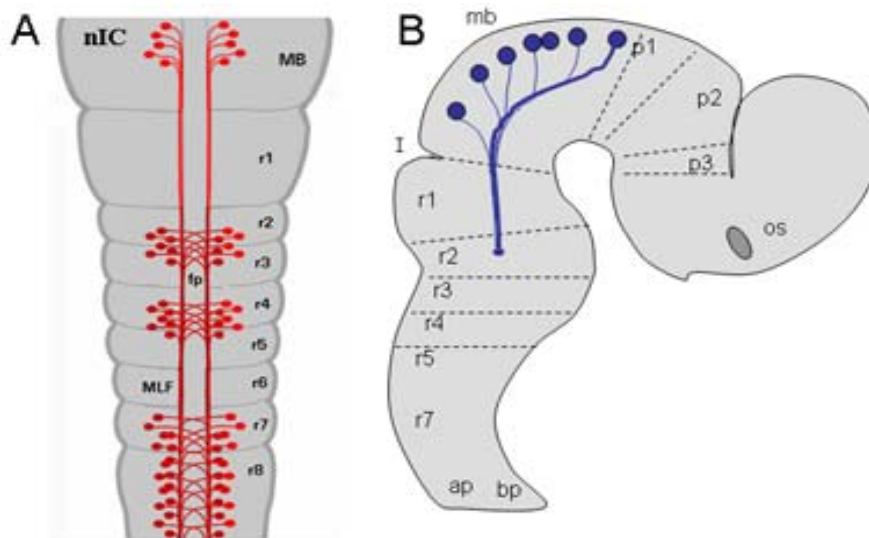


Figura 2. Esquema de la proyección longitudinal descendente de las neuronas que forman el MLF y el LLF en el cerebro en desarrollo. A, Montaje plano, libro abierto del rombencéfalo mostrando en rojo las neuronas reticuloespinales que cursan sobre el MLF. B, Vista lateral del cerebro de un embrión mostrando en azul la proyección del TMESV. Ap, placa alar; bp, placa basal; I, istmo; mb, mesencéfalo; MLF, fascículo longitudinal medial; os, tallo óptico; r, rombómera; p, prosómera; TMESV tracto mesencefálico del trigémino.

Actualmente se sabe que después de la inducción de la placa neural, el subsecuente refinamiento de la especificación anteroposterior (A/P) en el cerebro es llevado a cabo, al menos en parte, mediante la acción de centros organizadores, entre los que se encuentran algunos límites interneuroméricos. Las neurómeras constituyen dominios transversales independientes localizados a lo largo del eje A/P del tubo neural. Dichas unidades están separadas por bordes interneuroméricos discretos, algunos de los cuales muestran índices más lentos de división celular y restricción de linaje celular (**Figura 3**) (Shimamura et al., 1997).

Recientemente ha sido postulada una relación entre la formación de neurómeras y sus límites con la formación de rutas axonales (**Figura 3**) (Funato et al., 2000; Krauss et al., 1991). Dominios de expresión de numerosos genes reguladores dentro del neuroepitelio parecen predecir y demarcar sitios de diferenciación temprana y de formación de tractos pioneros (Puelles y Rubenstein, 2003; Shimamura et al., 1995, 1997; Wilson et al., 1997).

Las semaforinas clase III son proteínas de secreción identificadas únicamente en vertebrados. Sus receptores son las proteínas de membrana denominadas neuropilinas. Durante la formación de tractos axonales, un miembro de la familia de las

semaforinas y su receptor han sido identificados como moléculas capaces de restringir la ruta de los axones sobre límites interneuroméricos en el diencefalo en desarrollo (Funato et al., 2000). Hasta el momento, ningún miembro de esta familia ha sido identificado en la guía de los axones reticuloespinales y del TMESV.

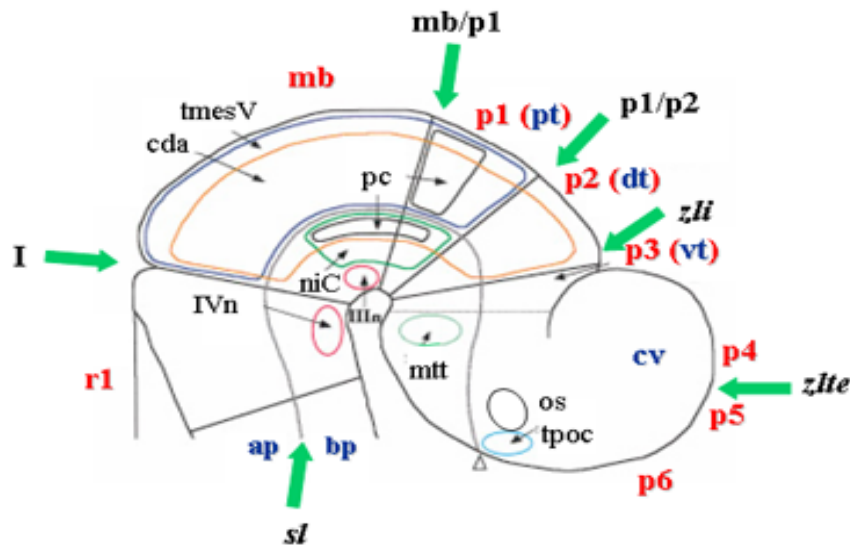


Figura 3. Esquema de la organización espacial de los cuerpos neuronales origen de cada tracto en el mesencéfalo y prosencéfalo de embriones, en relación a la formación de neurómeras (letras rojas) y a sus límites interneuroméricos (flechas verdes). III, núcleo oculomotor; IV, núcleo troclear; ap, placa alar; bp, placa basal; cda, comisura anterior; cv, vesícula cerebral; dt, tálamo dorsal; I, istmo; mb, mesencéfalo; MTT, tracto mamilotegmental; os, tallo óptico; niC, núcleo intersticial de Cajal; pc, comisura posterior; p, prosómera; pt, pretectum; r, rombómera; sl, sulcus limitans, TMESV, tracto mesencefálico del trigémino; TPOC, tracto de la comisura postóptica; vt, tálamo ventral; zli, zona limitans intratálámica; zlte, zona limitans telencefálica. Modificado de Mastick y Easter, 1996.

El presente proyecto forma parte de una amplia propuesta de investigación en la que se estudian los mecanismos de proyección longitudinal en el tallo cerebral en desarrollo. Debido a que las semaforinas son moléculas de guía axonal relevantes para numerosos sistemas en el SNC en desarrollo, cuyo papel funcional en el establecimiento de la proyección longitudinal de los axones reticuloespinales y del TMESV no se conoce, en este trabajo se analizaron los patrones de expresión de las semaforinas y sus receptores en el cerebro en desarrollo de ratón y pollo con el fin de evaluar su participación como moléculas de señalización de estas proyecciones descendentes.

II. ANTECEDENTES

1. Guía axonal

La extensión del axón y su guía hacia las regiones blanco con las cuales establecerá contacto sináptico constituyen eventos básicos para el desarrollo apropiado del SNC. Tales eventos forman parte del programa de diferenciación de las neuronas, y son llevados a cabo después de la última división celular (Daston y Koester, 1996).

Al crecer lejos del cuerpo neuronal, el axón debe elegir entre los varios sustratos que se encuentra a lo largo del camino hasta llegar a su destino final. Posee en su extremo distal un sensor, el cono de crecimiento, capaz de detectar las numerosas señales moleculares ubicadas en el medio a través de receptores especializados localizados en su membrana. La activación de tales receptores mediante ligandos específicos desencadena cascadas de señalización que alteran la dinámica del citoesqueleto resultando en movimientos de atracción o repulsión (Tessier-Lavigne y Goodman, 1996).

Además, el axón emplea diversas características del entorno para encontrar y continuar su camino. Así, el axón utiliza las primeras rutas establecidas por neuronas pioneras que se diferencian temprano, de tal manera que los axones de crecimiento temprano pueden proporcionar un sustrato para la fasciculación de axones de crecimiento tardío formando tractos o fascículos que a su vez pueden funcionar como sustrato para otros axones hacia su blanco final (Holley y Silver, 1987). Tal es el caso de algunas poblaciones de neuronas de proyección longitudinal cuyos axones proyectan de modo no sincronizado y se van uniendo en diferentes niveles del fascículo preformado (Mastick y Easter, 1996).

Asimismo, el crecimiento de los axones se lleva a cabo a través de la utilización de blancos intermedios, los cuales proporcionan claves cruciales para su guía. Primero, el axón recorre una cierta distancia hasta encontrar un blanco, posteriormente continúa hacia otra estructura más cercana a su blanco final, y así sucesivamente hasta llegar a éste. Un ejemplo de este mecanismo lo constituyen los axones comisurales espinales, los cuales proyectan desde regiones dorsales del tubo neural hasta la placa del piso, antes de virar rostralmente hacia su blanco final (Yaginuma et al., 1993).

Los axones pueden también interactuar con sus blancos aún antes de que éstos se encuentren en su posición final (Tanahill et al., 1997). Tal es el caso de axones motores del nervio abducens, los cuales establecen contacto con los músculos extraoculares antes que dichos músculos migren a la cápsula del ojo en embriones de pollo (Wahl et al., 1994).

Otra manera de formar conexiones estereotípicas consiste en la migración diferencial del soma neural, el cual puede seguir al axón en crecimiento o migrar en una dirección distinta. En este sentido, ha sido demostrado que algunos grupos neuronales proyectan primero sus axones en tractos y después sus cuerpos celulares son translocados de sus sitios de origen. Tal es el caso de ciertas subpoblaciones de neuronas oculomotoras y vestibuloacústicas, las cuales mueven sus somas a través de la placa del piso a posiciones contralaterales, mientras que los somas de otras neuronas como las trocleares migran hacia neurómeras adyacentes (Referido en Mastick y Easter, 1996).

2. Moléculas guía

El proceso de elongación del axón puede ser modulado a través de dos mecanismos generales. El primero de estos mecanismos involucra señales de corto alcance, y se caracteriza porque la regulación del crecimiento del axón depende del contacto con factores moleculares anclados en el sustrato o en la membrana de la célula que los produce. El segundo tipo involucra señales de largo alcance, las cuales se difunden en el medio y son capaces de guiar al cono de crecimiento axonal hacia su destino inmediato o final.

Muchas de estas moléculas que modulan el crecimiento axonal forman parte de familias de moléculas de señalización filogenéticamente conservadas durante la evolución de los metazoarios (Varela-Echavarría y Guthrie, 1997). Entre ellas, es posible identificar a las semaforinas, netrinas, proteínas slit, efrinas y a sus receptores especializados. Debido a la naturaleza del presente trabajo, a continuación se describen de manera breve algunas de las familias de moléculas de largo alcance.

2.1. Semaforinas

La mayoría de los miembros de esta familia de proteínas tienen efectos sobre los axones de algunas poblaciones neuronales durante su desarrollo. En el humano se han identificado más de veinte semaforinas distintas. Éstas pueden ser secretadas (sema-3A, -3B, -3C, -3D, -3E, -3F y -3G) o transmembranales, y poseen un dominio extracelular característico denominado sema de aproximadamente 500 aminoácidos.

Se han descrito dos familias de proteínas que son componentes de los complejos receptores para los diferentes grupos de semaforinas. La primera familia incluye dos miembros denominados npn-1 y -2. La npn-1 es el receptor para las sema-3A, -3B y -3C, uniéndose con mayor afinidad a la sema-3A, mientras npn-2 se une con mayor afinidad a las sema-3C, -3F (Giger et al., 1998; Chen et al., 1997) y 3G (Taniguchi et al., 2005).

La segunda familia se denomina plexinas. Estas proteínas se encuentran agrupadas en cuatro categorías y se ha demostrado que constituyen el dominio citoplasmático que transduce los efectos biológicos de las semaforinas. Las plexinas forman complejos con las npns, las cuales se unen con mayor afinidad a las semaforinas y constituyen el dominio extracelular del complejo receptor (Takahashi et al., 1999). Una excepción a la regla es sema-3E, la cual se une directamente a plexina-D1 (Gu et al., 2005).

2.2. Netrinas

Los miembros de esta familia son moléculas difusibles relacionadas a la proteína laminina. En nemátodos, UNC-40 se identificó como el receptor que media la quimioatracción de netrina y UNC-5 como el mediador de la respuesta de quimiorrepulsión (Chan et al., 1996); mientras en vertebrados DCC (Deleted in colorectal cancer) es el receptor que media la quimioatracción y complejos que involucran a DCC y UNC5 median la repulsión (Keino-Masu et al., 1996).

2.3. Slit

Los miembros de esta familia constituyen proteínas secretadas que se expresan en células no neuronales de la línea media y en regiones adyacentes. En invertebrados existe un solo gen que codifica para esta proteína, mientras que en vertebrados existen tres genes. La proteína slit se fija a la placa del piso mediante laminina y parte de ella se procesa proteolíticamente, lo que se sugiere que dichos fragmentos difunden distancias mayores que la proteína completa (Brose et al., 1999).

La proteína roundabout (robo), miembro de la super familia IgG de moléculas de adhesión celular (CAM por sus siglas en inglés), ha sido identificada como su receptor (Kidd et al., 1999). Hasta el momento, cuatro miembros denominados robo-1,-2, -3 y -4, han sido descritos en vertebrados.

3. Crecimiento axonal

Durante los estadios tempranos del desarrollo del tubo neural es posible identificar dos tipos básicos de crecimiento axonal: 1) crecimiento circunferencial que sigue rutas perpendiculares al eje longitudinal del tubo neural y 2) crecimiento longitudinal, el cual sigue rutas paralelas a dicho eje (**Figura 1**) (Holley y Silver, 1987).

Ambos tipos de crecimiento axonal ocurren desde etapas tempranas, cuando el tubo neural está constituido por una delgada capa de células y el crecimiento axonal ocurre sólo en dos dimensiones, y continúa haciéndose más complejo en estadios avanzados de desarrollo hasta convertirse en la entramada red axonal característica del SNC adulto (**Figura 1**) (Varela-Echavarría y Guthrie, 1997).

En la actualidad se sabe que existen notables diferencias entre estos dos tipos de proyecciones; mientras los axones longitudinales crecen en fascículos desde que proyectan longitudinalmente, aquéllos que siguen rutas circunferenciales parecen crecer dispersos evitando las interacciones con los axones preformados para fascicular con ellos (**Figura 1**) (Holley y Silver, 1987).

Algunos de los mecanismos moleculares que controlan la navegación axonal sobre rutas circunferenciales se conocen ampliamente. Así, se sabe que la placa del piso es una fuente de moléculas quimioatrayentes que regulan el cruce de los axones comisurales. Al mismo tiempo, se sabe que una de estas moléculas (netrina-1) es capaz de repeler el crecimiento de los axones motores sobre la placa del piso (Colamarino et al., 1995; Varela-Echavarría et al., 1997).

Se ha determinado que las moléculas slit, secretadas por células de la línea media, están involucradas en la repulsión de axones comisurales en *Drosophila* (Kidd et al., 1999). También en la mosca de la fruta se ha identificado una molécula involucrada en la formación de comisuras sobre la placa del piso. Se sabe que esta molécula (comm) interacciona con el receptor de slit regulando su expresión sobre los conos de crecimiento de los axones de proyección circunferencial (Kidd et al., 1998).

Asimismo, se ha estudiado la participación de algunas moléculas de corto alcance. Por ejemplo, se sabe que en embriones de pollo axonina-1, Ng-CAM y Nr-CAM promueven el cruce de los axones comisurales (Stoeckli y Landmesser, 1995).

Por su parte, los mecanismos moleculares capaces de guiar el crecimiento axonal sobre vías longitudinales se han estudiados menos, a pesar de que distintas evidencias señalan su existencia. Así, se sabe que al menos en *C. elegans*, existe una proteína (vab-8) capaz de regular el crecimiento de los axones de proyección longitudinal descendente (Wightman et al., 1996; Wolf et al., 1998). En trasplantes homotípicos de segmentos torácicos espinales en embriones de pollo se ha sugerido la presencia de señales quimiotrópicas capaces de guiar a los axones hacia niveles rostrales atrayéndolos (Yaginuma y Oppenheim, 1991).

Incluso, parecen existir notables diferencias entre los mecanismos que guían el crecimiento axonal sobre vías longitudinales en el cerebro y aquéllos identificados en la médula espinal. Dos trabajos recientes (Lyuksyutova et al., 2003 y Bourikas et al., 2005) identificaron mecanismos que regulan el crecimiento de axones espinales que siguen rutas longitudinales ascendentes hacia el cerebro en desarrollo. Mientras Lyuksyutova et al. (2003) identificaron a Wnt-4 como un factor atrayente que se expresa a lo largo del eje A/P de la médula espinal formando un gradiente que va decreciendo en niveles caudales, Bourikas et al. (2005) identificaron el gradiente del repelente sonic hedgehog (Shh) en dirección opuesta, de tal manera que ahora se propone que los axones espinales ascienden hacia el cerebro siguiendo el gradiente de Wnt-4 al mismo tiempo que se alejan de la señal repelente regulada por Shh.

En el cerebro en desarrollo tales mecanismos se desconocen, pero se han propuesto ciertos organizadores del crecimiento axonal longitudinal localizados a lo largo del eje A/P, como es el caso del istmo (Hernández-Montiel et al., 2003).

4. Neurómeras y límites interneuroméricos

Durante el desarrollo, el SNC se encuentra dividido transitoriamente en numerosos dominios transversales denominados neurómeras, los cuales representan campos morfogenéticos independientes, identificados a lo largo del eje A/P. Estas unidades transversales están divididas por bordes discretos conocidos como límites interneuroméricos (**Figura 3**) (Rubenstein et al., 1998; Shimamura et al., 1995).

Las neurómeras aparecen poco tiempo después de la neurulación. Durante este tiempo, una serie de constricciones anilladas marcan los límites aproximados entre los primordios de las tres principales regiones cerebrales: el prosencéfalo, el mesencéfalo y el rombencéfalo (**Figura 3**) (Rubenstein et al., 1998). Conforme el desarrollo procede, hay constricciones adicionales que van subdividiendo el cerebro (revisado en Lumsden and Krumlauf, 1996; Rubenstein et al., 1998). Las neurómeras se subdividen además en el eje D/V por estructuras longitudinales denominadas placas del piso, del techo, alar y basal (**Figura 3**) (Shimamura et al., 1995; Rubenstein et al., 1998). Las neurómeras mejor caracterizadas son aquéllas localizadas en el rombencéfalo, donde se denominan rombómeras, aún cuando la evidencia reciente sugiere que el prosencéfalo está dividido de manera similar en prosómeras (**Figura 3**) (Puelles y Rubenstein, 2003).

La neurogénesis comienza después de la definición de las neurómeras en E8.5 en el prosencéfalo y mesencéfalo de ratón (Easter et al., 1993), y en pollo alrededor de los estadios 13-14 (HH13–14 de acuerdo a Hamburger and Hamilton, 1951) en el prosencéfalo caudal (Chedotal et al., 1995).

Resulta muy interesante que las primeras neuronas que se diferencian orienten sus axones transversalmente a lo largo de dichos límites (**Figuras 1 y 3**) (Lumsden y Keynes, 1989; Mastick y Easter, 1996). Más aún, los dominios de expresión de muchos genes reguladores dentro del neuroepitelio parecen predecir y demarcar sitios de diferenciación temprana y de formación de tractos pioneros (Puelles y Rubenstein, 2003; Shimamura et al., 1995, 1997; Wilson et al., 1997). Así, parece probable que a lo largo del eje A/P las señales guía sean producidas por estructuras como las neurómeras o sus límites, algunos de los cuales funcionan como centros organizadores (Martínez et al., 1999; Hernández-Montiel et al., 2003). De hecho, se ha postulado una relación entre las neurómeras y la formación de rutas axonales (Funato et al., 2000; Krauss et al., 1991).

5. Crecimiento axonal sobre rutas longitudinales

Los axones de proyección longitudinal en el cerebro en desarrollo pueden ser clasificados en ascendentes y descendentes. En el ratón, los primeros axones comienzan a aparecer temprano en el desarrollo del SNC (día embrionario 9; E9). Un día después (E10.5), ya es posible identificar ocho tractos, cuatro de los cuales son de proyección descendente, y a pesar de que el número de neuronas incrementa rápidamente, estos tractos son mantenidos, lo que sugiere que los axones de crecimiento tardío se unen a los tractos ya formados en lugar de crear otros nuevos (Mastick y Easter, 1996) (**Figura 1**).

A continuación se describen las principales características de los cuatro fascículos longitudinales descendentes identificados en el cerebro en desarrollo.

5.1. Tracto de la comisura postóptica (TPOC)

En E9.5 dos tractos se originan de células en la placa basal. Uno de ellos es el tpo, el cual nace en la base del tallo óptico hacia el nivel de la flexión cefálica. La inmunotinción específica para este tracto muestra que en E10 se extiende hasta p1, donde coalesce con el TMESV, estableciendo una ruta longitudinal caudal que se prolonga desde p6 hasta el rombencéfalo (**Figura 1**) (Mastick y Easter, 1996). En pollo este tracto surge temprano en el desarrollo desde HH14 (Chedotal et al., 1995).

5.2. Fascículo longitudinal medial

El otro tracto que nace desde etapas tempranas en la placa basal es el MLF. Este tracto determina la ruta longitudinal más ventral en el SNC en desarrollo. En el pollo, el MLF es el primer tracto descendente que surge en el prosencéfalo (Chedotal et al., 1995), mientras que en el ratón aparece posteriormente en el desarrollo (E9.5, Easter et al., 1993). Más tarde, los axones de otras células como las neuronas reticuloespinales rombencefálicas que nacen en distintos niveles del tubo neural se incorporan a él (**Figuras 1 y 2**).

5.3. Tracto mesencefálico del trigémino

Los primeros axones de este tracto aparecen casi inmediatamente después del cierre del tubo neural. Así, es posible identificar en E9 axones que se originan de células mesencefálicas en la placa alar. Estas células corresponden en el adulto al núcleo mesencefálico del nervio trigémino, y sus axones a las fibras descendentes características de dicho núcleo. En E9.5 es posible observar la unión de los axones mesencefálicos para formar un tracto longitudinal sobre la superficie dorsolateral del tubo neural (Easter et al., 1993). En E10 se distinguen también cuerpos celulares más rostralmente en p1 (**Figuras 1 y 2**), consistentes con la localización de este mismo núcleo en embriones de pollo. En pollo, este tracto comienza su proyección en HH14-15 (Chedotal et al., 1995; Mastick y Easter, 1996).

5.4. Tracto mamilotegmental (MTT)

Más tardíamente, en E10, es posible identificar el MTT, el cual se extiende desde la región que formará el cuerpo mamilar en p4 hasta el rombencéfalo, cursando en el MLF (**Figura 1**). Las proyecciones mamilares que viajan a través del tracto mamilar primario son establecidas desde estas etapas embrionarias, y el tracto mamilotegmental está completamente desarrollado en E15 (Valverde et al., 2000).

6. Tractos mesencefálicos longitudinales

6.1. Neuronas reticuloespinales

En el adulto, las neuronas reticuloespinales forman circuitos funcionales con las neuronas motoras, y están involucradas en la modulación de las respuestas motoras somáticas y viscerales, tales como el mantenimiento de la postura, la locomoción, el control del reflejo motor, la nociocepción, y el control de las funciones cardiovasculares y respiratorias (Glover y Petursdottir, 1988).

Estas neuronas nacen en diferentes regiones del tubo neural en desarrollo. Proyectan circunferencialmente hacia la placa del piso para después virar e

incorporarse al MLF ipsi o contralateralmente siguiendo una ruta longitudinal (**Figura 2A**). Estas proyecciones son las más tempranas observadas en el rombencéfalo embrionario. Para el HH18 en pollos han alcanzado los niveles más rostrales de la médula espinal (Glover y Petusdottir, 1991).

La mayoría de los axones reticuloespinales marcados retrógradamente en este estadio surgen del aspecto medial del cuerpo celular. Aquellos axones cuyo soma se encuentra en las regiones más laterales del tubo neural proyectan contralateralmente, primero cruzan la línea media y después se incorporan al MLF. Por su parte, aquéllos que nacen de neuronas situadas medialmente proyectan ipsilateralmente, y en su camino hacia la placa del piso se encuentran con el MLF e inmediatamente coalescen en él (**Figura 2A**) (Glover y Petusdottir, 1991).

La mayoría de los axones que proyectan contralateralmente ignoran el MLF ipsilateral y siguen hasta el contralateral, pero una pequeña población de axones desciende por cortas distancias en el MLF ipsilateral y sólo después cruzan la línea media para descender longitudinalmente del lado contrario a su nacimiento (Glover y Petusdottir, 1991).

Las neuronas reticuloespinales están agrupadas en el eje longitudinal A/P en cuatro grupos con pequeñas variaciones observadas en las distintas especies de vertebrados. El grupo más rostral es el niC, el cual se localiza en el mesencéfalo cerca del núcleo oculomotor y proyecta estrictamente en rutas ipsilaterales en el MLF, con los axones surgiendo de las regiones caudales de los cuerpos neuronales (**Figura 2A**) (Glover y Petusdottir, 1991).

El segundo grupo, denominado “ístmico”, se localiza en el puente y proyecta bilateralmente. Los axones que nacen en las regiones mediales de los somas cursan en el MLF, mientras aquéllos que nacen en las regiones caudales de los somas generalmente cursan ipsilateralmente como axones intermediarios entre el MLF y el tracto lateral de las neuronas vestibulares (**Figura 2A**) (Glover y Petusdottir, 1991).

El tercer grupo, denominado “bulbar”, está localizado al nivel del nervio vestibular y proyecta bilateralmente en el MLF (**Figura 2A**). Sus axones surgen de los márgenes mediales de los somas y tiene como característica notable el albergar a las neuronas contralaterales de Mauthner (Glover y Petusdottir, 1991).

Finalmente, el grupo más caudal de neuronas reticuloespinales está situado como una columna medial en la médula oblongada y proyecta bilateralmente hacia la

médula espinal. Este grupo se denomina “vagal” (**Figura 2A**) (Glover y Petusdottir, 1991).

Estudios realizados en embriones de pollo muestran que los grupos más caudales de las neuronas reticuloespinales son los primeros en alcanzar el MLF en el transcurso del tercer día de desarrollo. En los siguientes dos días se adicionan ordenadamente las poblaciones pontinas y finalmente las mesencefálicas. Al mismo tiempo, es posible identificar proyecciones rafé-espinales y vestibuloespinales mediales y laterales (Glover y Petursdottir, 1991; Clarke y Lumsden, 1993; Glover, 1993).

6.2. Neuronas del TMESV

Las neuronas de este tracto inervan mecanorreceptores en los músculos de la mandíbula, y en animales que poseen dientes, en los ligamentos periodontales. Estas neuronas manejan la información propioceptiva de los músculos y ligamentos ayudando a determinar la posición de la mandíbula para coordinar la masticación, el acto de morder y hasta cierto nivel, el habla en humanos (Hiscock y Straznicky, 1986. Referido en Hunter et al., 2001).

Las neuronas del TMESV son las únicas neuronas sensoriales primarias que tienen origen central y llevan la información propioceptiva que determina la posición de la mandíbula (Hunter et al., 2001). Dichas neuronas en embriones de pollo surgen de cuatro grupos celulares: 1) el grupo medial, localizado en la comisura tectal; 2) el grupo lateral distribuido a lo largo de los hemisferios del tectum óptico; 3) el grupo externo al tubo neural; y 4) una población localizada en la comisura postóptica. Dos de estos grupos celulares permanecen en el adulto (el medial y el lateral), mientras los otros dos son transitorios (Sánchez et al., 2002).

Por su parte, en ratón el núcleo del TMESV presenta dos grupos principales ubicados en el mesencéfalo dorsal y un grupo en una región más ventral (Stainier y Gilbert, 1989).

En ambas especies las neuronas del TMESV proyectan ventralmente alejándose de la placa del techo, y viran en un ángulo de 90° C cuando alcanzan el *sulcus limitans*, para posteriormente descender en el LLF (**Figura 2B**).

La mayor parte de los axones del TMESV sale del SNC junto con axones motores del trigémino en r2, mientras algunas colaterales alcanzan el núcleo motor del

trigémico. En la periferia estos axones avanzan junto a los axones motores del trigémico por el arco mandibular hacia los músculos de la masticación (Hunter et al., 2001).

En pollo, estas neuronas se diferencian en HH14, comienzan su proyección ventral en HH15 y en HH16 sus axones pioneros están cruzando el istmo, mientras en ratón los primeros axones aparecen casi inmediatamente después del cierre del tubo neural y en E9.5 se unen para formar el LLF (Easter et al., 1993).

7. El istmo como organizador del crecimiento axonal longitudinal

El istmo es capaz de actuar como organizador del crecimiento, polaridad y diferenciación de las regiones que se encuentran aledañas a él (Lee et al., 1997; Martínez et al., 1999; Reifers et al., 1998). El mecanismo de acción de tal influencia sobre los tejidos vecinos parece estar determinado por señales moleculares que establecen gradientes de información posicional, reflejada en los gradientes de expresión de genes como *engrailed-1* y *2* (*en-1/2*), *wnt-1*, *otx-2*, *gbx-2*, *fgf-8* y algunos miembros de la familia *pax* (*pax-2/5*) (Martínez et al., 1999).

Estos genes codifican para proteínas que actúan como factores de transcripción (*en-1/2*, *otx-2*, *gbx-2*, *pax*) y factores secretados (*wnt-1* y *fgf-8*). Todos tienen patrones de expresión espacio-temporalmente característicos y dependientes entre sí. Los dominios de expresión de la mayoría de estos genes son dinámicos y cambian de acuerdo con las distintas características del medio y los diferentes estadios de desarrollo.

7.1. El istmo como fuente de moléculas que regulan la proyección axonal longitudinal

Aún cuando las señales moleculares que permiten el crecimiento estereotípico de las poblaciones axonales que cursan sobre el MLF y el LLF no han sido completamente descritas, nuestro grupo de trabajo mostró que el istmo es capaz de liberar moléculas difusibles que actúan como quimiorrepelentes de axones reticuloespinales rombencefálicos, dirigiendo su proyección descendente hacia la

médula espinal (Hernández-Montiel et al., 2003). Fue claro un efecto inhibitorio del istmo sobre las poblaciones axonales de proyección caudal, en tanto las poblaciones de proyección rostral no se vieron afectadas por dicha estructura. Más aún, otra serie de experimentos demostró que cuando el rombencéfalo es separado quirúrgicamente del istmo, las proyecciones axonales reticuloespinales se ven severamente reducidas, lo que sugiere que las señales difusibles no permisivas o quimiorrepelentes del istmo son necesarias para la proyección reticuloespinal caudal en el tallo cerebral en desarrollo.

Por su parte, Hunter et al. (2001) han presentado evidencia a favor que las neuronas del TMESV se desarrollan bajo la influencia del factor de crecimiento de fibroblastos (fgf) -8 expresado en el istmo en estadios tempranos. En este trabajo se muestra que fgf-8 es capaz de producir la formación de neuronas del TMESV ectópicas cuando es aplicado como proteína en el mesencéfalo antero-dorsal, mientras su neutralización lleva a una disminución severa en la generación de esta población neuronal.

Asimismo, ha sido ampliamente demostrado que los axones pioneros del TMESV en ratón (Mastick y Easter, 1996) y en pollo (Chedotal et al., 1995; Molle et al., 2004) exhiben conductas erráticas en su trayectoria caudal al cruzar el istmo/r1. Al cruzar estas estructuras, los axones del TMESV parecen “vagabundear” o volverse hacia atrás sugiriendo que su crecimiento puede ser impedido inicialmente cuando se aproximan al límite (Chedotal et al., 1995; Mastick y Easter, 1996; Molle et al., 2004). Los axones que llegan más tarde no muestran esta conducta, lo cual puede ser explicado al menos en parte debido a que los axones de crecimiento tardío fasciculan sobre los axones pioneros.

Más aún, Molle et al. (2004) encontraron que slit-1 y -2 son las moléculas que mantienen a ambos tractos lejos de la línea media y separados el uno del otro. Estos autores encontraron que la expresión de slit-1 está restringida al mesencéfalo ventral y al istmo dorsal, mientras slit-2 está expresada en la placa del techo y en la placa del piso. De manera interesante, el límite de expresión dorsal de slit-1 en el istmo coincide con la ruta de los axones que cruzan este borde. Por su parte, el límite lateral de slit-2 coincide con la trayectoria de los axones del niC en el mesencéfalo ventral (Molle et al., 2004). Estudios *in vitro* e *in vivo* sugieren entonces que slit-1 inhibe el crecimiento de los axones de los fascículos longitudinales lateral y medial sobre la placa del piso en el mesencéfalo ventral y los mantiene separados; mientras la

expresión de slit-2 en la placa del piso es sugerente de que esta molécula limita la invasión del MLF a regiones ventrales y su expresión en las placas del piso y techo repele a los axones del TMESV (Molle et al., 2004).

Tomados en conjunto, estos resultados destacan la importancia de los límites interneurómicos como fuentes de moléculas que modulan la proyección axonal de los axones de proyección longitudinal, aún cuando la naturaleza de dichos factores no ha sido completamente determinada.

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los mecanismos que regulan la proyección longitudinal en el cerebro en desarrollo aún no han sido completamente identificados. Trabajos recientes sugieren la participación de organizadores del crecimiento axonal longitudinal localizados a lo largo del eje A/P del cerebro en formación. Sin embargo, queda por determinar su ubicación y la naturaleza de las señales involucradas.

Particularmente, los axones reticuloespinales y del TMESV establecen el andamiaje básico por el que otras neuronas de crecimiento tardío proyectarán, constituyendo las dos principales rutas descendentes en el tallo cerebral en desarrollo.

Recientemente se ha propuesto la participación del límite interneuromérico istmo en la guía de los axones reticuloespinales (Hernández-Montiel et al., 2003) y del TMESV (Chedotal et al., 1995; Mastick y Easter, 1996; Molle et al., 2004), aún cuando la naturaleza de las señales ha quedado sin determinar.

Las semaforinas clase III son proteínas de secreción identificadas únicamente en vertebrados. Durante la formación de tractos pioneros se ha identificado a un miembro de la familia de las semaforinas clase III (sema-3F) y a su receptor npn-2 como moléculas capaces de restringir la ruta de los axones sobre límites interneuroméricos en el diencéfalo en desarrollo (Funato et al., 2000). Hasta el momento, sin embargo, ningún miembro de esta familia ha sido identificado en la regulación de la proyección axonal de las neuronas reticuloespinales y del TMESV.

El presente trabajo propone evaluar la participación de las semaforinas clase III en la guía de los axones reticuloespinales y del TMESV en función de su amplia participación en la señalización de numerosos eventos durante el desarrollo del SNC, y particularmente en función de su participación como molécula de restricción interneuromérica en el diencéfalo en desarrollo.

IV. HIPÓTESIS

Las semaforinas están involucradas en el control de la proyección longitudinal de los axones reticuloespinales y del TMESV.

V. OBJETIVO GENERAL

Caracterizar el control de la proyección axonal longitudinal en el tallo cerebral en desarrollo usando como modelos las neuronas reticuloespinales y las neuronas del TMESV.

VI. OBJETIVOS PARTICULARES

1. Identificar los patrones de expresión espacio-temporal de las semaforinas de secreción en el cerebro en desarrollo mediante hibridación *in situ* en embriones de pollo y de ratón.
2. Expresar ectópicamente las semaforinas de la clase III en diferentes regiones del rombencéfalo de embriones de pollo a fin de estudiar su posible papel en la proyección longitudinal de los axones reticuloespinales.
3. Expresar ectópicamente las semaforinas de la clase III en diferentes regiones del mesencéfalo en embriones de pollo a fin de estudiar su posible papel en la proyección longitudinal de los axones del TMESV.
4. Expresar npn-2 en regiones del tubo neural con el fin de llevar a cabo estudios de pérdida de función.

VII. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

1. Análisis de los patrones de expresión de semaforinas y sus receptores en el cerebro en desarrollo de ratón y pollo

Con el objeto de determinar la posible acción de las semaforinas en la guía descendente de los axones reticuloespinales y del TMESV, los patrones de expresión del RNAm de sema-3A, -3C, -3F, y de sus receptores npn-1 y -2, fueron estudiados en embriones de ratón y pollo mediante **hibridación *in situ*** (excepto por npn-1 de ratón, cuya expresión fue identificada mediante **inmunotinción** con un anticuerpo específico).

Los estudios fueron realizados en ratón y pollo con el objeto de determinar si existían diferencias en la expresión de las semaforinas entre especies y con el objeto de evaluar la posible participación de estas moléculas en la guía de los axones reticuloespinales y del TMESV haciendo uso de las diferentes estrategias metodológicas facilitadas por cada especie.

Los estadios en los cuales fueron llevados a cabo los procedimientos experimentales fueron elegidos de acuerdo al periodo en el cual los axones en estudio comienzan su proyección para cada especie. En el ratón, las neuronas relevantes para este estudio comienzan su proyección desde E9-9.5 y para E12.5 han proyectado sobre vías longitudinales descendentes (Easter et al., 1993). Por su parte, en pollo, las neuronas comienzan a proyectar en HH14 y para HH20-22 han cruzado el istmo y proyectado hacia sus sitios blanco (Mastick y Easter, 1996; Glover y Petursdottir, 1988).

Inmediatamente después de obtener los embriones de sus madres (ratón) o del huevo (pollo), éstos fueron separados de sus membranas extra-embrionarias y lavados en amortiguador salino de fosfatos (PBS) frío, para posteriormente ser fijados durante dos horas a temperatura ambiente en paraformaldehído (PFA, J.T.Baker) 3.5% frío, o toda la noche a 4°C.

Para llevar a cabo las técnicas de **hibridación *in situ*** e **inmunotinción**, embriones completos de pollo y ratón fueron disecados en PBS. Una vez obtenidos los cerebros, éstos fueron disecados a lo largo de su línea media dorsal y en algunas regiones del cerebro anterior, con el objeto de mejorar la penetración de los anticuerpos y ribosondas al tejido. En algunos casos, sin embargo, los protocolos fueron diseñados para el uso de embriones completos a los cuales únicamente se les abrió la región dorsal desde la cabeza hasta la cola.

Para facilitar el análisis los resultados se muestran en montajes planos. En el caso del mesencéfalo y prosencéfalo, los hemisferios fueron obtenidos disecando las regiones dorsales y ventrales del embrión y éstos montados en portaobjetos con PBS/glicerol 90%. En el caso del rombencéfalo, únicamente la región dorsal del tubo neural fue separada, de tal manera que lo que observamos son montajes tipo libro abierto en los que se preserva la región caudal del mesencéfalo con el objeto de identificar la expresión de las moléculas en el istmo. Los resultados que aquí mostramos son representativos de una muestra que incluyó al menos cinco embriones por condición, procesados en experimentos separados.

2. Estudios de ganancia de función

Una vez identificados los candidatos a mediar la acción quimiorrepelente del istmo para axones reticuloespinales y del TMESV en ratón y pollo, el siguiente paso fue la evaluación de su acción *in vivo*. Para tal efecto, el sistema de **electroporación *in ovo*** resultó una herramienta de mucha utilidad. Esta técnica permite la incorporación de plásmidos que contienen las secuencias codificantes de las moléculas en estudio, a regiones específicas del tubo neural. Para tal fin, los huevos fértiles de gallina fueron incubados a 38 °C bajo humedad relativa (80%-90%), 3.5 horas por estadio hasta alcanzar el estadio HH11-12. Los embriones fueron electroporados entonces con el plásmido que contiene el cDNA que codifica para la proteína verde fluorescente (GFP por sus siglas en inglés) o co-electroporados con el vector de expresión de la semaforina de interés y el vector GFP. Los embriones electroporados fueron incubados nuevamente hasta alcanzar el HH22, estadio en el cual los resultados de la manipulación fueron observados mediante el **marcaje retrógrado** de las poblaciones reticuloespinales, o bien mediante **inmunohistoquímica** contra neurofilamento en caso de los axones del TMESV.

En el pollo, el **marcaje retrógrado** fue realizado en embrión completo mediante una incisión en el rombencéfalo caudal cerca de la línea media ventral, paralela a la cual cursan los axones del MLF. Inmediatamente después de hacer la incisión, pequeños cristales de dextrán-rodamina fueron colocados en la herida para permitir que el colorante fluorescente ascendiera hacia los cuerpos neuronales por transporte retrógrado. El embrión marcado se incubó toda la noche en solución fisiológica con

bombeo constante de aire, y a la mañana siguiente fue fijado en PFA 3.5% durante dos horas a temperatura ambiente.

Tomando ventaja de que la proyección pionera en el mesencéfalo dorsal es del TMESV, se utilizaron métodos de **inmunohistoquímica** contra neurofilamento en embriones electroporados con sema-x+GFP o GFP control en el estadio HH22. Para tal efecto, los embriones fueron separados del cascarón y membranas extra-embriónicas y procesados de acuerdo al protocolo estándar de **inmunohistoquímica**.

Los embriones electroporados fueron analizados bajo microscopio de fluorescencia inmediatamente después de ser fijados en PFA 3.5%, con el objeto de verificar la eficiencia de la transfección (visualizada en el canal verde) y/o la eficacia del marcaje retrógrado (canal rojo). En el caso de las poblaciones reticuloespinales, el criterio de inclusión fue la visualización de expresión de GFP en regiones unilaterales de r2-r4. Por su parte, en el caso de los axones del TMESV, el criterio de inclusión fue la visualización de GFP en el mesencéfalo ventral o dorsal según se indique en la figura.

El análisis de los estudios de ganancia de función en el rombencéfalo fue realizado con microscopía confocal, mientras que el análisis de los resultados de electroporación en el mesencéfalo fue llevado a cabo mediante microscopio de luz visible.

3. Estudios de pérdida de función

Para estudiar la pérdida de función de la señal de sema-3F en el istmo, embriones de pollo en HH11-12 fueron electroporados en el istmo/r1 con el plásmido que contiene el cDNA completo que codifica para npn-2 (Watanabe et al., 2004), el principal receptor de sema-3F. La expresión ectópica del receptor npn-2 en el sitio donde se localiza de manera silvestre el ligando sema-3F ha demostrado ser una estrategia útil para evitar la unión del ligando a su receptor endógeno, por lo que se utiliza como experimento de pérdida de función (Watanabe et al., 2004).

En estos estudios se siguió el protocolo estándar de **electroporación** únicamente modificando la posición de los electrodos a la región límite entre el mesencéfalo y el rombencéfalo. Los embriones que cumplieron con el criterio de inclusión de transfección en el istmo/r1 fueron procesados para **inmunohistoquímica** y analizados bajo microscopio de luz visible.

VIII. MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

Se utilizaron hembras de ratón preñadas de la cepa CD1, las cuales fueron obtenidas del bioterio del Instituto de Neurobiología de la UNAM. Los embriones en el estadio de desarrollo deseado fueron separados de sus madres mediante cesárea e inmediatamente procesados para **hibridación *in situ* e inmunohistoquímica**. El día de muestreo de tapón vaginal fue considerado como día 0.5.

Los embriones de pollo, fueron obtenidos de huevos fértiles ALPES 2 "White Leghorn" (avícola ALPES, S.A., Tehuacán, Puebla) e incubados hasta alcanzar el estadio deseado.

Todos los animales requeridos para el presente trabajo fueron procesados de acuerdo al Código Ético para la Investigación Biomédica vigente en el Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

Protocolos

1. Hibridación *in situ*

a. Preparación de ribosondas

Linearización del plásmido

1. Linearizar el DNA circular que contiene el fragmento del gen que codifica para sema-3A, -3C, -3F, npn-1 y -2 de ambas especies con 10 U de la enzima de restricción específica para cada plásmido por cada 1 µg de DNA (**Tabla 1**).

2. Verificar la eficacia de la linearización mediante la electroforesis de una muestra en gel de agarosa al 1%.

3. Eliminar las proteínas y sales de la reacción de digestión a través de la extracción con fenol-cloroformo de acuerdo al siguiente protocolo:

Extracción fenol-cloroformo

1. Añadir un volumen de fenol (J.T.Baker) igual a la muestra de DNA linearizado.
2. Centrifugar a 12,000 r.p.m durante 3 minutos.
3. Recuperar la fase acuosa de la muestra y añadir un volumen igual de cloroformo (J.T.Baker).
4. Centrifugar a 12,000 r.p.m durante 3 minutos.
5. Recuperar fase acuosa y añadir 1/10 del volumen de la muestra de acetato de sodio (J.T.Baker) 3M pH 5.2. Agitar.
6. Añadir 2 volúmenes de etanol (J.T.Baker) 100% e incubar por 10 min a temperatura ambiente.
7. Centrifugar a 13,000 r.p.m. durante 10 minutos.
8. Lavar con etanol 70% sin resuspender pastilla.
9. Lavar con etanol 100%.
10. Aspirar la totalidad de etanol y dejar secar pastilla hasta desprender.
11. Resuspender en volumen deseado de agua tratada con dietil-pirocarbonato (DEPC, J.T.Baker)).
12. Verificar muestra en gel.

Transcripción *in Vitro*

1. Mezclar:
 - 1µg de DNA linearizado purificado.
 - 2 µl de solución de nucleótidos marcados con digoxigenina 10X (DIG) (Roche)
 - 1µl de inhibidor de RNAsas (Roche).
 - 2µl de la enzima RNA polimerasa (Gibco-BRL) (**Tabla 1**).
 - 10% del volumen de reacción de buffer de transcripción 10X (Roche).
 - El volumen necesario de H₂O-DEPC para completar una reacción de 20µl.
2. Incubar la reacción 2 horas a 37 °C.
3. Añadir 2 µl de DNAsa I (Roche) e incubar 15 min. a 37°C.
4. Purificar la reacción en columnas de sephadex Quick Spin G-50 de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Roche).

5. Verificar en gel de agarosa 1%.

Tabla 1. Descripción de plásmidos utilizados para la preparación de ribosondas

Gen	Especie de hibridación	Vector	Enzima de restricción	Polimerasa antisentido	Donación
Sema-3A	ratón	pBlue SK (amp)	EcoRI	T7	-
Sema-3C	ratón	BK (pBK-CMV kana)	EcoRI	T7	Dr. Andreas Püschel
Sema-3F	ratón	BK (pBK-CMV kana)	EcoRI	T7	Dr. Andreas Püschel
Npn-2	ratón	pBlue SK (amp)	XhoI	T3	-
Sema-3A	pollo	pBlue SK (amp)	Not I	T7	Dr. Jonhatan Raper
Sema-3C	pollo	pBlue SK	EcoRI	T7	Dr. Jonhatan Raper
Sema-3F	pollo	pBlue SK (amp)	EcoRV	SP6	Dra. Sarah Guthrie
Npn-1	pollo		SacII	SP6	Dr. Gera Neufeld
Npn-2	pollo		SPEI	T7	Dr. Gera Neufeld

Dra. Sarah Guthrie, Medical Research Council Centre for Developmental Neurobiology, Kings College London, Guys Campus, London Bridge, London SE1 1UL, United Kingdom

Dr. Gera Neufeld, Cancer and Vascular Biology Research Center, Rappaport Research Institute in the Medical Sciences, The Bruce Rappaport Faculty of Medicine, Technion, Israel Institute of Technology, 1 Efron St., P.O. Box 9679, Haifa 31096, Israel.

Dr. Andreas Puschel, Institut für Allgemeine Zoologie and Genetik, Westfälische Wilhelms Universität, Munster, Germany.

Dr. Jonhatan Raper, Department of Neuroscience, University of Pennsylvania School of Medicine, Philadelphia, Pennsylvania 19104, USA.

b. Hibridación con ribosondas

1. Lavar embriones en PBT (PBS/Tween-20 0.1%, Sigma) dos veces por 10 min. cada vez.

2. Deshidratar en series de metanol (J.T. Baker, X251-07) 25% (en PBT), 50%, 75% y 100%.

3. Rehidratar en serie opuesta hasta que sedimenten.

4. Lavar 2 veces con PBT.
5. Incubar en H₂O₂ al 6 % en PBT durante 1 hr, a temperatura ambiente.
6. Lavar 2 veces con PBT.
7. Incubar con proteinasa K (Invitrogen) [10 µg/ml] durante 20 min a temperatura ambiente.
8. Inactivar la proteinasa K postfijando con glutaraldehído (Sigma) [0.2%] en PFA/PBT durante 20 min. a temperatura ambiente y sin agitación.
9. Lavar 2 veces con PBT.
10. Prehibridar 1 hora a 70 °C en mezcla de hibridación (formamida desionizada (Ambion) [50%], SSC [5X] pH4.5 con ácido cítrico, Heparina (Sigma) [50µl/ml], Tween-20 [0.1%], RNA de transferencia (Sigma)[50µg/ml] y DNA de esperma de salmón (Roche) [50µl/ml]).
11. Hibridar toda la noche a 70 °C con 5 µl de ribosonda por cada ml de mezcla de hibridación.
12. Lavar a 70 °C en solución I (Formamida (J.T. Baker) [50%], SSC [4X] pH4.5, SDS (Gibco) [1%]), 2 veces durante 30 min.
13. Lavar a 70 °C en solución II (NaCl [0.5M], Tris [10mM] pH7.5, Tween-20 [0.1%]).
13. Lavar a 70 °C en solución III (Formamida [50%], SSC [2X] pH 4.5).
14. Lavar dos veces a temperatura ambiente con MABT (MAB, Acido maléico (J.T. Baker) pH 7.5 con NaOH, [0.1M] + NaCl [150mM].+ Tween-20 [0.1%]).
15. Bloquear con suero de cabra al 10% en MABT, durante 1 hora a temperatura ambiente.
16. Incubar toda la noche a 4 °C con el anticuerpo anti-DIG (1:3000).
17. Lavar con MABT 6 veces durante 30 min. cada vez.
18. Lavar con NTMT (NaCl [0.1M], Tris [0.2M] pH9.5, MgCl₂ [0.05M], Tween-20 [0.1%]) 2 veces.
19. Revelar en oscuridad en: 2ml de NTMT, 9µl de NBT (Roche) y 7µl de BCIP (Roche).
20. Lavar con NTMT e inactivar la reacción con PBT.

Doble hibridación *in situ*/inmunohistoquímica

Para realizar las dobles marcas, embriones completos fueron procesados de acuerdo al protocolo de **hibridación *in situ*** y posteriormente de acuerdo al protocolo de **inmunohistoquímica** detallado a continuación. Para evitar el lavado de la señal del RNAm, los embriones fueron postfijados en PFA 3.5% después del primer protocolo y procesados a partir del paso 7. “Bloqueo con PBTxM”.

2. Inmunohistoquímica

1. Lavar embriones en PBTx (PBS/tritón X-100 0.1%).
2. Deshidratar en series de metanol 10%, 30%, 50% y 80% (diluído con agua).
3. Inactivar peroxidases endógenas con 6% de H₂O₂ en metanol 80% toda la noche a 4 °C.
4. Lavar con metanol 80%.
5. Rehidratar en serie invertida de metanol.
6. Lavar con PBTx.
7. Bloquear 3 horas en PBTxM (PBTx/2% de leche descremada en polvo).
8. Incubar en anticuerpo primario preparado en PBTxM 72 horas a 4 °C.

Neuropilina 1: anticuerpo policlonal hecho en conejo (Santa Cruz Biotechnology),

dilución 1-500

Neurofilamento: anticuerpo monoclonal hecho en ratón (Developmental Studies Hybridoma Bank), dilución 1-250

Islet 1/2: anticuerpo monoclonal hecho en ratón (Developmental Studies Hybridoma Bank), dilución 1-500

9. Lavar 6 veces durante 1 hora a temperatura ambiente con PBTxM.
10. Incubar en anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa preparado en PBTxM-NGS (PBTxM/10% de suero inactivado de cabra).
11. Lavar 4 veces en PBTxM-NGS durante 1 hora cada vez.
12. Lavar 2 veces en PBTx durante 1 hora cada vez.

13. Lavar 2 veces en Tris 0.1 M pH 7.3.
14. Preincubar en DAB/Tris durante 30 min.
15. Incubar en DAB/Tris/H₂O₂.
16. Lavar con PBTx.

Inmunofluorescencia

Embriones completos fueron incluidos en tissue tec (Sakura finetek U.S.A.) y congelados en hielo seco, para posteriormente ser cortados en criostato (cortes de 10 μ m), montados en portaobjetos y procesados de acuerdo al siguiente protocolo:

1. Lavar con PBTx (PBS/Tritón 0.05%) 2 veces.
2. Bloquear con PBTx/suero de cabra 5% 30 min.
3. Incubar en anticuerpo primario preparado en PBTx/5% de suero inactivado de cabra 12 horas a 4 °C.

Neuropilina 1: anticuerpo policlonal hecho en conejo (Santa Cruz Biotechnology)

dilución 1-500

Islet 1/2: anticuerpo monoclonal hecho en ratón (Developmental Studies Hybridoma

Bank), dilución 1-500

4. Lavar 2 veces durante 10 min a temperatura ambiente con PBTx.
5. Incubar en anticuerpos secundarios acoplados a fluoresceína (FITC) o Cy3- (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.) diluidos 1:1000 en PBTx/5% de suero, protegidos de la luz durante dos horas a temperatura ambiente
6. Lavar 2 veces en PBTx.
7. Montar con DABCO/Glicerol y analizar bajo microscopía de fluorescencia.

3. Electroporación *in ovo*

1. Extraer 6 ml de albúmina del huevo y abrir una ventana en el cascarón con tijeras curvadas para exponer al embrión.

2. Añadir 2-3 gotas de penicilina-streptomina (Life Technologies, Rockville, MD) en solución fisiológica Howards Ringer (NaCl 123mM, CaCl₂ 1.5 mM y KCl 4.9 mM) (dilución 1:100) sobre el embrión recién expuesto.
3. Inyectar tinta china Pelikan 518 (10% en solución Ringer-penicilina/estreptomina) por debajo del embrión.
4. Inyectar vectores de expresión deseados [0.5 µg/µl preparados en agua dd/0.1% de fast green] en el lumen del tubo neural.
5. Colocar electrodos de platino flanqueando al embrión a nivel de la región anteromedial del rombencéfalo y aplicar corriente eléctrica (cuatro pulsos de 7.5 volts a 25 msec cada uno, empleando un generador de pulsos creado en el laboratorio).
6. Cerrar la ventana hecha en el embrión con cinta scotch transparente.
7. Incubar a 38 °C hasta alcanzar el estadio HH22 (**Figuras 11A y 11B**).

4. Marcaje axonal retrógrado

1. Colocar embriones en solución fisiológica exponiendo el neuroepitelio ventral a nivel del rombencéfalo.
2. Hacer incisión cerca de la línea media ventral a ambos lados de la placa del piso y colocar un cristal de dextrán-amina conjugado con rodamina (PM 10,000 Molecular Probes, Oregon, USA), con la punta de un alambre de tungsteno de 0.05 mm de diámetro sostenido en una pipeta pasteur.
3. Incubar toda la noche a temperatura ambiente con aporte constante de oxígeno (**Figura 11C**).

IX. RESULTADOS

1. Análisis de la expresión de las semaforinas de secreción y sus receptores en el prosencéfalo y mesencéfalo en desarrollo de embriones de ratón y pollo

1.1. Las semaforinas clase III y sus receptores son expresados en neurómeras y límites interneurómicos en el prosencéfalo y mesencéfalo de embriones de ratón

1.1.1. Semaforina 3A

En el ratón, sema-3A es detectada en el prosencéfalo secundario en E10.5, ventral y caudal al tallo óptico, así como en la vesícula cerebral (**Figura 4A**). En esta última estructura, el RNAm de sema-3A tiene una amplia distribución, pero se expresa más acentuadamente en una línea D/V localizada en la parte intermedia de la vesícula a lo largo de su eje A/P. Dicha línea corresponde a la *zona limitans telencefálica*, la cual es un límite que separa los dominios corticales de los subcorticales (Shimamura et al., 1997).

En E11.5, la expresión de sema-3A se extiende a lo largo de la vesícula cerebral (**Figura 4B**). En este estadio, el dominio de expresión localizado caudal al tallo óptico se mantiene a un menor nivel y se extiende haciendo contacto con la región ventral del dominio de expresión de la vesícula cerebral, la cual ahora ocupa la mayor parte de la vesícula, cerca del territorio de la eminencia media. Además, sema-3A se observa en una línea paralela al eje A/P en la región mamilar. En el diencefalo, la expresión de sema-3A comienza en el tálamo dorsal donde muestra un gradiente decreciente de expresión ventro-dorsal que disminuye en el epitálamo, mientras en el límite mesencéfalo/diencefalo la señal parece estar localizada en la comisura posterior (**Figura 4B**).

Un día más tarde, en E12.5, la expresión de sema-3A está presente en casi toda la vesícula cerebral, ausente únicamente en algunas regiones ventrales. Además, se detecta una región de intensa expresión alrededor del tallo óptico, y este dominio se continúa con el dominio de expresión de la vesícula cerebral. Además, existe expresión en la región mamilar y en la comisura posterior (**Figura 4C**).

1.1.2. Semaforina 3C

La expresión de sema-3C en el prosencéfalo y mesencéfalo de ratón comienza un día después de la expresión de sema-3A, en E11.5. En este estadio, el RNAm de sema-3C es detectado en la zona limitans telencefálica, donde coincide con la expresión de sema-3A, aunque a un menor nivel (**Figura 4E**). También hay expresión de sema-3C en la eminencia media y ligeramente en la región mamilar. En el diencefalo, está en el límite rostral del pretectum, así como en el mesencéfalo en una línea horizontal delgada localizada en el *sulcus limitans* y en una región ventral que coincide con la localización del núcleo oculomotor.

En E12.5, sema-3C se expresa fuertemente en la vesícula cerebral ventromedial, así como en la región mamilar. En este estadio la expresión descrita de sema-3C en el mesencéfalo y pretectum se mantiene (**Figura 4F**).

1.1.3. Semaforina 3F

La expresión de sema-3F en el cerebro en desarrollo precede la expresión de cualquiera de las moléculas analizadas en el presente trabajo. En E9.5, el RNAm de sema-3F es identificado en el mesencéfalo caudal y en r1, pero notablemente ausente del istmo, como ha sido reportado previamente (Giger et al., 2000; **Figura 4D**). De manera interesante, en el mesencéfalo sema-3F muestra un gradiente de expresión decreciente en dirección rostral, mientras en r1 el gradiente se observa en la dirección opuesta.

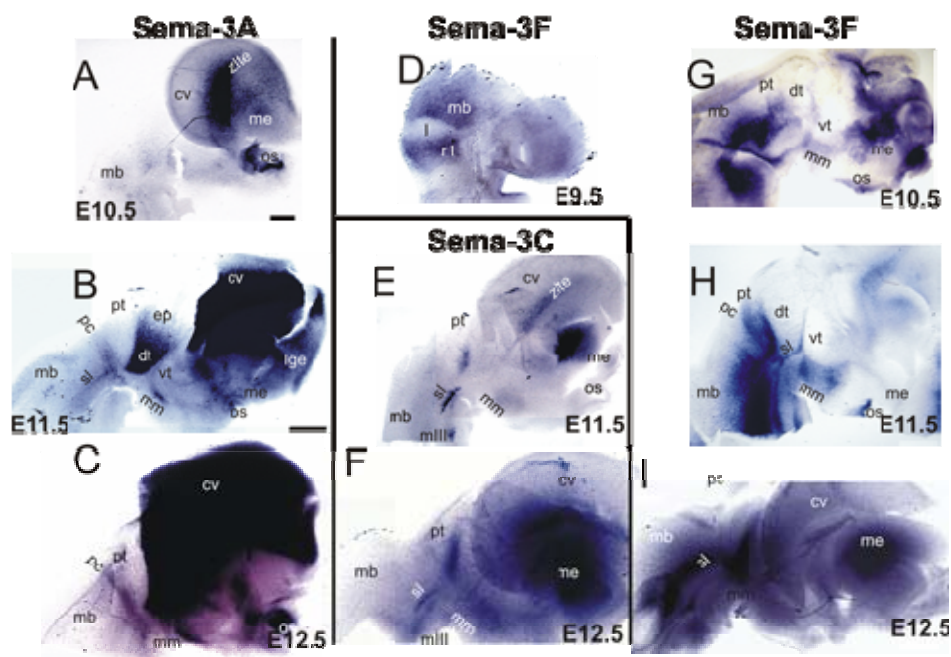


Figura 4. Las semaforinas clase III son expresadas en neurómeras y límites interneuroméricos en el prosencéfalo y mesencéfalo en desarrollo de ratón. La expresión del RNAm de sema-3A (A–C), -3C (E y F), y -3F (D, G–I) se muestra en hemisferios de embriones de ratón. Los estadios se muestran a la izquierda de cada panel, y la ribosonda utilizada es indicada arriba de cada columna. Barra de escala= 100 μ m (A, D, y G), 200 μ m las restantes. Cv, vesícula cerebral; dt, tálamo dorsal; I, istmo; me, eminencia media; mb, midbrain; mm, región mamilar; os, tallo óptico; pc, comisura posterior; pt, pretectum; sl, sulcus limitans, vt, tálamo ventral; zlte, zona limitans telencefálica.

En E10.5 sema-3F se expresa débilmente en el tallo óptico y en la vesícula cerebral, donde mantiene un patrón difuso (**Figura 4G**). Además, hay expresión de sema-3F en el área retromamilar y en la región mamilar a lo largo del *sulcus limitans*, así como en el límite entre el tálamo dorsal y el tálamo ventral (*zona limitans intratalámica*). También se observa en el límite rostral del pretectum y en el mesencéfalo, como ha sido descrito por Funato et al. (2000) en embriones de rata.

Un día más tarde, en E11.5, la expresión de sema-3F adquiere un patrón muy complejo (**Figura 4H**). En el prosencéfalo, este transcrito es detectado en el margen caudal del tallo óptico, en la región mamilar y en un dominio de expresión ventral que coincide con la expresión de Shh (Shimamura et al., 1995), incluyendo una delgada línea que sigue la parte ventral de la *zona limitans intratalámica*. Hay un fuerte nivel de expresión en el límite mesencéfalo/diencéfalo en la comisura posterior (**Figura**

4H). En el mesencéfalo, una línea horizontal de expresión sigue el curso del *sulcus limitans*, y en un dominio adicional rostral a éste, con un gradiente dorsal decreciente (**Figura 4H**).

Un día más tarde, en E12.5, sema-3F mantiene su patrón general de expresión en el mesencéfalo, en el pretectum y en la región mamilar, con fuertes dominios de expresión en la eminencia media y en la región caudal de la vesícula cerebral (**Figura 4I**). En el límite mesencéfalo/diencéfalo, la expresión de sema-3F delinea la comisura posterior.

1.1.4. Neuropilina 1

En los tres estadios analizados en el presente trabajo (E9.5–E11.5), npn-1 se detecta débilmente en el mesencéfalo y prosencéfalo. En E9.5 se observa npn-1 únicamente en vasos sanguíneos localizados en un nivel superficial, mientras en E10.5 npn-1 se observa en la región ventral de la vesícula cerebral (resultados no mostrados). En E11.5, sin embargo, la expresión de npn-1 se incrementa en la región caudal del tallo óptico y presumiblemente en la eminencia media (**Figura 5A**).

1.1.5. Neuropilina 2

En contraste a la expresión de npn-1 en estadios tempranos, se detecta la expresión de npn-2 desde E9.5. Esta molécula comienza su expresión en la región ventral del mesencéfalo y en un dominio rostral al tallo óptico, el cual tal vez corresponde al núcleo origen del tracto de la comisura postóptica (**Figura 5B**).

En E10.5, el RNAm para npn-2 se observa en la eminencia media y en una línea que divide a la vesícula cerebral y que recuerda el patrón de expresión de sema-3A y sema-3C en la zona *limitans telencefálica* (**Figura 5C**). Adicionalmente, hay un fuerte dominio de expresión en el extremo ventro-caudal de la vesícula.

Un día más tarde, el RNAm de npn-2 se observa en varias regiones de la vesícula cerebral, entre las que se encuentran nuevamente la *zona limitans telencefálica*, la eminencia media y ciertos dominios corticales (**Figura 5D**). En el prosencéfalo, el dominio de expresión de npn-2 se extiende desde el límite ventral del área

retroquiasmática hasta el tallo óptico, donde se une con la expresión de la vesícula cerebral y con la de la eminencia media. Además, en este estadio es posible detectar una señal muy fuerte en el territorio de la región mamilar.

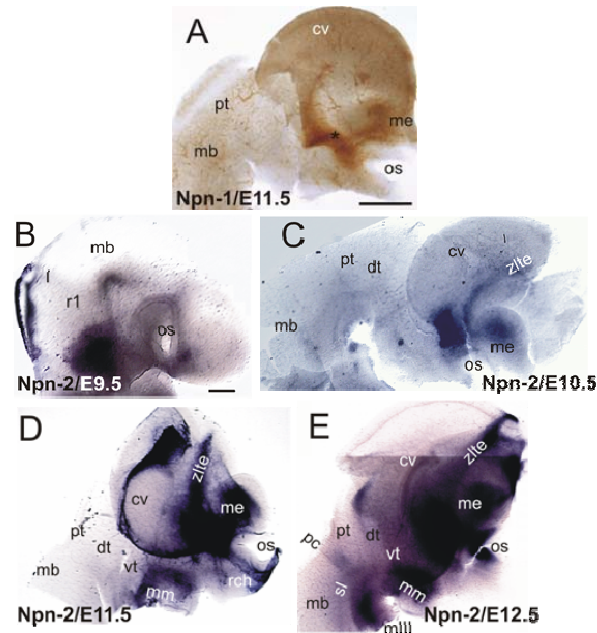


Figura. 5. Expresión de los receptores de semaforinas en el prosencéfalo y mesencéfalo de embriones de ratón. Inmunoreactividad para npn-1 en E11.5 (A). El RNAm de npn-2 se detecta desde E9.5 (B) en el mesencéfalo mediante hibridación *in situ*. Su expresión se incrementa en estadios posteriores extendiéndose por toda la vesícula cerebral (C–E). En E11.5, este transcrito se identifica en la región mamilar, y un día más tarde, su expresión se observa en pc, sl, y en nIII. El panel B muestra una vista lateral de la cabeza de un embrión completo en E9.5, mientras todas las demás fotografías muestran vistas laterales de hemicerebros de ratón montados en plano. Barra de la escala= 100 μ m (B y C), 200 μ m las demás. Cv, vesícula cerebral; dt, tálamo dorsal; I, istmo; me, eminencia media; mb, mesencéfalo; mm, región mamilar; os, tallo óptico; pc, comisura posterior; pt, pretectum; sl, sulcus limitans, vt, tálamo ventral; zlte, zona limitans telencefálica.

En E12.5, la expresión de npn-2 se extiende en la región ventral de la vesícula cerebral y alrededor del tallo óptico. En el diencéfalo npn-2 está presente en la región mamilar y en el mesencéfalo en una región que contiene el niC, el núcleo oculomotor y la sustancia nigra en desarrollo (**Figura 5E**). Además, en este estadio, el RNAm de npn-2 está presente en el límite mesencéfalo/diencéfalo, donde el patrón de expresión sugiere su presencia en los axones de la comisura posterior, como previamente fue observado en cerebros de rata en E14 (Funato et al., 2000).

A manera de resumen, la **Figura 14** muestra un esquema de la expresión de las semaforinas y sus receptores en el prosencéfalo de embriones de ratón en los estadios antes descritos.

1.2. Las semaforinas clase III y sus receptores son expresados en límites interneurómicos en el prosencéfalo y mesencéfalo de embriones de pollo

1.2.1. Semaforina 3A

En los estadios analizados en el presente trabajo, los patrones de expresión de semaforinas y neuropilinas en el prosencéfalo y mesencéfalo de embriones de pollo se encuentran más restringidos que en ratones en estadios equivalentes. En HH14, el RNAm de sema-3A se observa a lo largo del aspecto ventral del cerebro en desarrollo, desde el área retroquiasmática hasta el mesencéfalo (**Figura 6A**). En el diencéfalo existe señal de sema-3A presumiblemente en la glándula pineal, como ha sido descrito previamente por Shepherd et al. (1996). En HH16 hay una débil expresión en el mesencéfalo ventral y en la región ventro-caudal de las vesículas telencefálicas (**Figura 6B**). En HH18, sema-3A comienza a observarse en la parte ventral del istmo y en una región en el mesencéfalo que incluye el núcleo y el nervio oculomotor (**Figura 6C**). Un estadio más tarde (HH19), este último dominio parece más restringido al núcleo oculomotor y no hay expresión obvia en el resto del mesencéfalo y prosencéfalo (**Figura 6D**). Finalmente, en HH22, la expresión de sema-3A incrementa y se detecta en una región más amplia de la vesícula cerebral (**Figura 6E**). En el diencéfalo, el RNAm de sema-3A está presente débilmente en *zona limitans intratalámica* y en el límite entre el pretectum y el mesencéfalo, así como en la placa basal del prosencéfalo que incluye las regiones mamilares y retromamilares.

1.2.2. Semaforina 3C

En embriones de pollo, como en embriones de ratón, la expresión del RNAm de sema-3C en el mesencéfalo y prosencéfalo comienza más tarde que la expresión de sema-3A y sema-3F. La señal de sema-3C se observa en zonas restringidas del

mesencéfalo ventral, presumiblemente en el territorio del núcleo oculomotor, desde HH16 hasta HH19 (**Figuras 6F-6H**). Además, en HH18 se detecta una expresión de bajo nivel a través del prosencéfalo y mesencéfalo ventral (**Figura 6G**). Dos estadios más tarde, se observa una fuerte señal de sema-3C en la vesícula cerebral ventro-caudal y en el tallo óptico, mientras hay una señal débil desde la región mamilar hasta el mesencéfalo (**Figura 6I**).

1.2.3. Semaforina 3F

En embriones de pollo, se observa la expresión de sema-3F en HH14 en el límite antero-ventral del tallo óptico y en la región anterior al infundibulum (**Figura 6J**). Además, hay señal de sema-3F en la glándula pineal, y en el istmo, donde presenta una expresión intensa y difusa que incluye al mesencéfalo ventral (Watanabe et al., 2004). Algunas horas más tarde, en HH16, la expresión de sema-3F se mantiene en el borde anterior del tallo óptico y en un patrón más definido en el istmo y en el mesencéfalo ventral (**Figura 6K**). Más tarde (HH18), la expresión de sema-3F en el istmo decreciente, mientras se observa un bajo nivel de expresión en el prosencéfalo ventral (**Figura 6L**). En HH20 y HH22, la expresión en el istmo y en el mesencéfalo ventral se mantiene (**Figuras 6M y 6N**). En el diencefalo, una delgada línea de expresión dorsal se extiende hacia la *zona limitans intratalámica*, así como una débil franja de expresión que separa las placas alar y basal. Ambos bordes son más obvios en HH22 (**Figura 6N**), además que se observa en HH20 y HH22 la expresión que rodea el tallo óptico (**Figuras 6M y 6N**).

1.2.4. Neuropilina 1

El RNAm de npn-1 se observa en HH20 en el prosencéfalo y mesencéfalo basal (datos no mostrados). Dos días más tarde, en HH22, npn-1 se expresa ventral y dorsal al tallo óptico y en un dominio localizado en el límite entre las placas alar y basal en el extremo rostral del mesencéfalo. En el diencefalo, npn-1 está presente en la *zona limitans intratalámica* y en la región mamilar (**Figuras 7A y 7B**).

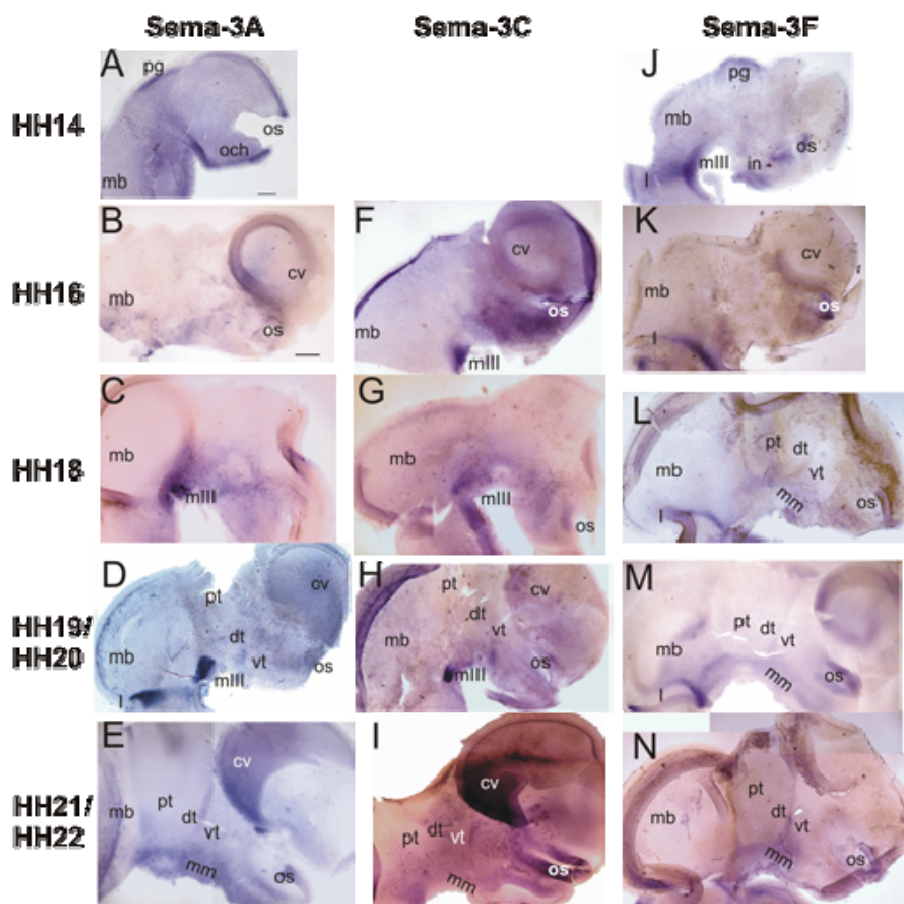


Figura 6. Durante los estadios tempranos del desarrollo de pollo, los patrones de expresión de las semaforinas se encuentran más restringidos que en ratón en estadios comparables. Se muestra la expresión del RNAm de sema-3A (A-E), -3C (F-I), y -3F (J-N) es mostrada en hemisferios de embriones de pollo en los estadios indicados a la izquierda de la figura. La barra de escala de 100 μm aplica para (A, F, y G), mientras en los paneles restantes equivale a 200 μm . Cv, vesícula cerebral; dt, tálamo dorsal; in, infundibulum; I, istmo; mb, mesencéfalo; mm, región mamilar; och, área retroquiasmática; os, tallo óptico; pg, glándula pineal; pt, pretectum; vt, tálamo ventral.

1.2.5. Neuropilina 2

Por su parte, la expresión de npn-2 se observa desde HH14 en el núcleo oculomotor, donde se mantiene hasta HH22 (**Figuras 7C-7H**). En HH16 y HH18, el RNAm de npn-2 se expresa en la cara dorsal del istmo (**Figuras 7D y 7E**). Además, en HH16, hay mensajero de npn-2 en la glándula pineal (**Figura 7D**). En HH22, la intensidad de este transcrito incrementa dramáticamente en el límite caudo-rostral de

la vesícula cerebral, y en la región mamilar, aunque también se puede observar en un dominio ventral del mesencéfalo (**Figuras 7G y 7H**).

La **Figura 15** muestra un esquema de la expresión de las semaforinas y sus receptores en el prosencéfalo de embriones de pollo en los estadios antes descritos.

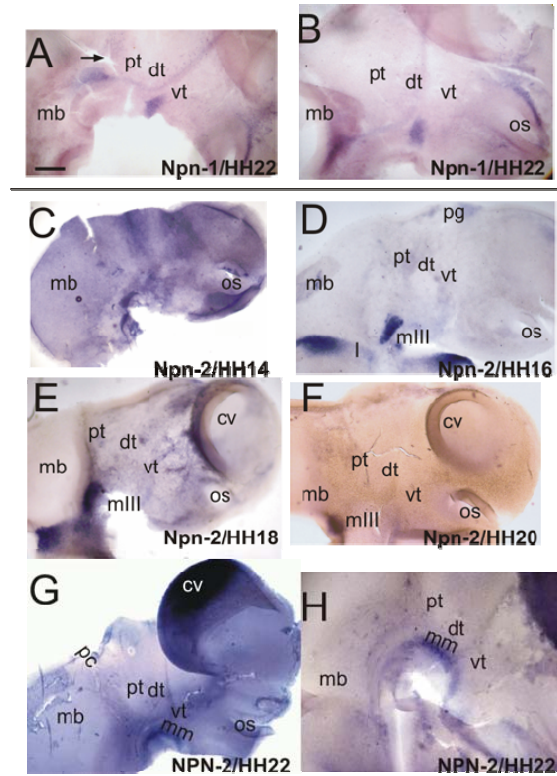


Figura 7. Expresión de las neuropilinas en el cerebro anterior y mesencéfalo de embriones de pollo. El RNAm de npn-1 (A y B) y npn-2 (C–H) se observa en vistas laterales de hemisferios de pollo montados en plano en los estadios escritos en cada panel. La barra de escala de 200 μm aplica en todas las fotografías, excepto en el panel H, en el cual la barra representa 300 μm . Cv, vesícula cerebral; dt, tálamo dorsal; I, istmo; mb, mesencéfalo; mm, región mamilar; os, tallo óptico; pc, comisura posterior; pg, glándula pineal; pt, preectum; sl, sulcus limitans, vt, tálamo ventral.

2. Análisis de la expresión de las semaforinas de secreción y sus receptores en el rombencéfalo en desarrollo de embriones de ratón y pollo

2.1. Las semaforinas y sus receptores son expresados en núcleos motores específicos en el rombencéfalo en desarrollo de ratón

Aún cuando el crecimiento axonal sobre vías circunferenciales se encuentra fuera del alcance del presente trabajo, al analizar el patrón de expresión de las semaforinas en el rombencéfalo de ratón y pollo con el objeto de sugerir su posible función en la guía de las poblaciones axonales en estudio, se identificaron interesantes patrones de expresión en núcleos motores específicos.

Durante el desarrollo del rombencéfalo, las neuronas motoras craneales se diferencian en distintos niveles axiales y ocupan una rombómera o un par de rombómeras. En embriones de ratón, las neuronas motoras comienzan la diferenciación en E9.5, en una columna ventral localizada en el rombencéfalo. Poco después, los axones comienzan a proyectar hacia sus puntos de salida en camino hacia sus blancos periféricos, mientras que los núcleos se agregan (Simon y Guthrie, 1994).

2.1.1. Semaforina 3A

El RNAm de sema-3A fue detectado por primera vez en E10 en r2, en un patrón que refleja la translocación de las neuronas motoras trigeminales y sus fibras axonales, y a lo largo de dos columnas ventrales a través del rombencéfalo reflejando las regiones origen de las motoneuronas (**Figuras 8A y 8C**). Un día más tarde (E11.5), la expresión de sema-3A parcialmente refleja la expresión del marcador de las neuronas motoras islet (isl) -1/2 en los núcleos troclear, trigeminal e hipogloso (**Figuras 8B y 8D**). La señal de sema-3A estuvo también presente en un dominio ventral que va desde el límite caudal de r1 hasta r3 y que no parece corresponder a neuronas motoras, así como en columnas más laterales que se extienden desde la región caudal del rombencéfalo hasta la médula espinal cervical, ubicación que podría incluir a las motoneuronas glosofaríngeas, vagales y accesorias. Notablemente, el RNAm de sema-3A está disminuído o incluso ausente del núcleo oculomotor (**Figura 8D**). Este patrón general se mantuvo en E12.5 excepto por un territorio más extendido y difuso de la columna lateral desde r7 (**Figura 8E**). Por tanto, el RNAm de sema-3A

se expresa en los núcleos branquiomotor y visceromotor, así como en los núcleos troclear e hipogloso. La posible expresión en el hipogloso está enmascarada por la rodilla del núcleo facial.

2.1.2. Semaforina 3C

El RNAm de la sema-3C se detecta hasta E11.5 en el genu del núcleo facial (componente branquiomotor) y débilmente en los núcleos glosofaríngeo e hipogloso (**Figura 8G**). Al igual que con sema-3A, la expresión de sema-3C en el núcleo abducens no pudo ser descartada en la presente preparación. Un dominio de expresión laterodorsal adicional que no corresponde a la localización de las neuronas motoras fue identificado en r1. Un día más tarde, en E12.5, la expresión de este transcrito se observó en los núcleos oculomotor, troclear, facial (rodilla) e hipogloso (**Figura 8H**).

2.1.3. Semaforina 3F

De todas las moléculas analizadas en el presente trabajo, únicamente sema-3F se identificó en el rombencéfalo de ratón desde E9.5. La señal de esta molécula se identificó en la mitad rostral de r5 así como en el borde dorsal del rombencéfalo caudal (**Figura 8F**). Un estadio más tarde, se observó un fuerte dominio de expresión en r1, mientras la expresión en r5 se mantuvo y la expresión en el rombencéfalo caudal desapareció (**Figura 8I**). En E11.5, se observó un complejo patrón de expresión de sema-3F en el rombencéfalo (**Figura 8J**). En este estadio, el RNAm de sema-3F se detectó en dos dominios adicionales laterales en r1, así como en dominios longitudinales desde r5 hasta la médula espinal. Curiosamente, se detectó en r2-r4 únicamente una débil expresión que contrasta notablemente con la expresión en regiones anteriores y caudales a dichas rombómeras. En cualquier caso, no se detectó ninguna expresión obvia en núcleos motores. Este patrón general fue mantenido en E12.5 (**Figura 8K**).

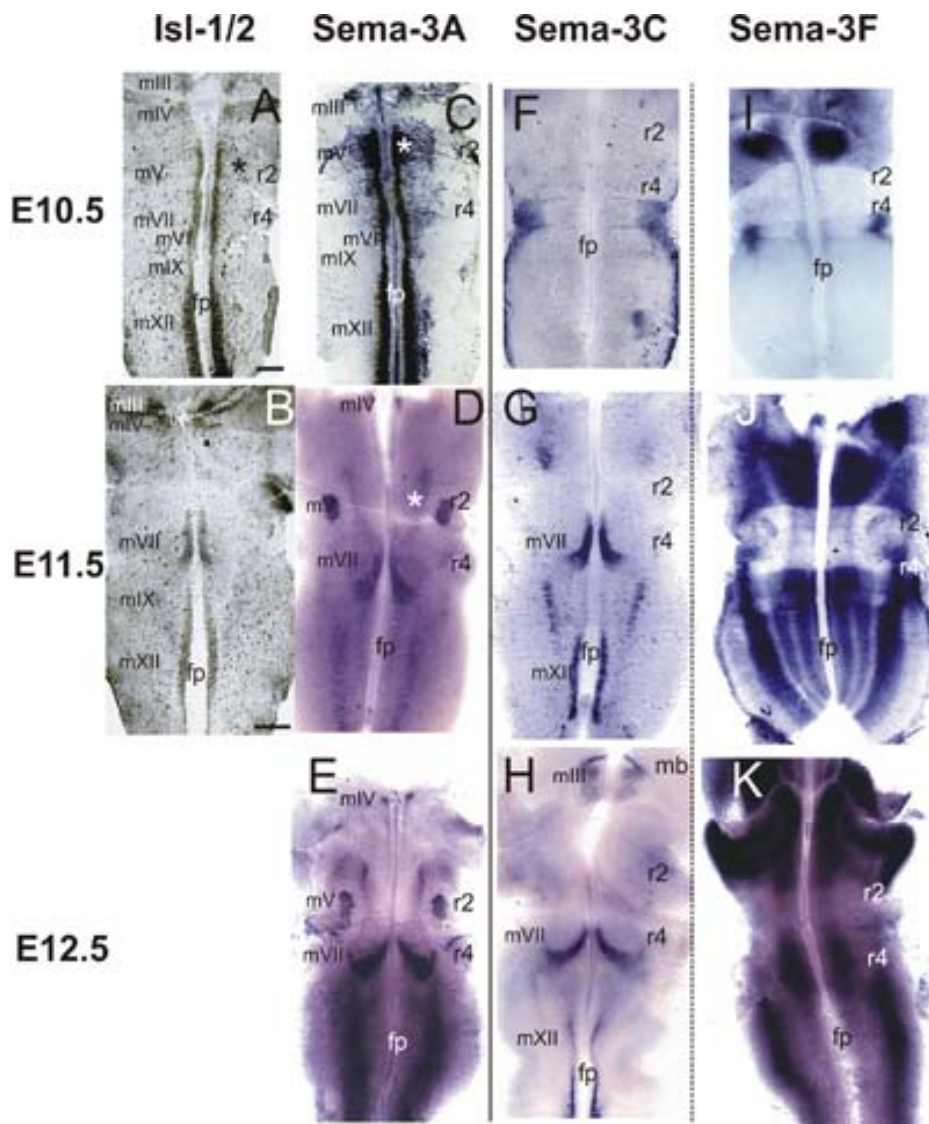


Figura 8. Las semaforinas clase III se expresan en neuronas motoras craneales. Se muestra la expresión de las semaforinas en el rombencéfalo de embriones de ratón en montajes planos, “libro abierto”. Las fotografías de la columna izquierda muestran la localización de las neuronas motoras reveladas a través de inmunotinción con el anticuerpo anti-isl 1/2 en los estadios señalados (A, E10.5; B, E11.5). Los RNAm de sema-3A (C–E), sema-3C (G y H) están en poblaciones motoras específicas y en sus fibras siguiendo la expresión del marcador isl-1/2, mientras que la señal de sema-3F (F, I–K) se detecta en regiones que no parecen coincidir con la localización de neuronas motoras en el rombencéfalo. Las fotografías B y D muestran hibridación *in situ*/inmunohistoquímica para sema-3A (púrpura)/isl-1/2 (café). Fp, placa del piso; mb, mesencéfalo; mIII, núcleo oculomotor, mIV, núcleo troclear; mV núcleo del trigémino; mVI núcleo abducens; mVII, núcleo facial; mIX, núcleo glossofaríngeo, mXII, núcleo hipogloso; r, rombómera.

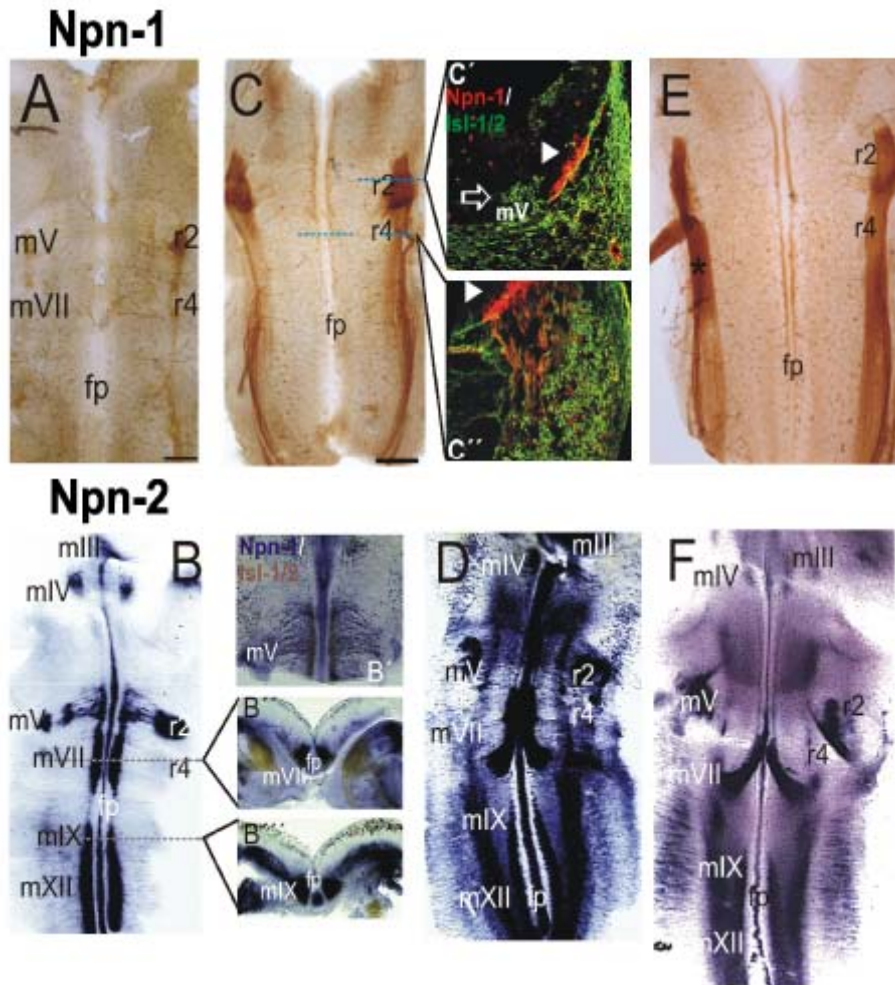


Figura 9. Las neuropilinas se expresan en núcleos motores específicos de neuronas craneales en el rombencéfalo en desarrollo de embriones de ratón. La expresión de las neuropilinas se muestra en montajes tipo “libro abierto”. Neuropilina 1 se observa mediante inmunotinción en algunos núcleos motores y en axones sensoriales en E10.5 (A). Un día más tarde, la expresión en neuronas motoras es regulada a la baja (C), hecho que se corrobora a través de doble inmunofluorescencia dirigida contra npn-1 (rojo)/isl-1/2 (verde) en criosecciones. Las cabezas de flecha en los paneles C' y C'' indican axones sensoriales, mientras la flecha muestra la localización de las neuronas motoras. En E se muestra la expresión en E12.5. Los paneles B-F, por su parte, muestran la expresión del RNAm de npn-2. En las fotos B'-B'' se observa hibridación *in situ*/inmunohistoquímica (npn-2, púrpura)/isl-1/2 (café) en embriones E10.5. El panel B muestra el núcleo trigeminal en el rombencéfalo montado plano, mientras los paneles B' y B'' muestran secciones transversales de vibratomo en los niveles del rombencéfalo indicados. D muestra la expresión de npn-2 en E11.5 y F en E12.5. Fp, placa del piso; mIII, núcleo oculomotor, mIV, núcleo troclear; mV núcleo del trigémino; mVI núcleo abducens; mVII, núcleo facial; mIX, núcleo glossofaríngeo, mXII, núcleo hipogloso; r, rombómera.

2.1.4. Neuropilina 1

La expresión de este receptor fue examinada en el rombencéfalo de ratón mediante inmunohistoquímica. En E10.5, se detectó *nnp-1* en axones trigeminales y faciales en r2 y r4, respectivamente (**Figura 9A**). Adicionalmente, se observó *nnp-1* en axones sensoriales que entran en el rombencéfalo a través de los puntos de salida de las neuronas motoras. Un día más tarde (E11.5), la expresión de *nnp-1* fue regulada a la baja en las motoneuronas, hecho que fue corroborado en criosecciones doblemente inmunotefñidas con el anticuerpo contra *isl-1/2* y contra *nnp-1* (**Figura 9C y páneles asociados**). En este estadio y un día más tarde, se observó *nnp-1* únicamente en dos columnas ventrales adyacentes a la placa del piso que no parecen corresponder con la localización de las neuronas motoras, así como en axones sensoriales (**Figuras 9C y 9E**).

2.1.5. Neuropilina 2

El RNAm de *nnp-2* se detectó desde E10.5 en regiones que se sobrelapan con todos los núcleos motores en desarrollo, así como en dominios adicionales que incluyen r1 y una línea longitudinal delgada a lo largo de la placa del piso (**Figura 9B**). Aunque la expresión no fue analizada a nivel de una sola célula, la hibridación *in situ*/ inmunohistoquímica reveló traslapes en las regiones que contienen neuronas motoras trigeminales en proceso de translocar sus somas dorsalmente en r2, así como en regiones que contienen al menos los núcleos oculomotor, troclear, facial, abducens e hipogloso (**Figura 9B y páneles asociados**). El mismo arreglo se mantiene en E11.5 y E12.5, aunque se observan dominios adicionales de expresión en regiones laterales desde r1 caudal hasta la médula espinal, así como en un territorio de fuerte expresión localizado en r1 caudal y r2 rostral a ambos lados de la placa del piso (**Figuras 9Dy 9F**).

La **Figura 14** muestra un esquema de la expresión de las semaforinas y sus receptores en el rombencéfalo de embriones de ratón en los estadios descritos.

2.2. Las semaforinas secretadas y sus receptores no presentan dominios de expresión restringidos a grupos neuronales específicos en el rombencéfalo en desarrollo de embriones de pollo en estadios análogos a aquéllos estudiados en ratón

2.2.1. Semaforina 3A

En pollo, las motoneuronas comienzan la diferenciación desde HH14 (Guthrie y Lumsden, 1992). En contraste con los patrones de expresión observados en ratón en estadios similares, en el rombencéfalo de pollo las semaforinas y sus receptores no coinciden estrechamente con núcleos motores. En HH14, cuando la diferenciación de las motoneuronas comienza, el RNAm de sema-3A se observa en la mayoría de r5 (**Figura 10A**). En estadios posteriores la expresión de este transcrito ocurre en las regiones que contienen los núcleos oculomotor y troclear, así como en un dominio dorsal en el istmo y en la región ventral del rombencéfalo (**Figura 10C**). En HH21, sema-3A se observa en dos columnas ventrales desde r2 hasta r4 que parecen coincidir con el sitio de origen de las motoneuronas en esta región (**Figura 10C**).

2.2.3. Semaforina 3C

El RNAm de sema-3C fue detectado en dos columnas longitudinales ventrales en HH18 (resultados no mostrados), las cuales se volvieron más evidentes en HH22 (**Figura 10D**). En este último estadio las columnas de expresión de sema-3C comenzaron en r3 y continuaron hasta la médula espinal.

2.2.3. Semaforina 3F

Por su parte, sema-3F se observó en todos los estadios de pollo analizados en el presente trabajo (HH14-HH22). EN HH14, el RNAm de sema-3F se observa en el istmo, en el núcleo troclear, así como en r3 y r5, donde los niveles de expresión más intensos fueron identificados en la región ventral. Se detectó también expresión en el borde dorsal del rombencéfalo (**Figura 10E**). Dos estadios más tarde, la expresión de sema-3F se mantuvo en todas las regiones previamente descritas excepto en las

regiones ventrales de r3 y r5 (**Figura 10F**). Un patrón de expresión similar se observó hasta HH22, estadio en el cual la expresión en el istmo se volvió más débil (**Figuras 10G, 10H** y resultados no mostrados).

2.2.4. Neuropilina 1

No se detectó el transcrito de *npr-1* en el rombencéfalo en ninguno de los estadios analizados en el presente trabajo.

2.2.5. Neuropilina 2

La expresión del RNAm de *npr-2* fue observada en el istmo y en las regiones ventrales de r4 en HH14 (**Figura 10I**). Dos estadios más tarde, fue también evidente en el istmo y en dos dominios longitudinales laterales adyacentes a la placa del piso en r3 y r4 (**Figura 10J**). En HH18, la marca en el istmo fue muy intensa (**Figura 10E**) pero disminuyó un estadio más tarde (resultados no mostrados). En HH22 se observaron dos columnas ventrales que avanzaron desde r2, así como unas más laterales desde r7 (**Figura 10K**).

La **Figura 15** muestra un esquema de la expresión de las semaforinas y sus receptores en el rombencéfalo de embriones de pollo en los estadios previamente descritos.

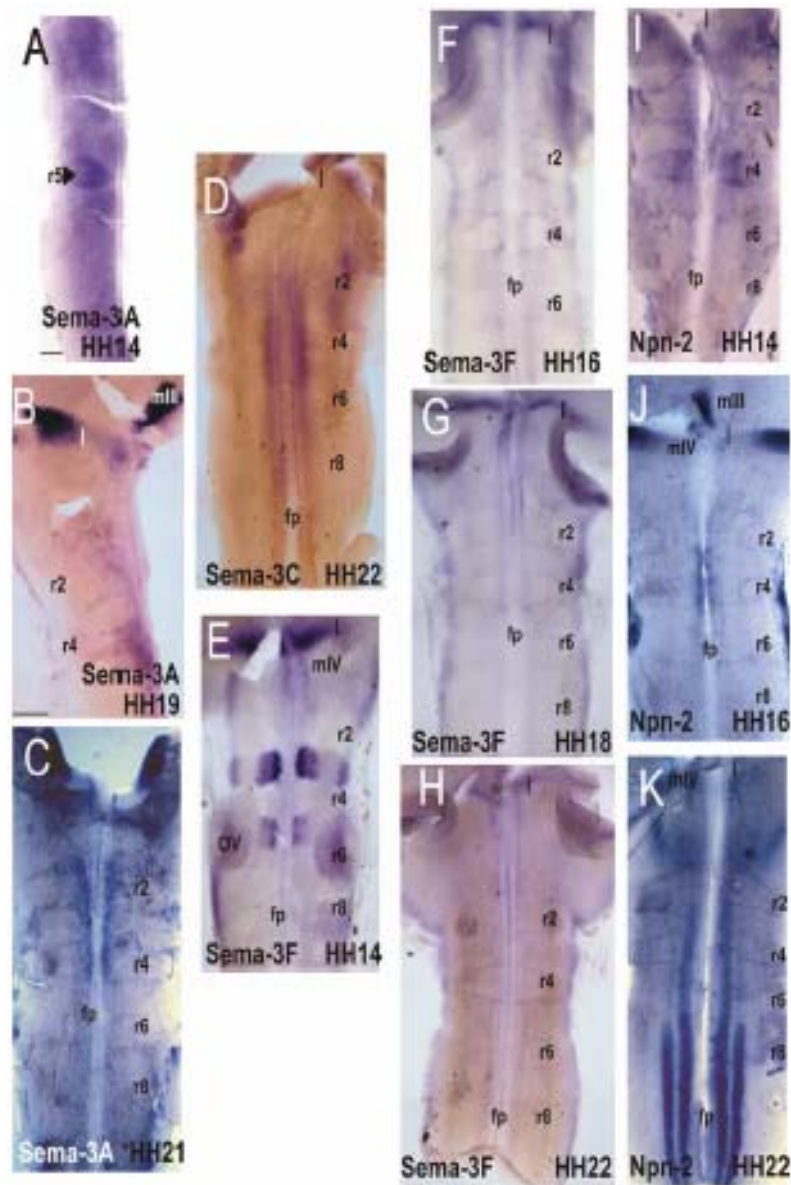


Figura 10. Las semaforinas y sus receptores no se expresan en núcleos motores específicos en el rombencéfalo en desarrollo de embriones de pollo. En pollo, la expresión de semaforinas comienza antes de la diferenciación de las neuronas motoras, pero no parece coincidir con la localización de estas poblaciones. La expresión de las semaforinas -3A (A-C), -3C (D) y -3F (E-H) y de su receptor npn-2 (I-K) se muestra en montajes tipo “libro abierto” en los estadios señalados. El RNAm de npn-1 no se observó en estos estadios. Fp, placa del piso; I, istmo; mIII, núcleo oculomotor, mIV, núcleo troclear; OV, vesícula ótica; r, rombómera.

3. La expresión ectópica de las semaforinas de la clase III en el rombencéfalo de embriones de pollo no altera la proyección de las neuronas reticuloespinales

El análisis de los patrones de expresión de las tres semaforinas de secreción estudiadas en el presente trabajo en pollo y en ratón, reveló que la única semaforina identificada en el istmo en los estadios en los cuales comienza la proyección de las neuronas reticuloespinales rombencefálicas es la sema-3F en embriones de pollo (**Figura 6J-6N y 10E-10K**). En esta misma especie, sema-3A presenta un patrón de expresión restringido al istmo/r1 en HH19 (**Figura 6D y 10B**), demasiado tarde para tener un efecto sobre la proyección de las neuronas reticuloespinales que comienzan a proyectar en HH14 (Glover y Petusdottir, 1991), por lo que su acción como quimiorrepelente no fue considerada.

Para evaluar el posible efecto de sema-3F en la proyección de los axones reticuloespinales, se realizaron experimentos de expresión ectópica de esta proteína en la ruta por donde transitan normalmente los axones reticuloespinales en el rombencéfalo (r2-r4). Basados en los resultados de expresión de este transcrito en el istmo, nuestra predicción fue que su expresión ectópica en r2-r4 podría causar un efecto de repulsión sobre los axones reticuloespinales impidiendo su paso por las regiones electroporadas.

Se electroporaron vectores de expresión que contienen el cDNA de sema-3F, y vectores de expresión con el cDNA de la proteína verde fluorescente (GFP), uni- y bilateralmente en la región rostral del rombencéfalo de embriones de pollo HH11-12 (**Figura 11A**). Como control, en cada uno de los ensayos se electroporó únicamente el vector GFP. Los embriones fueron incubados entonces hasta el estadio HH22 (**Figura 11B**), y las neuronas reticuloespinales fueron marcadas con dextrán-rodamina bilateralmente (**Figura 11C**). Para determinar la expresión ectópica de sema-3F en los embriones, se analizó la expresión de GFP con microscopía confocal al mismo tiempo que la marca de las poblaciones axonales con dextrán-rodamina (**Figura 11D**). Únicamente fueron procesados los rombencéfalos de embriones de pollo que mostraron una electroporación masiva que incluyó al menos las r2-r4 y que tuvieron una buena marca bilateral de dextrán que permitió visualizar la proyección de las neuronas reticuloespinales (**Figura 11D**).

Nuestros resultados muestran que no existen cambios significativos en la proyección de las neuronas reticuloespinales entre el grupo experimental y el control

(n=7 para GFP solo, **Figura 11E** y n=8 para GFP+sema-3F, **Figura 11F**), dejando claro que sema-3F no tiene un efecto sobre la proyección caudal de los axones reticuloespinales. Su expresión en el istmo puede estar desempeñando múltiples acciones entre las que no se encuentra la guía de las poblaciones reticuloespinales.

En un intento por determinar la participación de otros miembros de la familia de las semaforinas de secreción cuyo patrón de expresión no fue evaluado en el presente trabajo, o no pudo ser identificado mediante nuestro sistema de detección, se decidió electroporar unilateralmente los vectores de expresión que codifican para las semaforinas 3A (n=4, resultados no mostrados), -3B (n=4, **Figura 11G**), -3C (n=8, resultados no mostrados) y -3E (n=4, **Figura 11H**). Los resultados señalan que ninguno de estos miembros de la familia de las semaforinas desempeña un papel en la guía descendente de los axones reticuloespinales, en tanto su expresión ectópica en el rombencéfalo no modificó el patrón de proyección caudal de la población en estudio.

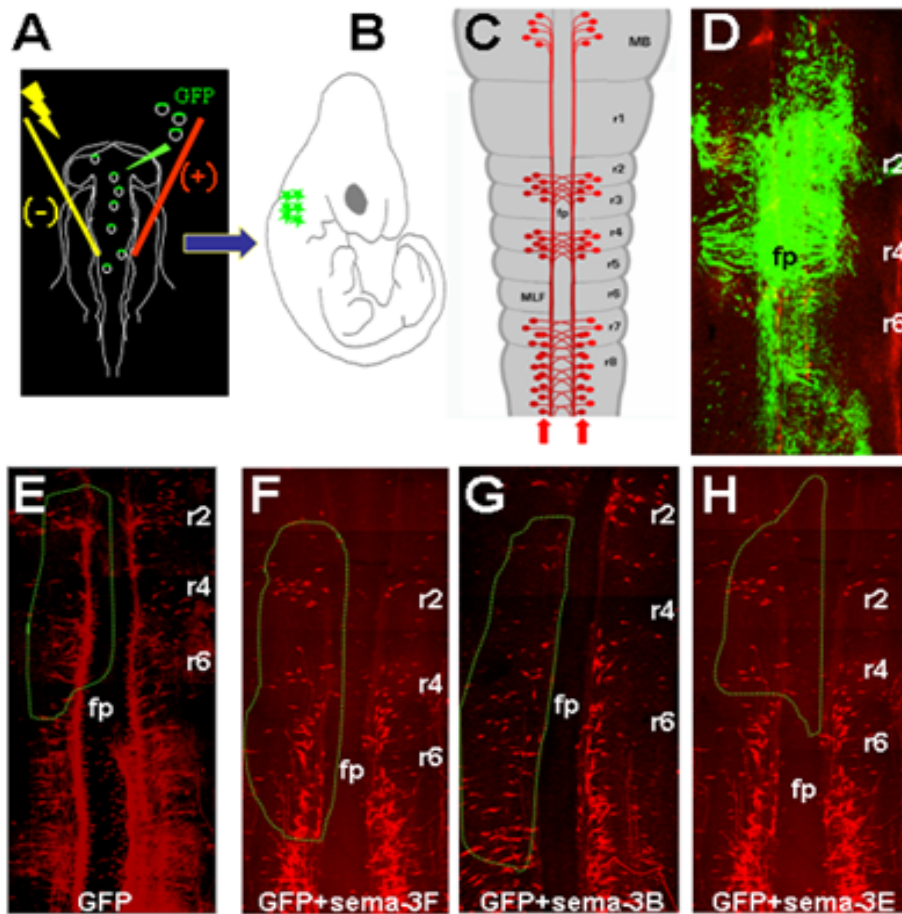


Figura 11. La expresión ectópica de las semaforinas clase III no altera la proyección de las neuronas reticuloespinales que cursan sobre el MLF. A y B, dibujos representativos del proceso de electroporación *in ovo*, D-H, fotografías de imágenes obtenidas con el microscopio confocal que muestran el rombencéfalo de embriones de pollo montado en plano como “libro abierto”. A, arreglo funcional de electrodos restringiendo el sitio de electroporación en el tubo neural de embriones de pollo. B, embrión completo en estadio HH22 seleccionado para marcaje retrógrado; C, esquema del rombencéfalo de embrión de pollo HH22 mostrando el marcaje retrógrado bilateral de las neuronas reticuloespinales a partir de la región caudal del rombencéfalo (flechas rojas); D-H, rombencéfalos de embriones de pollo electroporados en HH11 con vectores de expresión GFP (D y E, control), sema-3F+GFP (F), sema-3B+GFP (G) y sema-3E+GFP (H) marcados bilateralmente en HH22 como en C con dextrán-rodamina (canal rojo). En D se muestra el sitio de electroporación en el canal verde, mientras en E-H, esta región es señalada por las líneas punteadas para permitir la visualización de las poblaciones marcadas retrógradamente. Fp, placa del piso; I, istmo; mb, mesencéfalo; MLF, fascículo longitudinal medial; r, rombómera.

4. La expresión ectópica de un miembro de la familia de las semaforinas provoca aberraciones en la proyección de los axones del TMESV en el mesencéfalo en desarrollo de embriones de pollo

La expresión del RNAm de sema-3F en embriones de pollo y ratón sugiere que esta molécula podría tener especial relevancia para la proyección de las neuronas del TMESV. En el ratón, sema-3F comienza a expresarse en el mesencéfalo desde E9.5, momento en el cual las neuronas del TMESV inician su proyección ventral. Un día más tarde, en E10, se observa el RNAm de esta proteína formando un gradiente de expresión que es más intenso en el mesencéfalo ventral que en el mesencéfalo dorsal. Unas horas más tarde, en E10.5, se restringe el patrón de expresión a regiones por donde cursan los axones del TMESV, sugiriendo una guía posicional para su proyección, en tanto forma un límite de expresión en el *sulcus limitans* separando la placa alar (por donde proyectan caudalmente los axones del TMESV), de la basal. En E11.5, se mantiene el patrón de expresión en el mesencéfalo ventral dentro de la placa alar y en p1, pero está curiosamente ausente del istmo.

En embriones de pollo, esta molécula presenta un patrón de expresión muy diferente. En este organismo, sema-3F se expresa en el istmo mucho antes (HH10, Watanabe et al., 2004) de la proyección de las neuronas del TMESV, y se mantiene en dicha estructura hasta estadios tardíos como HH22 (**Figuras 6J-6N**). La expresión es focalizada y restringida en los primeros estadios a regiones ventrales. En HH14, cuando las neuronas del TMESV comienzan su proyección ventral, el RNAm de sema-3F se observa extendiéndose hacia regiones más dorsales del istmo sin llegar a la línea media (**Figura 6J**). Dos estadios adelante, cuando los axones del TMESV están cruzando el istmo, su expresión se vuelve más intensa, (**Figura 6K**) y en HH18, vuelve a disminuir (**Figura 6L**). Curiosamente, en HH19 es posible observar cómo el LLF, por donde descienden los axones del TMESV, parece “evadir” el territorio de expresión de sema-3F en el istmo/r1 (Watanabe et al., 2004).

Tomados en conjunto, nuestros resultados y los de otros grupos de trabajo (Watanabe et al., 2004), permiten proponer que sema-3F puede ser la molécula repelente que los axones del TMESV encuentran en su camino hacia el rombencéfalo en desarrollo. Para poner a prueba nuestra hipótesis, en primer lugar decidimos co-electroporar ectópicamente sema-3F+GFP en la ruta normal de los axones del TMESV, en el mesencéfalo ventral de embriones de pollo en HH11-12. Los

resultados de esta manipulación sobre la guía de los axones del TMESV fueron visualizados mediante inmunohistoquímica contra neurofilamento en embriones HH22. El criterio para incluir a los animales en el protocolo de inmunotinción fue la observación de electroporación masiva en las regiones ventrales del mesencéfalo que incluyen la placa basal y parte de la placa alar (**Figura 12B**).

La inmunohistoquímica contra neurofilamento en embriones de pollo HH22 normales, revela un patrón de proyección altamente estereotipado en el que los axones del TMESV primero proyectan circunferencialmente paralelos uno del otro, para después incorporarse al LLF donde comienzan su proyección longitudinal. Tanto el LLF como su homólogo ventral, el MLF, cursan siempre en posiciones estereotípicas dentro del eje D/V sin unirse jamás. En el mesencéfalo, estos tractos proyectan sobre la placa alar y la placa basal, respectivamente, pero ambos cruzan el istmo/r1 dentro de la placa basal (Mastick y Easter, 1996) (**Figura 12A**).

Nuestros resultados permiten observar que cuando se electropora sema-3F en el mesencéfalo ventral de embriones de pollo, el número de axones del TMESV se ve severamente reducido (**Figuras 12E-12J**, flechas negras). Dicho efecto no se debe a un número disminuido de neuronas en el mesencéfalo dorsal, porque al contar los somas positivos al RNAm de *isl-1/2* en animales control y electroporados con sema-3F, procesados mediante hibridación *in situ* (resultados no mostrados) no hubo diferencias. De hecho, la expresión ectópica de sema-3F en el mesencéfalo dorsal no modificó ni el número ni la proyección de los axones del TMESV, indicando que sema-3F no tiene un efecto directo sobre la diferenciación de las neuronas que dan origen al tracto en estudio (resultados no mostrados).

En algunos casos incluso es posible observar en el mesencéfalo los conos de crecimiento de los axones del TMESV que no alcanzaron la región ventral de la placa basal (**Figura 12F**, cabezas de flecha en color negro), mientras otros axones proyectaron de manera aparentemente aleatoria y hacia regiones rostrales (**Figura 12F**, flecha blanca) y otros tantos, los menos, alcanzaron el límite mesencéfalo/rombencéfalo y continuaron su proyección normal (**Figura 12F**, asterisco negro). En la mayoría de los casos de embriones electroporados con sema-3F+GFP (7 de 11 embriones analizados), es posible observar axones del TMESV que proyectan de manera desorganizada siguiendo rutas aberrantes rostrales y/o dorsales (**Figuras 12G-12J**, flechas blancas).

Este experimento de expresión ectópica de sema-3F en el mesencéfalo ventral nos permite proponer un efecto quimiorrepelente para el TMESV. Como consecuencia de su expresión ectópica en el mesencéfalo ventral, se observa una reducción en el número de axones que proyectan ventralmente, con la consecuente pérdida o reducción del LLF. Este efecto no se debe a una disminución en el número de células diferenciadas en el mesencéfalo dorsal, porque la expresión de sema-3F es demasiado ventral para tener un efecto. Más aún, la electroporación de esta molécula en el mesencéfalo dorsal no genera un fenotipo anormal en la proyección de los axones del TMESV (resultados no mostrados), sugiriendo que sema-3F no actúa directamente sobre la diferenciación de las neuronas del TMESV. Esto sugiere además que los axones del TMESV comienzan su proyección ventral normalmente en presencia de esta molécula, pero a medida que se acercan al istmo (región donde sema-3F es expresada normalmente), adquieren la capacidad de responder a la molécula.

Lo anterior es apoyado por la identificación de conos de crecimiento en la región central del mesencéfalo, los cuales al parecer no han proyectado hacia la región ventral de la placa basal presumiblemente por la presencia de este quimiorrepelente. Observamos además que los axones que han conseguido proyectar ventralmente hacia el *sulcus limitans* viran en otras direcciones (rostrales o dorsales) alejándose de la fuente de factores presumiblemente repelentes.

Estos efectos parecen ser específicos, en tanto electroporaciones de otros miembros de la familia de las semaforinas como sema-3A (n=4), -3B (n=4) y -3C (n=6) en el mismo sitio (resultados no mostrados) así como electroporaciones controles sólo con GFP (**Figura 12A**), no muestran cambios en los patrones de proyección de las neuronas del TMESV.

El efecto de sema-3F parece ser específico para la proyección de los axones del TMESV, ya que otros grupos axonales como el nervio oculomotor, el niC y el nervio troclear proyectan de manera normal en los embriones electroporados con el vector de expresión de sema-3F (**Figuras 12C-12J**).

Estos resultados son sumamente sorprendentes si tomamos en cuenta que no detectamos npn-2, el principal receptor para sema-3F, en el mesencéfalo dorsal que contiene los cuerpos neuronales que dan origen al TMESV.

5. Estudios de pérdida de función: electroporación *in ovo* de los cDNAs que codifican para el receptor npn-2

El patrón de expresión de sema-3F y su efecto al ser electroporada ectópicamente en el mesencéfalo, sugieren fuertemente su participación en la guía de los axones del TMESV, por lo que en el presente trabajo se decidió expresar ectópicamente el cDNA de npn-2 (Watanabe et al., 2004) en el istmo/r1 y observar los efectos sobre la guía axonal de este tracto. En esta serie de experimentos, la predicción fue que la expresión de npn-2 en la región donde se expresa la sema-3F, funcionaría como “trampa” capturando su ligando silvestre y cancelando por tanto su actividad (Watanabe et al., 2004). Si sema-3F tiene un efecto quimiorrepelente sobre los axones del TMESV, nuestra predicción es que al “anular” su efecto, los axones de esta población cruzarían el istmo en posiciones aberrantes.

En estos ensayos se electroporó GFP en la región ventral del mesencéfalo y el límite istmo/r1 en embriones control, y no se observaron errores de proyección ni disminución en el número de axones del TMESV (n=5, **Figuras 13A y 13B**). Sin embargo, al electroporar el vector de expresión de npn-2+GFP (n=14) en esta misma región se observó un claro efecto de invasión de axones del TMESV hacia la región dorsal de la placa basal (**Figuras 13C-13H**, flechas blancas). También en esta condición observamos lo que parecen ser conos de crecimiento proyectando aberrantemente hacia regiones rostrales (**Figura 13D**, cabezas de flecha en color negro) y/o axones proyectando erróneamente en la misma dirección (**Figura 13D**, flecha negra). Tal efecto no resulta completamente consistente con el papel quimiorrepelente sugerido por nosotros para sema-3F, en tanto los axones del TMESV parecen extraviar su dirección al perder la fuente de señalización de sema-3F en el istmo.

No se observó una reducción obvia en el número de axones, y tampoco errores de proyección ventral hasta el límite de la placa alar, a diferencia del fenotipo observado al electroporar sema-3F. Sin embargo, se observaron ciertos errores en el cruce de la región ístmica en animales electroporados con npn-2+GFP (**Figuras 13C y 13B**, cabezas de flecha color blanco), efecto que parece consistente con la actividad quimiorrepelente de sema-3F en el istmo.

En estos ensayos, la sobre-expresión del receptor de sema-3F en el límite mesencéfalo/rombencéfalo provocó alteraciones en la proyección de los axones del

nervio troclear, los cuales invadieron el tectum como consecuencia de la pérdida de la señal de sema-3F en el istmo, resultados que han sido publicados anteriormente por Watanabe et al. (2004) (**Figuras 13G y 13H**, flecha alargada). Tal efecto nunca fue observado en animales control electroporados con GFP, pero funcionó para nosotros como control positivo de electroporación.

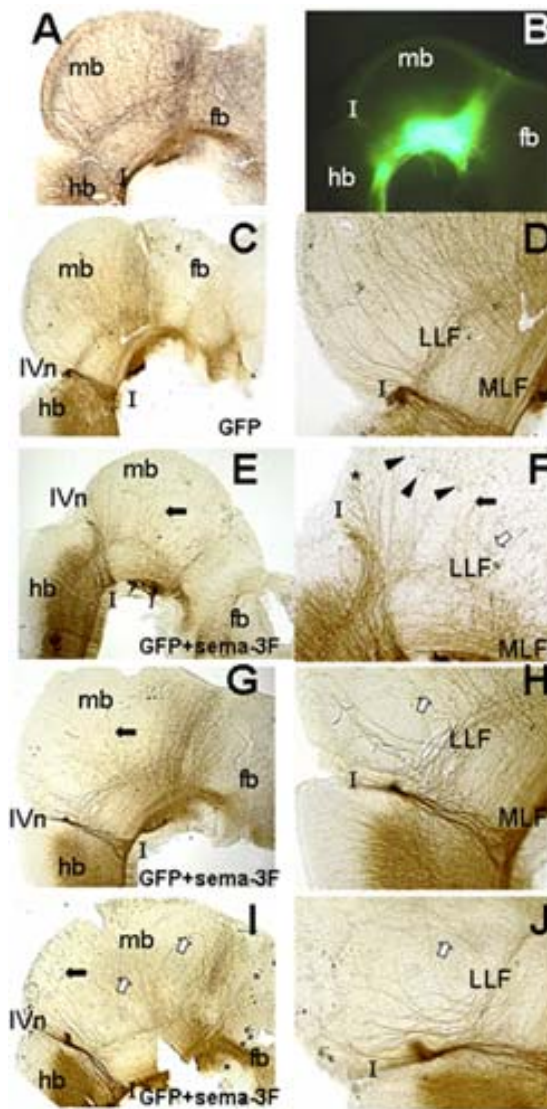


Figura 12. La expresión ectópica de semaforina 3F en el mesencéfalo ventral altera la proyección de los axones del tracto mesencefálico del trigémino. *A, C-J* cerebros de embriones inmunoteñidos con anticuerpo contra neurofilamento mostrando la proyección de los axones del TMESV en HH22; *A*, embrión normal; *B*, fotografía que muestra el sitio de electroporación con GFP en el mesencéfalo ventral; *D, F, H y J*, son imágenes a mayor aumento de las fotografías de la izquierda (*C, E, G* e *I*, respectivamente) mostrando la proyección normal de los axones del TMESV en embriones control electroporados con GFP (*C* y *D*) o en embriones electroporados bilateralmente con sema-3F (*E-J*) (Ver texto para detalles de la figura), IVn, nervio troclear; fb, prosencéfalo; I, istmo; mb, mesencéfalo; MLF, fascículo longitudinal lateral; LLF, fascículo longitudinal lateral.

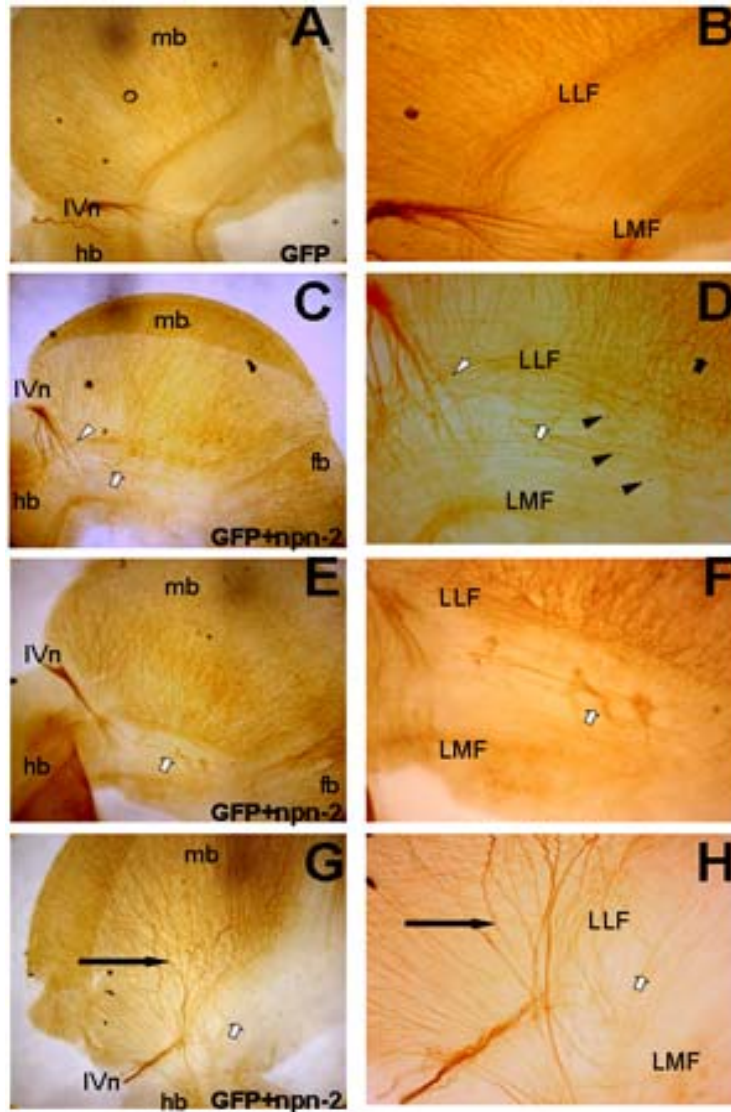


Figura 13. La electroporación ectópica de *npn-2* en el mesencéfalo ventral y rombencéfalo rostral causa invasión de los axones del TMESV a la placa basal. A, fotografía que muestra el sitio de electroporación con GFP en el mesencéfalo ventral; B-H cerebros de embriones inmunoteñidos con anticuerpo contra neurofilamento mostrando la proyección de los axones del TMESV en HH22; B, embrión electroporado con GFP control; D, F y H, imágenes a mayor aumento de las fotografías de la izquierda (C, E y G, respectivamente) mostrando la proyección de los axones del TMESV en embriones electroporados bilateralmente con *npn-2* (Ver texto para detalles de la figura). IVn nervio troclear; fb, prosencéfalo; I, istmo; mb, mesencéfalo; MLF, fascículo longitudinal lateral; LLF, fascículo longitudinal lateral.

X. DISCUSIÓN

El presente proyecto está interesado en los mecanismos moleculares que regulan la proyección longitudinal en el tallo cerebral en desarrollo. Particularmente, en aquéllos que regulan la proyección longitudinal descendente de las neuronas reticuloespinales y del TMESV. Debido a que las semaforinas son moléculas de guía axonal relevantes para numerosos sistemas en el SNC en desarrollo, cuyo papel funcional en el establecimiento de la proyección longitudinal no se conoce, en este trabajo se analizaron los patrones de expresión de las semaforinas y sus receptores en el cerebro de embriones de ratón y pollo durante la proyección de las neuronas reticuloespinales y del TMESV.

Nuestros resultados permiten identificar a las semaforinas y a sus receptores en dominios de expresión restringidos a neurómeras y a sus límites interneuroméricos. Particularmente, el RNAm de sema-3F mostró en pollo un dominio de expresión consecuente con el papel quimiorrepelente asignado al istmo sobre axones reticuloespinales (Hernández-Montiel et al., 2003) y sugerido para axones del TMESV (Chedotal et al., 1995; Mastick y Easter, 1996; Molle et al., 2004).

Estudios de expresión ectópica de sema-3F en la ruta por donde transitan normalmente los axones reticuloespinales descartó su participación en la guía de esta población axonal. En contraste, el mismo estudio de ganancia de función en el mesencéfalo ventral provocó alteraciones en la proyección de los axones del TMESV, aún cuando es difícil asignar a sema-3F un papel como molécula atrayente o repelente para estos axones del TMESV.

Estudios de pérdida de función de sema-3F en el límite mesencéfalo/rombencéfalo sugieren que esta molécula normalmente puede actuar como quimiorrepelente de los axones del TMESV en su cruce por el istmo, sin embargo, estudios in vitro deberán ser llevados a cabo para determinar la función de sema-3F en el animal normal.

1. Las semaforinas de secreción son expresadas en límites interprosoméricos en el prosencéfalo y mesencéfalo en desarrollo de embriones de pollo y ratón

En este trabajo se muestra que la expresión de miembros de la familia de las semaforinas de secreción está restringida a algunos dominios neuroméricos, y que su

expresión y la de sus receptores, las neuropilinas, está también restringida a límites interprosoméricos (**Figuras 14 Y 15**).

En el ratón, la expresión del RNAm de sema-3A, -3C y npn-2 fue detectada en la línea que limita los dominios corticales de los subcorticales en el cerebro anterior, la *zona limitans telencefálica* (**Figura 14**).

Asimismo, sema-3F fue identificada tanto en embriones de pollo como en embriones de ratón en la delgada línea de células que separa las regiones talámicas dorsales y ventrales, la *zona limitans intratalámica*, la misma región que presenta expresión de sema-3A y npn-1 en pollo (**Figuras 14 y 15**).

En ratón, el RNAm de sema-3A, -3C y -3F fue identificado en diferentes niveles del *sulcus limitans* (**Figura 14**), mientras en pollo sema-3F y npn-1 se detectaron en esta estructura límite entre las placas alar y basal (**Figura 15**).

Por otra parte, algunos ligandos mostraron patrones de expresión en dominios neuroméricos. Tal es el caso de sema-3C y -3F en la región rostral del pretectum, -3A en el tálamo dorsal y -3F en un gradiente decreciente de expresión en el mesencéfalo y r1 de ratón (**Figura 14**). Por su parte, en embriones de pollo, sema-3A presenta un patrón de expresión transitorio en r3 y r5 (**Figura 15**).

La expresión de semaforinas y sus receptores en dominios neuroméricos y en sus límites específicos, comienza después del establecimiento de los dominios en el tubo neural, por lo que su posible papel en la inducción es poco probable. Sin embargo, su expresión en tiempos relevantes para la proyección de los tractos pioneros en el cerebro en desarrollo sugiere su implicación en estos procesos.

2. Coexpresión de semaforinas y neuropilinas en núcleos neuronales

Un hallazgo interesante en el presente trabajo fue la expresión de semaforinas y sus receptores en grupos neuronales específicos en el mesencéfalo y rombencéfalo de ratón. En esta especie en particular, la expresión dinámica y diferencial del RNAm de dos miembros de la familia de las semaforinas (sema-3A y -3C), así como de sus principales receptores (npn-1 y -2, respectivamente), fue detectada en algunos núcleos motores de pares craneales en estadios que coinciden con la traslocación de sus somas y con su proyección axonal (E10.5–E12.5).

En pollo, la expresión de semaforinas y neuropilinas fue más restringida en núcleos motores que la de ratón en estadios comparables, pues sólo se observó el RNAm de sema-3A, -3C, -3F y npn-2 en el núcleo oculomotor. Recientemente, sin embargo, Chilton y Guthrie (2003) reportaron la expresión diferencial de semaforinas y sus receptores en diversos núcleos motores, expresión que presenta gran semejanza con los patrones de ratón detallados en el presente trabajo. Este estudio, sin embargo, se realizó en estadios posteriores a los estudiados aquí, cuando los axones motores se encuentran ya en proceso de seleccionar sus blancos periféricos (HH27; Simon et al., 1994, referido en Chilton y Guthrie, 2003).

Resulta sumamente notable que la expresión de los mismos miembros de la familia de semaforinas y neuropilinas en los núcleos motores de los pares craneales no esté conservada en pollo y ratón. Tal vez la función de las semaforinas esté conservada entre ambas especies, pero sea llevada a cabo por diferentes miembros de la familia. Alternativamente, la expresión observada en pollos puede estar retrasada en comparación con la observada en ratones, y se presente en las mismas regiones en estadios no evaluados aún. Estudios futuros podrían verificar la relevancia de estos hallazgos.

La relevancia funcional de la coexpresión de ligandos y receptores en los núcleos motores y en regiones como la comisura posterior, se desconoce. En estas zonas, las semaforinas pueden estar regulando la inervación de otros grupos neuronales, o bien, modular la respuesta de la neurona que la expresa a otras semaforinas exógenas, entre otras posibilidades. Actualmente se sabe que sema-3B y -3C actúan como antagonistas funcionales de sema-3A en eventos dependientes de npn-1 (Takahashi et al., 1998), lo que podría explicar la identificación de más de un ligando en la misma región. El significado de estos hallazgos también se puede de la participación de sema-3A y npn-1 en eventos regenerativos en los cuales ligando y receptor son coexpresados en núcleos motores de ratas adultas (Pasterkamp et al., 1998; Giger et al., 1998).

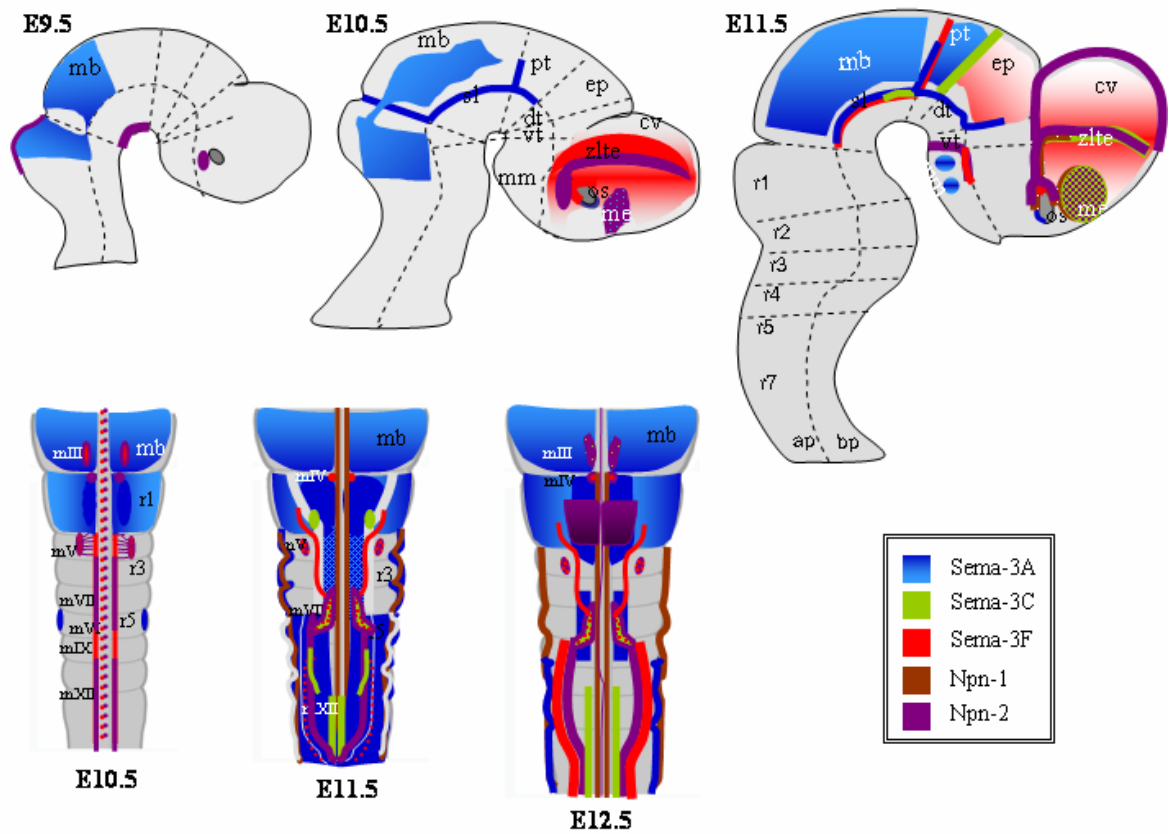


Figura 14. Expresión de las semaforinas y sus receptores neuropilinas en el cerebro en desarrollo de ratón. El panel superior muestra esquemas de la organización espacial de las moléculas estudiadas en el mesencéfalo y prosencéfalo, mientras el panel inferior muestra los esquemas del rombencéfalo en los estadios señalados. mIII, núcleo oculomotor, mIV, núcleo troclear; mV núcleo del trigémino; mVI núcleo abducens; mVII, núcleo facial; mIX, núcleo glossofaríngeo, mXII, núcleo hipogloso; ap, placa alar; bp, placa basal; cv, vesícula cerebral; dt, tálamo dorsal; I, istmo; mb, mesencéfalo; niC, núcleo intersticial de Cajal; os, tallo óptico; pt, pretectum; r, rombómera; sl, sulcus limitans; vt, tálamo ventral; zli, zona limitans intratálámica; zlte, zona limitans telencefálica.

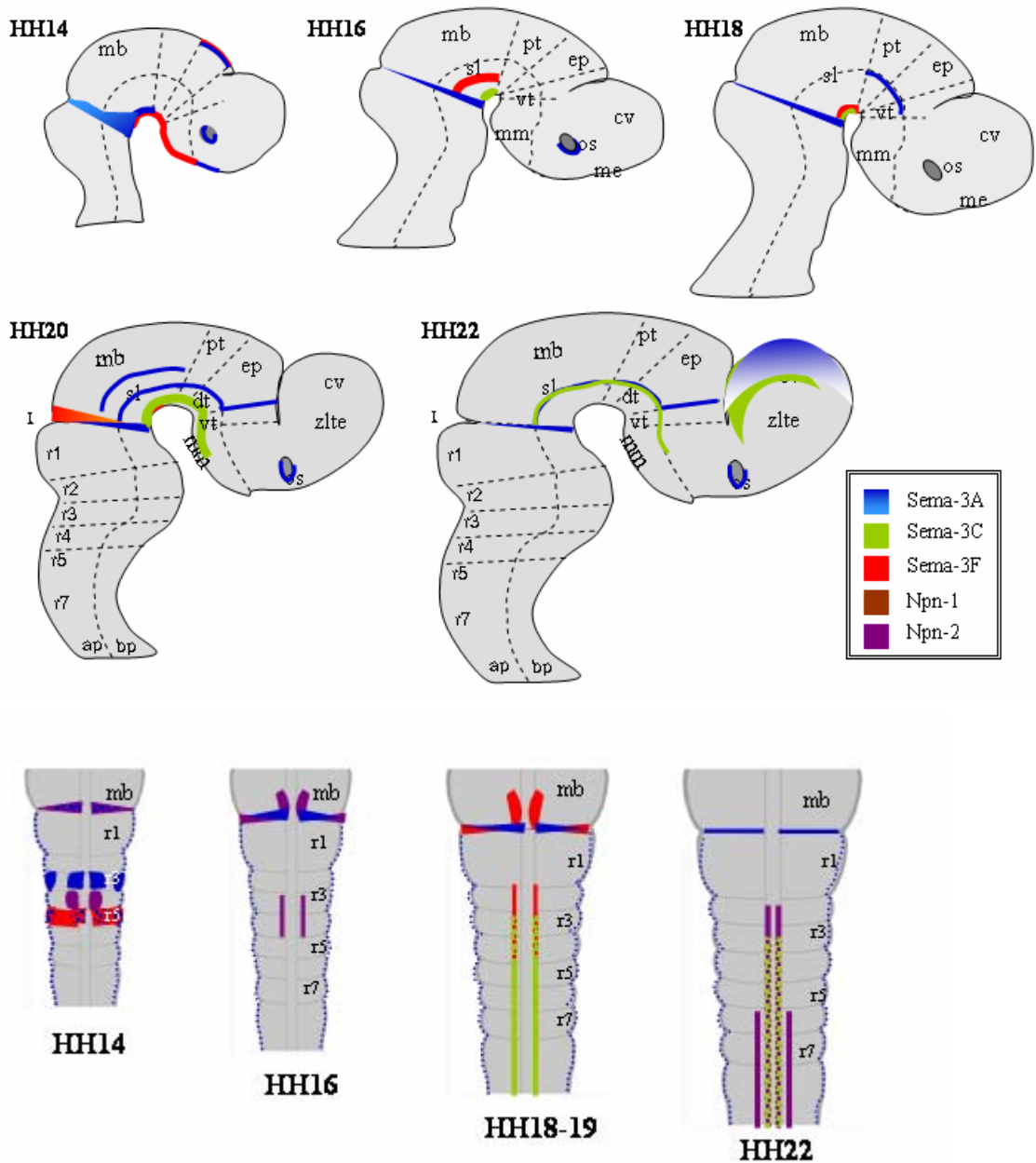


Figura 15. Expresión de las semaforinas y sus receptores neuropilinas en el cerebro en desarrollo de pollo. El panel superior muestra esquemas de la organización espacial de las moléculas estudiadas en el mesencéfalo y prosencéfalo, mientras el panel inferior muestra los esquemas del rombencéfalo en los estadios señalados. ap, placa alar; bp, placa basal; cv, vesícula cerebral; dt, tálamo dorsal; I, istmo; mb, mesencéfalo; niC, núcleo intersticial de Cajal; os, tallo óptico; pt, pretectum; r, rombómera; sl, sulcus limitans; vt, tálamo ventral; zli, zona limitans intratalámica; zlte, zona limitans telencefálica.

3. Expresión de semaforinas en el istmo de embriones de ratón y pollo en estadios relevantes a la proyección de las neuronas reticuloespinales y del TMESV

Ninguno de los miembros estudiados de la familia de las semaforinas de secreción en ratón presentó un patrón de expresión que sugiriera su papel en la repulsión de axones reticuloespinales o del TMESV, debido a su ausencia en el istmo. Sin embargo, cabe destacar el patrón de expresión de sema-3C en el *sulcus limitans* en estadios en los cuales las neuronas del TMESV están proyectando hacia el límite ventral de la placa alar, justo arriba de la expresión de sema-3C. Dado que en el embrión normal los axones del TMESV proyectan en el mesencéfalo exclusivamente sobre la placa alar, sema-3C podría funcionar como una molécula repelente que evitara la proyección de los axones del TMESV hacia regiones ventrales.

Igualmente interesante resulta el patrón de expresión de sema-3F en el mesencéfalo de ratón, el cual parece delimitar la región de proyección de los axones del TMESV. Esta molécula comienza su expresión en la región ventral de la placa alar formando un gradiente de expresión que es más débil en la región dorsal del mesencéfalo, de tal manera que los axones del TMESV proyectan única y exclusivamente sobre regiones positivas al RNAm de sema-3F. Sin embargo, el papel de esta molécula en la proyección de los axones del TMESV no fue evaluado en este trabajo en ratón.

En pollo, por su parte, sema-3F presenta un patrón de expresión notablemente distinto en el istmo. Mientras en ratón sema-3F se localiza en la región rostral del rombencéfalo, y en el mesencéfalo en el patrón anteriormente comentado, ausente del istmo, en pollo se presenta justamente en este límite interneuromérico. Su expresión comienza en la región ventral del istmo y eventualmente alcanza regiones más dorsales, pero no se extiende mucho más allá del mesencéfalo caudal y la región más anterior de r1.

Tal patrón de expresión en pollo inmediatamente sugirió a sema-3F como la molécula candidata a mediar la acción quimiorrepelente del istmo en poblaciones reticuloespinales y del TMESV, por lo que su acción fue evaluada en estudios de ganancia de función en embriones.

Cabe destacar que en pollo ninguna otra semaforina fue identificada en el istmo en estadios relevantes a la proyección de los fascículos longitudinal y medial.

4. La expresión ectópica de las semaforinas en el rombencéfalo en desarrollo de pollo no afecta la proyección de los axones reticuloespinales

En los axones reticuloespinales, la electroporación *in ovo* fue realizada unilateralmente en regiones rombencefálicas (r2-r4) por donde transitan estos axones, con el objetivo de presentar moléculas quimiorrepelentes en su camino y observar cambios en su proyección.

A través del marcaje retrógrado de las poblaciones reticuloespinales no fue posible determinar cambios en los patrones de proyección de las neuronas reticuloespinales que cursan sobre el flm entre los embriones electroporados con GFP (control), y aquéllos electroporados con sema-3F+GFP. Más aún, nuestros resultados de expresión unilateral de sema-3F+GFP no mostraron cambios en los patrones de proyección de las neuronas reticuloespinales entre el lado electroporado y el lado control no electroporado. En conclusión, sema-3F no participa en la quimiorrepulsión ejercida por el istmo sobre los axones reticuloespinales. Tampoco ningún miembro de la familia de las semaforinas electroporados en el presente reporte (sema-3A, -3B, -3C, -3E) parecen estar modulando la proyección caudal de los axones reticuloespinales en embriones de pollo.

5. La electroporación de sema-3F en el mesencéfalo ventral altera la proyección de los axones del TMESV

Como señalan nuestros resultados, la expresión de sema-3F en el istmo de embriones de pollo parece apoyar su papel como molécula quimiorrepelente para axones del TMESV. La expresión de sema-3F en estadios en los cuales estos axones están proyectando ventralmente (HH14) y cruzando el istmo (HH16) es intensa, y puede dar cuenta de la conducta errática y de vagabundeo observada en los axones pioneros. Los axones que se incorporan posteriormente no presentan esta conducta, posiblemente porque proyectan sobre los primeros y fasciculan sobre ellos seguramente atendiendo a señales permisivas de contacto. Sema-3F disminuye su expresión en el istmo en HH18, y ya en HH19 es posible identificar axones proyectando en el LLF justo en regiones libres de sema-3F (Watanabe et al., 2004).

Tomando en cuenta lo anterior, se decidió expresar ectópicamente sema-3F en la ruta normal de los axones del TMESV, en la región más ventral de la placa alar mesencefálica. Los fenotipos observados en los axones del TMESV de embriones electroporados con esta molécula difieren fuertemente de aquéllos observados en

animales control no electroporados y los control con GFP. Como consecuencia de la manipulación se observó en una obvia disminución en el número de axones que proyectan ventralmente y se incorporan al LLF, incluso con la pérdida de esta proyección en casos extremos. se identificaron también numerosos errores de navegación en axones de embriones electroporados con sema-3F, entre los que se incluyen el colapso de conos de crecimiento en el mesencéfalo medial o las conductas erráticas y/o de giro ejecutadas por algunos otros.

Tales fenotipos apoyan nuestra hipótesis del papel quimiorrepelente de sema-3F para axones longitudinales descendentes que cursan sobre el flI; sin embargo, se necesita de estudios adicionales *in vitro* e *in vivo*. Uno de estos estudios involucraría la pérdida de función de sema-3F en el límite mesencéfalo/rombencéfalo.

6. La pérdida de la función de sema-3F a través de la electroporación del receptor npn-2 provoca aberraciones en la proyección de los axones del TMESV que cursan sobre el LLF

La electroporación ectópica del cDNA que codifica para npn-2 fue empleada anteriormente para anular la función del ligando silvestre actuando como una trampa que captura al ligando en cuestión (Watanabe et al., 2004). En este trabajo se decidió utilizar la misma estrategia con el fin de anular la actividad de sema-3F en el istmo, y observar la conducta de los axones del TMESV ante tal ausencia.

Nuestros resultados permiten identificar al menos tres tipos de alteraciones en la proyección de los axones del TMESV como consecuencia de la electroporación de npn-2. En primer lugar, es posible observar un claro efecto de invasión de axones del TMESV hacia la región dorsal de la placa basal, algunos conos de crecimiento vagabundeando hacia regiones rostrales e invadiendo también la placa basal, y algunos otros axones proyectando erróneamente hacia el prosencéfalo. Sin embargo, cabe destacar que el patrón de proyección ventral de los axones del TMESV fue conservado en su mayoría, a diferencia de lo observado ante la expresión ectópica del ligando.

En conjunto, la gama de efectos observados en estos ensayos ofrece material para al menos dos interpretaciones. En primer lugar, el cruce desorganizado de los axones a nivel del istmo podría sugerir que, en ausencia de las señales repelentes expresadas

normalmente en esas regiones, los axones pierden la capacidad para cruzar en un punto determinado por la ausencia de expresión de sema3F, lo que concuerda perfectamente con el papel sugerido por nosotros para sema-3F.

Sin embargo, la invasión de axones presumiblemente provenientes de las regiones dorsales del mesencéfalo hacia regiones muy ventrales, ubicadas ya dentro de la placa basal, así como la identificación de axones y conos de crecimiento vagabundeando y/o proyectando hacia regiones rostrales nos llevan a sugerir que tal vez existe otro ligando para npn-2 que funciona como atrayente para axones del TMESV hacia regiones caudales, cuya acción cancelamos al sobre-expresar npn-2 en el mesencéfalo ventral/istmo. Npn-2 se une específicamente a tres ligandos conocidos de la familia de las semaforinas de secreción, entre los que se encuentran las semaforinas -3C y -3F estudiadas en el presente trabajo, además de sema-3G (Taniguchi et al., 2005) cuyo patrón de expresión en el embrión de ratón y pollo es desconocido, por lo que su acción como molécula atrayente para axones del TMESV no puede ser descartada.

Más aún, el cambio de crecimiento circunferencial a proyección longitudinal parece estar determinado por señales de corto alcance adicionales no evaluadas en el presente trabajo. Tales señales tal vez son enmascaradas por la electroporación del cDNA de npn-2, lo que explicaría la fuerte defasciculación observada en los embriones experimentales.

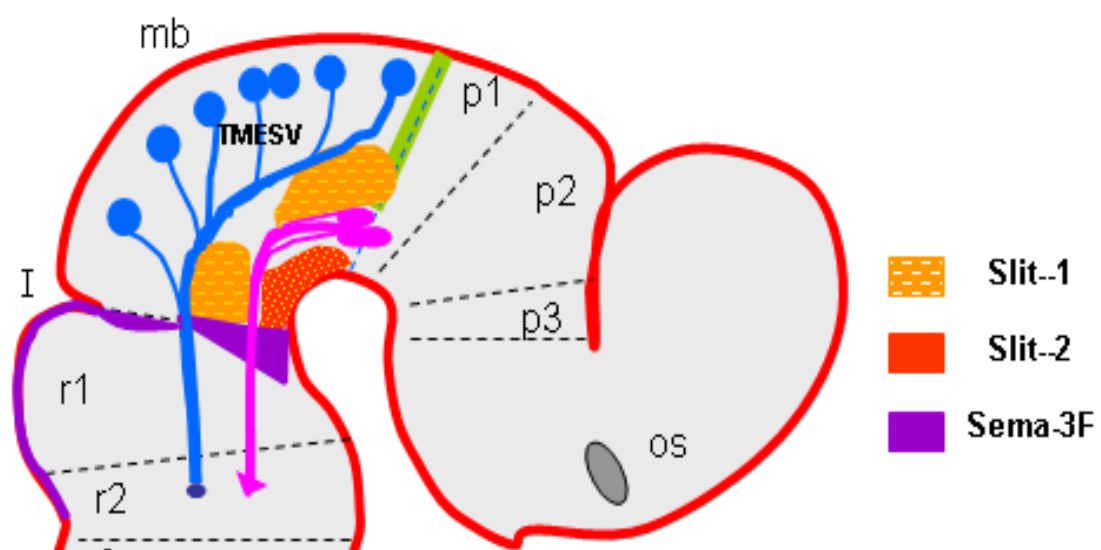


Figura 16. Moléculas de señalización relevantes para la proyección de neuronas pioneras a lo largo de rutas longitudinales descendentes. Dominios de expresión de

sema-3F, slit-1 y slit-2 en embriones de pollo HH17-HH19. El curso de los axones del TMESV y del niC que forman los fascículos longitudinales lateral y medial se ve regulado por factores inhibitorios que los mantienen separados uno del otro (slit-1. Molle et al., 2004) y alejados de la línea media (slit-2. Molle et al., 2004), mientras sema-3F parece regular el cruce de los axones del TMESV en el límite mesencéfalo/rombencéfalo. I, Istmo: mb, mesencéfalo; p, prosómera; os, tallo óptico; r, rombómera; TMESV, tracto mesencefálico del trigémino.

CONCLUSIONES

El presente trabajo contribuye proporcionando evidencia acerca de la expresión altamente especializada de las semaforinas y sus receptores en el cerebro en desarrollo de ratón y pollo. Más aún, permite identificar importantes diferencias entre los patrones de expresión de las especies estudiadas.

En general, dichos complejos patrones de expresión son consistentes con los diversos roles que han sido asignados a la señalización mediada por semaforinas durante el desarrollo del SNC, y sugieren su participación en procesos que aún no han sido caracterizados.

Particularmente, la expresión de sema-3F en el istmo de embriones de pollo en estadios relevantes a la proyección de las neuronas de las neuronas reticuloespinales y del TMESV fue sugerida en el presente trabajo como señal quimiorrepelente para dichas poblaciones axonales en estudio, sin embargo, nuestros resultados permiten hacer las siguientes afirmaciones:

1. Las semaforinas de secreción no regulan la proyección descendente de los axones reticuloespinales en embriones de pollo

- 2 La sema-3F regula la proyección de los axones del TMESV que cursan sobre el fascículo longitudinal lateral

- 3 Dicho efecto parece ser quimiorrepelente, aún cuando más estudios deben ser llevados a cabo para determinar la naturaleza de tal acción

REFERENCIAS

- Bourikas, D., Pekarik, V., Baeriswyl, T., Grunditz, A., Sadhu, R., Nardo, M. y Stoeckli, E.T. (2005). "Sonic hedgehog guides commissural axons along the longitudinal axis of the spinal cord." *Nature Neuroscience* 8: 297-304.
- Brose, K., Bland, K.S., Wang, K.H., Arnott, D., Henzel, W., Goodman, C. S., Tessier-Lavigne, M. y Kidd, T. (1999). "Slit proteins bind Robo receptors and have an evolutionarily conserved role in repulsive axon guidance." *Cell* 96: 795-806.
- Chan, S., Zheng, H., Su, M., Wilk, R., Killeen, 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.
- Chedotal, A., Pourquie, O. y Sotelo, C. (1995). "Initial tract formation in the brain of the chick embryo: selective expression of the BEN/SC1/DM-GRASP cell adhesion molecule." *European Journal of Neuroscience* 7: 198-212.
- Chen, H., Chedotal, A., He, Z., Goodman, C. S. y Tessier-Lavigne, M. (1997). "Neuropilin-2, a novel member of the neuropilin family, is a high affinity receptor for the semaphorins Sema E and Sema IV but not Sema III." *Neuron* 19: 547-559.
- Chilton, J. K. y Guthrie, S. (2003). "Cranial expression of class 3 secreted semaphorins and their neuropilin receptors." *Developmental Dynamics* 228: 726-733.
- Clarke, J. D. y Lumsden, A. (1993). "Segmental repetition of neuronal phenotype sets in the chick embryo hindbrain." *Development* 118: 151-162.
- Código Ético para la Investigación Biomédica. Hudson, R., Laclette, J. P., Lomelí, C. Mancilla, R., Morales, M., Ostrosky, P. y Rojas, E. Instituto de Investigaciones Biomédicas. Universidad Nacional Autónoma de México
- Colamarino, S. A. y Tessier-Lavigne, M. (1995). "The axonal chemoattractant netrin-1 is also a chemorepellent for trochlear motor axons." *Cell* 81: 621-629.
- Daston, M. M. y Koester, S.E. (1996). "Transcriptional regulation of axon pathfinding." *Neuron* 17: 5-8.
- Easter, S. S., Ross, L. S. y Frankfurter, A. (1993). "Initial tract formation in the mouse brain." *Journal of Neuroscience* 13: 285 -299.
- Funato, H., Saito-Nakazato, 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." *Molecular and Cellular Neuroscience* 16: 206-220.
- Giger, R. J., Pasterkamp, R. J., Heijnen, S., Holtmaat, A. J. G. D. y Verhaagen, J. (1998). "Anatomical distribution of the chemorepellent semaphorin III/collapsin-1 in the adult rat and human brain: predominant expression in structures of the olfactory-

hippocampal pathway and the motor system." *Journal of Neuroscience Research* 52: 27-42.

Giger, R. J., Cloutier, J. F., Sahay, A., Prinjha, R. K., Leventon, D. V., Moore, S. E., Pickering, S., Simmons, D., Rastan, S., Walsh, F. S., Kolodkin, A. L., Ginty, D. D. y Geppert, M. (2000). "Neuropilin-2 is required in vivo for selective axon guidance responses to secreted semaphorins." *Neuron* 25: 29-41.

Glover, J. C. y Petursdottir, G. (1988). "Pathway specificity of reticulospinal and vestibulospinal projections in the 11-day chicken embryo." *Journal of Comparative Neurology* 270: 25-38.

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

Glover, J. C. (1993). "The development of brain stem projections to the spinal cord in the chicken embryo." *Brain Research Bulletin* 30: 265-271.

Gu, Ch., Yoshida, Y., Livet, J., Reimert, D. V., Mann, F., Merte, J., Henderson, Ch. E., Jessell, T. M., Kolodkin, A. L. y Ginty, D. D. (2005). "Semaphorin 3E and plexin-D1 control vascular pattern independently of neuropilins." *Science* 307: 265-268.

Guthrie, S. y Lumsden, A. (1992). "Motor neuron pathfinding following rhombomere reversals in the chick embryo hindbrain." *Development* 114: 663-673.

Hamburger V. y Hamilton, H. L. (1951). "A series of normal stages in the development of the chick embryo." *Journal of Morphology* 88: 49-92.

Hernández-Montiel, H. L., Meléndez-Herrera, E., Cepeda-Nieto, A. C., Mejía-Viggiano, C., Larriva-Sahd, J., Guthrie, S. y Varela-Echavarría, A. (2003). "Diffusible signals and fasciculated growth in reticulospinal axon pathfinding in the hindbrain." *Developmental Biology* 255: 99-112.

Holley, J. A. y Silver, J. (1987). "Growth pattern of pioneering chick spinal cord axons." *Developmental Biology* 123: 375-388.

Hunter, E., Begbie, J., Mason, I. y Graham, A. (2001). "Early development of the mesencephalic trigeminal nucleus." *Developmental Dynamics* 222: 484-493.

Keino-Masu, K., Masu, M., Hinck, L., Leonardo, E.D., Chan, S.S., Culotti, J.G. y Tessier-Lavigne, M. (1996). "Deleted in Colorectal Cancer (DCC) encodes a netrin receptor." *Cell* 87: 175-185.

Kidd, T., Russell, C., Goodman, C. S. y Tear, G. (1998). "Dosage-sensitive and complementary functions of roundabout and commissureless control axon crossing of the CNS midline." *Neuron* 20:25-33

Kidd, T., Bland, K.S. y Goodman, C.S. (1999). "Slit is the midline repellent for the robo receptor in *Drosophila*." *Cell* 96: 785-94.

Klier, E. M., Wang, H., Constantin, A.G. y Crawford, J.D. (2002). "Midbrain control of three-dimensional head orientation." *Science* 295: 1314-1316.

Krauss, S., Johansen, T., Korzh, V. y Fjose, A. (1991). "Expression pattern of zebrafish pax genes suggests a role in early brain regionalization." *Nature* 353: 267-270.

Lee, S. M., Danielian, P.S., Fritsch, B. y 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. y Keynes, R. (1989). "Segmental patterns of neuronal development in the chick hindbrain." *Nature* 337: 424-428.

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

Lyuksyutova, A., Lu, C.C., Milanesio, N., King, L.A., Guo, N., Wang, Y., Nathans, J., Tessier-Lavigne, M. y Zou Y. (2003). "Anterior-posterior guidance of commissural axons by Wnt-frizzled signaling." *Science* 302: 1984-1988.

Martinez, S., Crossley, P. H., Cobos, I., Rubenstein, J. L., y Martin, G. R. (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. S. y Easter, S.S. (1996). "Initial organization of neurons and tracts in the embryonic mouse fore- and midbrain." *Developmental Biology* 173: 79-94.

Meléndez-Herrera, E. y Varela-Echavarría, A. (2006). "Expression of secreted semaphorins and their receptors in specific neuromeres, boundaries, and neuronal groups in the developing mouse and chick brain." *Brain Research* 1067: 126-137.

Molle, K. D., Chedotal, A., Rao, Y., Lumsden, A. y Wizenmann, A. (2004). "Local inhibition guides the trajectory of early longitudinal tracts in the developing chick brain." *Mechanisms of Development* 121: 143-156.

Pasterkamp, R. J., Giger, R. J. y Verhaagen, J. (1998). "Regulation of semaphorin III/collapsing-1 gene expression during peripheral nerve regeneration." *Experimental Neurology* 153:313-327.

Puelles, L. y Rubenstein, J. L. (2003). "Forebrain gene expression domains and the evolving prosomeric model." *Trends in Neurosciences* 26: 469-476.

Reifers, F., Bohli, H., Walsh, E. C., Crossley, P. H., Stainier, D. Y., y Brand, M. (1998). "Fgf8 is mutated in zebrafish acerebellar (ace) mutants and is required for maintenance of midbrain-hindbrain boundary development and somitogenesis." *Development* 125: 2381-2395.

Rubenstein, J. L. R., Shimamura, K., Martinez, S. y Puelles, L. (1998). "Regionalization of the prosencephalic neural plate." *Annual Review of Neuroscience* 21: 445-477.

Sanchez, V., Ferran, J. L., Pereyra-Alfonso, S., Scicolone, G., Rapacioli, M. y Flores, V. (2002). "Developmental changes in the spatial pattern of mesencephalic trigeminal nucleus (Mes5) neuron populations in the developing chick optic tectum." *Journal of Comparative Neurology* 448: 337-348.

Shepherd, I., Luo, Y., Raper, J. A. y Chang, S. (1996). "The distribution of collapsin-1 mRNA in the developing chick nervous system." *Developmental Biology* 173: 185-199.

Shimamura, K., Hartigan, D. J., Martinez, S, Puelles, L. y Rubenstein, J. L. R. (1995). "Longitudinal organization of the anterior neural plate and neural tube." *Development* 121: 3923-3933.

Shimamura, K., Martinez, S., Puelles, L. y Rubenstein, J. L. R. (1997). "Patterns of gene expression in the neural plate and neural tube subdivide the embryonic forebrain into transverse and longitudinal domains." *Developmental Neuroscience* 19: 88-96.

Simon, H., Guthrie, S. y Lumsden, A. (1994). "Regulation of SC1/DM-GRASP during the migration of motor neurons in the chick embryo brain stem." *Journal of Neurobiology* 25: 1129-1143.

Stainier, D. Y. y Gilbert, W. (1989). "The monoclonal antibody B30 recognizes a specific neuronal cell surface antigen in the developing mesencephalic trigeminal nucleus of the mouse." *Journal of Neuroscience* 9: 2468-2485.

Stoeckli, E. T. y Landmesser, L. T. (1995). "Axonin-1, NrCAM y NhCAM play different roles on th in vivo axon guidance of chick commissural neurons." *Neuron* 14: 1165-1179.

Takahashi, T., Nakamura, G., Jin, Z., Kalb, R. G. y Strittmatter, S. M. (1998) "Semaphorins A and E act as antagonists of neuropilin-1 and agonists of neuropilin-2 receptors." *Nature Neuroscience* 1: 487-493.

Takahashi T, F. A., Nakamura, F., Wang, L. H., Murakami, Y., Kalb, R. G., Fujisawa, H. y Strittmatter S. M. (1999). "Plexin-neuropilin-1 complexes form functional semaphorin-3A receptors." *Cell* 99: 59-69.

Tanahill, D., Cook, G. y Keynes, R. (1997). "Axon guidance and somites." *Cell Tissue Research* 290: 275-283.

Taniguchi, M., Masuda, T., Fukaya, M., Kataoka, H., Mishina, M., Yaginuma, H., Watanabe, M. y Shimizu, T. (2005). "Identification and characterization of a novel member of murine semaphorin family." *Genes Cells* 10: 785-792.

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

Valverde, F., Garcia, C., Lopez-Mascaraque, L. y De Carlos, J. A. (2000). "Development of the mammillothalamic tract in normal and Pax-6 mutant mice." *Journal of Comparative Neurology* 419: 485-504.

Varela-Echavarria, A., Tucker, A., Puschel, A. W. y Guthrie S. (1997). "Motor axon subpopulations respond differentially to the chemorepellents netrin-1 and semaphorin D." *Neuron* 18: 193-207.

Varela-Echavarria, A. y Guthrie, S. (1997). "Molecules making waves in axon guidance." *Genes and Development* 11: 545-557.

Wahl, C., Nodden, D. y Baker, R. (1994). "Developmental relationships between sixth nerve motor neurons and their targets in the chick embryo." *Developmental Dynamics* 201: 191-202.

Watanabe, Y., Toyoda, R. y Nakamura, H. (2004). "Navigation of trochlear motor axons along the midbrain-hindbrain boundary by neuropilin 2." *Development* 131: 681-692.

Wightman, B., Clark, S.G., Taskar, A. M., Forrester, W.C., Maricq, A.V., Bargmann, C. I. y Garriga, G. (1996). "The *C. elegans* gene *vab-8* guides posteriorly directed axon outgrowth and cell migration." *Developmental Biology* 122: 671-682.

Wilson, S. W., Brennan, C., Macdonald, R., Brand, M. y Holder, N. (1997) "Analysis of axon tract formation in the zebrafish brain: the role of territories of gene expression and their boundaries." *Cell Tissue Research* 290: 189-196.

Wolf, F. W., Hung, M. S., Wightman, B., Way, J. y Garriga, G. (1998). "*vab-8* is a key regulator of posteriorly directed migrations in *C. elegans* and encodes a novel protein with kinesin motor similarity." *Neuron* 20: 655-666.

Yaginuma, H. y Oppenheim, R. W. (1991). "An experimental analysis of in vivo guidance cues used by axons of spinal interneurons in the chick embryo: evidence for chemotropism and related guidance mechanisms." *Journal of Neuroscience* 11: 2598-2613.

Yaginuma, H., Shiga, T. y Oppenheim, R.W. (1993). "Mechanisms of axonal guidance used by interneurons in the chick embryo spinal cord." *Perspectives in Developmental Neurobiology* 1: 205-215.