



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

**REGULACIÓN DE LA PROYECCIÓN AXONAL
DE NEURONAS DECUSANTES EN EL
ROMBENCÉFALO CAUDAL**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTORA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

P R E S E N T A

M. en C. María Teresa Sandoval Minero

Asesor: Dr. Alfredo Varela Echavarría



JURIQUILLA, QUERÉTARO, MÉXICO

2008

**INSTITUTO DE
NEUROBIOLOGÍA**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

A la memoria de mi madre, María Teresa Minero Ponce,
por su gran entrega y dedicación a nuestra familia,
pero sobre todo porque fue un gran ejemplo de tenacidad,
fortaleza y amor a la vida.

A ti, que aún en momentos de profundo dolor supiste
entregar una sonrisa, con todo mi cariño y respeto.

A mi padre, Carlos Sandoval Gallegos, por su apoyo
constante y su continuo interés en mi desarrollo
académico y humano. Gracias por enseñarme el valor del
amor verdadero e incondicional.

To Andy, my original spark, who is my sun every morning
and a peaceful haven at the end of the day. Thanks for
having brought meaning and happiness to my life.

The greatest progressive minds of embryology
have not searched for hypotheses;
they have looked at embryos.
-J. M. OPPENHEIMER (1955)

Agradecimientos

- Al Dr. Alfredo Varela, mi mayor agradecimiento por sus valiosas enseñanzas en el laboratorio, por haber renovado mi interés en la ciencia y porque siempre ha creído en mí. Gracias porque además de conocimientos buscaste formar en mí una capacidad crítica y analítica. Por último, gracias por tu comprensión y amistad y por estar ahí en los momentos difíciles.
- Un agradecimiento especial a la Dra. Ofelia Mora de quien obtuve no sólo un gran apoyo moral y económico, sino una invaluable amistad y consejo oportuno.
- Gracias a los miembros de mi comité tutorial, Dr. Gonzalo Martínez de la Escalera y Dr. Luis Covarrubias Robles, por sus críticas al proyecto y su interés en mi formación académica y científica. Gracias también al jurado de examen de grado sus comentarios a la Tesis: Dr. Manuel Salas, Dr. Enrique Pedernera, Dra. Diana Escalante, Dr. Iván Velasco, Dr. Gabriel Manjarrez y Dr. Gonzalo Martínez de la Escalera.
- A los miembros del laboratorio con quienes coincidí en diferentes momentos durante 6 años, por saber crear un ambiente cordial y de colaboración: Ana Cecilia, Itzel, Hebert, Esperanza, Elisa, Claudia, Amaya, Conchita, Anaid, Adriana González, Adriana Morales, Ada Elva, Lulú, Paty, Laura, Mayita, Oscar, Brizia y Armando Shimada. Gracias por todos los buenos momentos compartidos dentro y fuera del laboratorio.
- Agradezco el apoyo técnico de Carmen Mejía; de Anaid Antaramián y Adriana González Gallardo de la Unidad de Proteogenómica; del Dr. Martín García Servín, así como de todo el personal del bioterio; de Leopoldo Santos y Elsa Nidia Hernández de la Unidad de Microscopía; de Leonor Casanova, Carmen y Yola de la Unidad de Enseñanza; y de Pilar Galarza y todo el personal de la Biblioteca. A todos ellos, ¡Mil Gracias!
- A la Dra. Elke Stein y al Dr. Martín García-Castro de la Universidad de Yale por haberme permitido desarrollar parte de mis experimentos en sus laboratorios y por sus comentarios críticos al proyecto.

- Al Dr. Andrew Schaefer por haber aparecido en un momento crucial en mi vida y colaborar conmigo en el análisis de los resultados, así como en el desarrollo del manuscrito para su publicación. Gracias por escucharme y echarme porras en la última etapa de mi doctorado, sin ti no hubiera sido posible publicar mi trabajo y terminar esta tesis.
- A mi siempre amiga, la Dra. Natalia Manzano León, mil gracias por tomarte la molestia de ayudarme a culminar con los trámites de titulación.
- A todos los amigos con quienes compartí buenas charlas en los pasillos, paseos, habitación o rides al DF: Rita Rojas, Carmen Frías, Adriana Morales, Ada Elva Rovelo, Lourdes Kuri, Lilita Sánchez, Mara Garín, Azucena Aguilar, Pilar Galarza, Víctor Pérez, Lilita López, Manuel Aguilar, Estuardo López, Edith Rangel, Miguel Huerta y Renata, Joel, Itzel y Griselda, Yazmin Macotela, Cecilia Marín, Guadalupe García, Juan Carlos Solís, Wilbert Zarco, Amaya Miquelajáuregui, Ana Cecilia Cepeda; a todos, gracias por hacer de mi estancia en Querétaro una experiencia tan enriquecedora.
- A mis queridísimos pavos: Miriam, Berta, Mac, Dra. Horsman, Jeans, Calipso, Arturo, Ofelia, Juan Pablo, Jimena, Marisela y agregados, con quienes no sólo me divertí muchísimo, sino que me hicieron crecer como persona y me enseñaron a apreciar las cosas que realmente importan en la vida. Por una amistad perdurable, ¡salud!
- Un agradecimiento especial a aquellas personas que tienen un lugar especial en mi corazón, por haberme hecho reír tantísimo y por estar conmigo en los momentos más tristes: Rita Rojas, Lilita Sánchez, Miriam Hernández y Berta González. Sé que siempre contaré con ustedes.
- A todos los investigadores, personal y estudiantes del Instituto de Neurobiología que de alguna manera contribuyeron a mi formación como Doctora, ¡gracias!
- Este trabajo de investigación se llevó a cabo con la subvención del CONACyT (40286M, 46754Q) y The Wellcome Trust (GR071174AIA), así como con becas de doctorado del CONACYT y de la DGEP-UNAM.

ÍNDICE

Resumen	7
Abstract	8
Índice de figuras	9
Abreviaturas	11
Introducción	13
Antecedentes	16
1. Mecanismos celulares y moleculares de la guía axonal en el desarrollo	16
1.1. Moléculas involucradas en la guía axonal	23
Moléculas de adhesión celular (CAMs)	26
Efrinas/Eph	29
Semaforinas	31
Netrinas	33
Slit/Robo	34
Morfógenos	36
1.2. Fasciculación axonal como mecanismo de guía	37
2. Modelos de estudio de la formación de comisuras en vertebrados e invertebrados	45
3. Mecanismos que controlan la formación de las decusaciones durante el desarrollo	48
Planteamiento del problema	58
Hipótesis	59
Objetivo general	59
Objetivos particulares	59
Estrategia experimental	60
Material y métodos	61
• Animales	61
• Marcaje anterógrado fluorescente	61
• Cultivo de explantes de rombencéfalo	62
• Inmunohistoquímica en embrión completo	63
• Inmunofluorescencia en cortes transversales	64
• Adquisición y procesamiento de imágenes	65
• Cuantificación de axones y análisis estadístico	66
• Hibridación <i>in situ</i>	69

Resultados	71
• Los axones del rombencéfalo caudal del ratón comienzan a cruzar la línea media en E10	71
• Los axones de neuronas decusantes del rombencéfalo caudal se encuentran en cercana aposición con sus homólogos contralaterales en la línea media	73
• El cruce de la línea media de los axones decusantes del rombencéfalo es impedido por una barrera mecánica unilateral contralateral	76
• El cruce de la línea media de los axones decusantes del rombencéfalo caudal es bloqueado también por una barrera unilateral permeable sólo a moléculas difusibles	81
• La barrera unilateral afecta la decusación pero no la cantidad de axones decusantes de una población de neuronas positiva a calbindina, y tampoco afecta la expresión de moléculas guía en la línea media	86
• Los axones decusantes del rombencéfalo caudal expresan algunas moléculas de adhesión celular y receptores a moléculas guía antes y durante el cruce de la línea media	93
Discusión	96
• Los axones decusantes del rombencéfalo crecen en aposición con sus contrapartes contralaterales mientras cruzan la línea media	97
• Interacciones axonales entre neuronas contralaterales en la línea media como un mecanismo adicional para salir de la placa del piso y consolidar la decusación	98
Conclusiones	109
Glosario de términos	110
Referencias	111

RESUMEN

La información de ambos lados del cerebro se transmite por axones que proyectan a través de la línea media del sistema nervioso central. El cruce de la línea media es regulado por señales, tanto atrayentes como repelentes, secretadas por las células de la placa del piso. No obstante, el mecanismo por el cual los axones cruzan la línea media a pesar de la presencia de señales opuestas, no se conoce del todo. En invertebrados se ha sugerido que el cruce es facilitado por la interacción en la línea media entre axones homólogos de neuronas decusantes pero no existe evidencia de que dicho mecanismo esté presente en vertebrados. En el presente trabajo, se determinó si los axones de neuronas comisurales de lados opuestos del rombencéfalo caudal del ratón interactúan entre sí en la línea media ventral y se evaluó la relevancia de dicha interacción. El marcaje con moléculas lipofílicas en ambos lados del rombencéfalo caudal, mostró interacciones entre conos de crecimiento y axones de neuronas decusantes que se mantienen aún después del cruce de la línea media. Al colocar una barrera sólida de un lado del rombencéfalo, se observó una disminución significativa en la cantidad de axones del lado contralateral que cruza la línea media, mientras que en presencia de una barrera permeable a los axones, la decusación se formó. Interesantemente, los axones cruzaban la línea media en presencia de una barrera permeable a moléculas difusibles, pero no continuaban hacia el lado contralateral. Estos resultados sugieren que el cruce de la línea media es facilitado tanto por señales difusibles que coadyuvan a contrarrestar la señal repelente, como por interacciones entre axones decusantes contralaterales, que permiten la consolidación de la decusación. Estos hallazgos contribuyen a incrementar nuestro conocimiento de los mecanismos que los axones decusantes usan para navegar eficientemente en el ambiente complejo de la línea media y cruzar hacia el lado contralateral del cerebro.

Palabras clave: guía axonal, neuronas comisurales, desarrollo embrionario.

ABSTRACT

Information is transmitted bilaterally in the brain by axons that project across the midline of the central nervous system. Midline crossing is regulated by attractant and repellent molecules secreted by the floor plate. Questions remain, however, regarding commissure formation in the presence of opposing ventral midline signals. Studies from invertebrates suggest that midline crossing is facilitated by interactions at the midline between homologous axons of specific decussating neurons, but such evidence is lacking in vertebrate systems. Thus, experiments were devised to determine whether commissural axons of the mouse caudal hindbrain interact with their contralateral counterparts at the ventral midline; and then whether these reciprocal interactions play a mechanistic role in midline crossing. Labeling with lipophilic tracers both sides of the caudal hindbrain revealed interactions between growth cones of contralateral decussating axons at the midline that frequently persisted even after they had crossed. A solid mechanical barrier placed unilaterally in the hindbrain, dramatically decreased the growth of axons onto the floor plate and midline crossing of the equivalent population from the contralateral side. Decussation was also blocked by a unilateral barrier, permeable to diffusible molecules, but not by an axon-permeable barrier. Interestingly, axons extended into the midline in the presence of the diffusion-permeable barrier, but could not exit the midline and grew to the contralateral side. These results suggest that midline crossing is facilitated both, by diffusible molecules that allow the growth cone overcome repellent signals, and by interactions between decussating contralateral axon partners that consolidate the decussation. These findings expand our understanding of the mechanisms vertebrate axons use to efficiently navigate through the complex midline environment in order to cross to the contralateral side of the brain.

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. Clasificación de las moléculas involucradas en la guía axonal	26
FIGURA 2. Modelos de estudio de la formación de comisuras en vertebrados y <i>D. melanogaster</i>	48
FIGURA 3. Resumen de las principales moléculas involucradas en la guía axonal en la línea media con base en hallazgos obtenidos en diferentes modelos de vertebrados	58
FIGURA 4. Estrategia experimental	61
FIGURA 5. Algunas poblaciones de axones del rombencéfalo caudal comienzan a cruzar la línea media a los 10.5 días de gestación en ratón e interaccionan con sus homólogos contralaterales mientras cruzan	73
FIGURA 6. La trayectoria de los axones decusantes del rombencéfalo caudal parece seguir la de sus contrapartes contralaterales al cruzar la línea media en ratón E10	75
FIGURA 7. El cruce de la línea media de una población de axones decusantes del rombencéfalo caudal marcados con Dil es bloqueado por una barrera mecánica unilateral contralateral a la misma	80
FIGURA 8. Los axones decusantes del rombencéfalo se detienen y proyectan de forma aberrante al alcanzar la línea media en lugar de cruzar en presencia de una barrera contralateral	81
FIGURA 9. La presencia de una barrera unilateral permeable a moléculas difusibles pequeñas bloquea también el cruce de la línea media de una población de neuronas decusantes del rombencéfalo caudal marcadas con Dil	86
FIGURA 10. Comparación entre el comportamiento de los axones en cultivos sin barrera o en presencia de una barrera contralateral sólida o semi-permeable	87
FIGURA 11. Localización y desarrollo ontogenético de una subpoblación de neuronas decusantes positivas a calbindina	91

- FIGURA 12.** Una barrera sólida unilateral bloquea tanto la proyección lateral como contralateral de un subgrupo de neuronas decusantes del rombencéfalo caudal positivo a calbindina **92**
- FIGURA 13.** La expresión de moléculas guía en la línea media del rombencéfalo se conserva después de 2.5 DIV con y sin barrera **93**
- FIGURA 14.** Los axones decusantes del rombencéfalo caudal de ratón E10.5 expresan algunas CAMs y receptores a moléculas guía durante el cruce de la línea media **96**
- FIGURA 15.** Modelo de los mecanismos que controlan el cruce de la línea media ventral de los axones decusantes del rombencéfalo caudal, basado en los hallazgos experimentales obtenidos en el presente trabajo **108**

Abreviaturas

aa	aminoácidos
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ANOVA	Análisis de varianza
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
BCIP	5-Bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato
CAMs	Moléculas de adhesión celular (Cell Adhesion Molecules)
CB	Calbindina
CGR	Células del ganglio de la retina
CPO	Comisura post-óptica
DAB	Diaminobenzidina
DCC	Suprimido en cáncer colorectal (Deleted in Colorectal Cancer)
DIC	Contraste de interferencia diferencial (Differential Interference Contrast)
DIG	Digoxigenina
DIG-UTP	Uracilo trifosfato acoplado a digoxigenina
Dil	Perclorato de 1,1'-dioctadecil-3,3',3' tetrametilindocarbocianina
DiO	Perclorato de 3,3'-dioctadeciloxacarbocianina
DIV	Días <i>in vitro</i>
E	Días embrionarios en ratón
FLM	Fascículo longitudinal medial
FN	Fibronectina
GPI	Glicosilfosfatidilinositol
GRD	Ganglio de la raíz dorsal
Ig	Inmunoglobulina
IgGs	Inmunoglobulinas G
MEC	Matriz extracelular
NBT	4-Nitro cloruro de tetrazolium azul
NCAM	Molécula de adhesión celular neural (Neural Cell Adhesion Molecule)

NCE	Núcleo cuneatus externo
NGF	Factor de crecimiento neuronal (Nerve Growth Factor)
NLR	Núcleo reticular lateral
Npn	Neuropilina
NrCAM	Relacionado a NCAM
PBS	Solución salina amortiguada por fosfatos
PBT	PBS con 0.1% de Tween-20
PFA	Paraformaldehído
r	Rombómera
Robo	Roundabout
SD	Desviación estándar
Sema	Semaforina
SFBI	Suero fetal de bovino inactivado
SNC	Sistema Nervioso Central
TA	Temperatura ambiente
TCPO	Tracto de la comisura post-óptica

INTRODUCCIÓN

El Sistema Nervioso de los animales es una compleja red de neuronas que se comunican entre sí para controlar las diversas funciones del organismo. En organismos con simetría bilateral, la comunicación y coordinación entre ambos lados del cerebro es posible gracias a que a todos sus niveles axiales existen numerosos axones que cruzan hacia el lado contralateral del mismo. Muchas de las áreas de cada hemisferio cerebral modulan la actividad del área opuesta o contralateral del cuerpo por medio de vías descendentes que eventualmente decusan y alcanzan partes del sistema motor en el lado opuesto del SNC. Más aún, las diferentes áreas en la corteza cerebral de un hemisferio se conectan con las equivalentes, o con áreas relacionadas en el hemisferio opuesto por medio de grandes haces de axones conocidos como comisuras. Por otro lado, aquellos haces de axones (tractos o vías) que conectan estructuras diferentes de ambos lados del cerebro se conocen como decusaciones (Squire et al., 2003). En la literatura científica actual, no obstante, el término comisura se utiliza indistintamente para todos aquellos haces de axones que cruzan de un lado a otro del SNC, independientemente del destino final de los axones decusantes. Por esta razón, a lo largo del presente documento se hará referencia a los axones que cruzan la línea media en el tallo cerebral y médula espinal como axones comisurales o decusantes de manera indistinta.

En los vertebrados superiores, la comunicación entre ambos hemisferios cerebrales se lleva a cabo principalmente por el cuerpo calloso, que es una placa amplia y gruesa de densas fibras nerviosas que interconectan de forma

recíproca extensas regiones de la corteza de todos los lóbulos con las regiones correspondientes del hemisferio opuesto. Otras comisuras cerebrales importantes son la comisura anterior que conecta el bulbo olfatorio, el núcleo amigdaloides y regiones corticales del lóbulo temporal, y la comisura del hipocampo que conecta regiones correspondientes de las dos formaciones del hipocampo y algunas conexiones heterotópicas como aquellas entre el área entorrinal y el hipocampo contralateral. La comisurotomía, que consiste en cortar la comisura anterior, la del hipocampo y el cuerpo calloso, se utiliza como tratamiento en casos severos de epilepsia. Aunque los pacientes no parecen tener alteraciones importantes, esto ha llevado a descubrir que cada hemisferio está especializado en actividades cerebrales específicas por lo que se requiere de la coordinación de ambos para responder en forma adecuada a los estímulos.

A nivel del tallo cerebral y la médula espinal existe también un número importante de decusaciones en la línea media ventral. En el sistema vestibular las decusaciones se forman principalmente en los núcleos vestibulares medio y superior que controlan reflejos motores relacionados con postura, equilibrio, movimiento ocular y tono muscular. A nivel de médula espinal destacan las decusaciones de los tractos espino-talámico, espino-tectal y espino-reticular, que en conjunto forman el sistema anterolateral. Éstos coordinan actividades sensoriales y funciones motoras de reflejo, temperatura, dolor y tacto. En algunas lesiones de la médula espinal en seres humanos, los pacientes presentan una sensibilidad táctil muy deteriorada y disminución del tono muscular en el lado de la lesión, pero también presentan pérdida de la sensibilidad dolorosa y térmica en el lado contralateral a la lesión.

La conformación especializada de los diferentes tractos axonales que constituyen el Sistema Nervioso de un organismo es posible, gracias a que existen mecanismos muy precisos durante el desarrollo embrionario que guían el crecimiento axonal de los diferentes grupos neuronales hasta encontrar su blanco final. En el presente trabajo se expondrán algunos de los principales mecanismos y moléculas involucrados en este proceso, con especial énfasis en la formación de comisuras.

ANTECEDENTES

1. Mecanismos celulares y moleculares de la guía axonal en el desarrollo

A finales del siglo pasado, mientras Santiago Ramón y Cajal examinaba preparaciones fijadas de tejido embrionario teñidas con plata, observó que en el extremo terminal de un axón en crecimiento había una región especializada en donde debía ocurrir la elongación del axón, a la cual llamó cono de crecimiento (Ramón y Cajal, 1909). El avance en las técnicas de cultivo de tejido embrionario permitió poco después observar los conos de crecimiento en células vivas (Harrison, 1910) y unos años más tarde, en colas de renacuajos vivos (Speidel, 1941). No obstante, en la década de 1940 las ideas acerca de la existencia de un mecanismo que guiaba del crecimiento axonal pasaron de moda, en gran parte debido al trabajo de Weiss, quien favorecía la hipótesis (conocida como “hipótesis de resonancia”) de que la especificidad de las conexiones no se debía a una migración dirigida de los axones sino a la retención selectiva de conexiones formadas inicialmente al azar (Weiss, 1941). No fue sino hasta 1963 que Sperry, uno de los estudiantes de Weiss, al observar la precisión de las conexiones retino-tectales de pollo, formuló muchos de los principios que actualmente rigen nuestro conocimiento acerca de la guía axonal y reconocimiento de un blanco específico en su “hipótesis de quimioafinidad”. Esta hipótesis sugería la existencia de marcadores de superficie específicos que eran utilizados por los conos de crecimiento tanto para la guía como para el reconocimiento de blancos (Sperry, 1963). No obstante, las ideas de Sperry

permanecieron controversiales durante la década de 1970. Por tanto, no fue sino hasta la década de 1980 que la mayor parte de nuestras ideas actuales respecto a este tópico de la Neurobiología emergió y se arraigó en el conocimiento general (revisado en, Goodman y Tessier-Lavigne, 1997).

El cono de crecimiento neuronal es una región especializada en el extremo terminal de axones y dendritas en crecimiento en donde se incorpora constantemente material proveniente del cuerpo celular. Esta estructura dirige el crecimiento axonal, recorriendo grandes distancias a través de vías específicas hasta encontrar y reconocer un blanco apropiado. En un organismo vivo, el cono de crecimiento suele viajar más rápido y en línea recta en algunos segmentos de su trayectoria, pero tiende a viajar más lento en sitios donde ocurren cambios en la dirección del crecimiento. En estos sitios, el cono de crecimiento es usualmente más grande y presenta una morfología más complicada (Tosney y Landmesser, 1985). Conforme avanza, la región posterior al cono de crecimiento se diferencia rápidamente en axón. El crecimiento culmina cuando se encuentra el sitio apropiado para la formación de una sinapsis.

Por medio de microscopía electrónica se ha observado que el cono de crecimiento contiene mitocondrias, numerosas vesículas, microfilamentos y un racimo central de microtúbulos. En sus márgenes proyectan amplias extensiones conocidas como velos y procesos finos llamados filopodios, ambos formados por microfilamentos de actina. El movimiento de los filamentos de actina y, por tanto, la forma del cono de crecimiento son controlados a su vez por fibras de miosina-

2. La dinámica intracelular del citoesqueleto permite al cono de crecimiento estar en constante estado de “prueba y toma de decisión”.

Pero el cono de crecimiento es capaz no sólo de extender axones sino también de responder a señales locales que dirigen su crecimiento o lo detienen por completo. Experimentos desarrollados en los últimos 30 años han comprobado la teoría de Sperry, mostrando que el patrón ordenado de conexiones neuronales que caracteriza a un sistema nervioso maduro es posible gracias a que las neuronas tienen identidades expresadas como “etiquetas moleculares”, es decir, receptores específicos presentes en su superficie membranal, lo cual permite al cono de crecimiento detectar y responder a una variedad de moléculas guía que se encuentran en el ambiente tisular en el que se desarrolla su crecimiento, ya sea en forma de atracción o repulsión.

Los primeros experimentos *in vitro* en los años 1970 mostraron que la extensión del cono de crecimiento requería de un substrato físico permisivo (Wessells y Nuttall, 1978; Bray, 1979) y que incluso era capaz de mostrar preferencia por ciertos substratos sobre otros, lo que correlacionaba con una mayor adhesividad al substrato (Letourneau, 1975). No obstante, estos experimentos se llevaron a cabo en substratos no fisiológicos. Al usar moléculas que podían estar presentes en substratos fisiológicos se demostró que la preferencia no necesariamente correlacionaba con la adhesividad al substrato (Gundersen, 1987; Lemmon et al., 1992), sugiriendo que la selección específica de un substrato fisiológico implicaba que el cono de crecimiento era capaz de “reconocer” las moléculas.

En la década de 1980 se empezó a tener evidencia que proponía la existencia de señales negativas que guiaban el crecimiento axonal (Kapfhammer et al., 1986; Walter et al., 1987b; Caroni y Schwab, 1988). Un ejemplo de la existencia de repulsión por contacto surgió al observar que los axones de dos tipos neuronales diferentes (neuronas simpáticas y células del ganglio de la retina), fasciculaban selectivamente con células de su propia clase en cultivo (Bray et al., 1980). Al examinar estos cultivos en fotografías en lapsos de tiempo se descubrió, sin embargo, que esto se debía a que los axones evitaban selectivamente los axones de la otra clase, ya que los conos de crecimiento se colapsaban al contacto con el axón inhibitorio (Kapfhammer et al., 1986). El desarrollo del ensayo de colapso del cono de crecimiento (Kapfhammer y Raper, 1987), así como del ensayo de “tiras” en el cual los conos de crecimiento son expuestos a tiras paralelas de diferentes substratos (Walter et al., 1987a), en conjunto con análisis en lapsos de tiempo de la interacción de conos de crecimiento con otras células, llevaron a descubrir una gran variedad de ejemplos de repulsión por contacto así como de señales inhibitorias en la guía axonal (Luo y Raper, 1994; Tessier-Lavigne, 1994; Keynes y Cook, 1995; Goodman, 1996; Kolodkin, 1996). Las señales repelentes tendrían la función de ayudar a mantener algunos axones agrupados en corredores, como en el caso del crecimiento de los axones motores que proyectan sólo en la porción anterior del esclerotomo debido, en parte, a que responden a una fuerte señal repelente del esclerotomo posterior (Keynes y Stern, 1984; Oakley y Tosney, 1993). Así mismo, las señales repelentes locales pueden constituir barreras para impedir el crecimiento de los axones hacia ciertas regiones. Un ejemplo de esto son los

axones del quiasma óptico que permanecen del lado ipsilateral, al parecer en respuesta a una señal inhibitoria local en el quiasma óptico, que repele selectivamente estos axones sin afectar a los de proyección contralateral (Godement et al., 1990; Sretavan, 1990; Wizenmann et al., 1993; Godement et al., 1994).

En años recientes se ha acumulado evidencia de que los axones pueden ser guiados también por señales difusibles o de largo alcance. Santiago Ramón y Cajal propuso hace más de un siglo que la guía axonal debía ser mediada por quimioatracción de largo alcance, en la cual las células blanco serían las encargadas de secretar sustancias difusibles que atraerían a los axones a distancia (Ramón y Cajal, 1892). En 1979, Gundersen y Barrett mostraron que los conos de crecimiento de neuronas sensoriales en regeneración podían virar *in vitro* en respuesta a un gradiente difusible del factor de crecimiento neuronal (NGF) (Gundersen y Barrett, 1979). Aunque el NGF no es propiamente un quimioatrayente, este estudio sentó las bases para continuar la búsqueda de moléculas de atracción a distancia. Con el desarrollo de las técnicas de cultivo celular, se observó que al co-cultivar a las neuronas con células blanco, los conos de crecimiento tendían a virar hacia esas células, sugiriendo la existencia de señales quimioatrayentes secretadas por blancos intermedios o finales. De este modo, se observó que los axones sensoriales del ganglio trigémino eran atraídos por una molécula secretada por su blanco final en el epitelio del proceso maxilar (Lumsden y Davies, 1983). Así mismo, se mostró que en el SNC los axones comisurales eran atraídos por uno de sus blancos intermedios, la placa

del piso, tanto en la médula espinal (Tessier-Lavigne et al., 1988; Placzek et al., 1990) como en el tallo cerebral (Shirasaki et al., 1995; Tamada et al., 1995). Además de estos experimentos, la ablación de células blanco *in vivo* causaba errores en la proyección axonal, lo cual proveía más evidencia de la existencia de atracción por el blanco, como en el caso de axones motores que inervan blancos somáticos (Tosney, 1987; Tessier-Lavigne, 1992).

Más recientemente se encontró que los conos de crecimiento podían también ser repelidos por factores difusibles secretados a distancia, proceso conocido como quimiorepulsión. La primera evidencia se obtuvo al observar que algunos axones evitaban crecer hacia ciertos tejidos cuando eran co-cultivados con éstos. Este es el caso, por ejemplo, de los axones del tracto olfatorio que son repelidos por células en el septum (Pini, 1993); así mismo, diferentes clases de axones motores y otros axones de la placa basal son repelidos por células de la placa del piso (Colamarino y Tessier-Lavigne, 1995a; Guthrie y Pini, 1995; Tamada et al., 1995; Shirasaki et al., 1996).

Cabe señalar que los axones son guiados por varias de estas señales a la vez. Por ejemplo, un axón puede recibir un “empujón por detrás” por parte de una señal quimiorepelente y ser simultáneamente atraído desde lejos por una señal atrayente. En otro caso, un grupo de axones puede ser dirigido a través de un corredor marcado por un factor atrayente en el substrato y al mismo tiempo éstos pueden mantenerse agrupados por un factor repulsivo local.

El estudio de las complicadas trayectorias axonales se ha enfocado, no obstante, a determinar la respuesta del cono de crecimiento a segmentos

parciales de su trayectoria, lo que se conoce como “blancos intermedios” o “puntos de decisión”, en los cuales otras células proveen señales críticas que dirigen al cono de crecimiento hacia el siguiente paso. Cuando el cono de crecimiento entra en contacto o viaja cerca de un blanco intermedio, se observan cambios abruptos en su morfología y en la dirección del crecimiento axonal (Tessier-Lavigne y Goodman, 1996). La primera indicación de que los axones podían ser influenciados por células o grupos celulares específicos localizados en sitios particulares a lo largo de su trayectoria provino de los estudios de Bate, quien observó que los conos de crecimiento pioneros en el saltamontes migraban a lo largo de una vía marcada por células que presentaban una morfología especializada (Bate, 1976). Otro ejemplo de un “punto de decisión” son las células que forman la línea media del sistema nervioso de vertebrados e invertebrados, la cual constituye un blanco intermedio para los axones comisurales cuya tarea es cruzar de un lado a otro del sistema nervioso. La línea media secreta moléculas tanto atrayentes como repelentes que controlan el cruce axonal, lo cual se explicará en detalle más adelante. En resumen, las rutas de crecimiento axonal pueden estar determinadas por otras células (entre ellas otras neuronas) o por moléculas específicas que se encuentran a lo largo de su trayectoria hacia el blanco final. Algunos de los principales mecanismos implicados en este proceso se explican a continuación.

1.1. Moléculas involucradas en la guía axonal

Como se mencionó anteriormente, las células del sistema nervioso en desarrollo producen una serie de moléculas que al ser detectadas por el cono de crecimiento tienen la capacidad de atraer o repeler su proyección, guiando de este modo su crecimiento. Estas moléculas pueden ser presentadas en la superficie membranal de la célula que las produce, o ser secretadas al medio extracelular donde permanecerán ancladas a la matriz extracelular formando gradientes. La respuesta de atracción o repulsión a estas moléculas dependerá, no obstante, de los receptores presentes en el cono de crecimiento y de las señales intracelulares que dichos receptores transducen en el interior de la neurona (Tessier-Lavigne y Goodman, 1996).

Inicialmente se pensaba que las señales en el medio extracelular podían clasificarse en 3 categorías principales: (1) factores difusibles que tienen una función quimiotrópica de largo alcance, (2) moléculas de adhesión de la MEC que funcionan en la adhesión célula-MEC y como guías locales y (3) moléculas de superficie celular que participan en la adhesión célula-célula y por tanto, también en la guía local. Dentro de estas categorías, se pensaba que algunas moléculas podían actuar como atrayentes y otras como repelentes.

Sin embargo, al incrementarse el conocimiento de las señales que guían el crecimiento axonal, esa clasificación desapareció. Por ejemplo, en la familia de semaforinas (que se describirá más adelante), existen miembros tanto difusibles como de superficie celular que pueden actuar tanto por contacto como a distancia. En otro ejemplo, las netrinas, una familia de moléculas difusibles,

está muy relacionada estructuralmente a las lamininas, uno de los principales componentes de la MEC cerebral. Por otro lado, hay un gran número de ejemplos en que la misma molécula puede tener un efecto atrayente en algunos casos pero repelente en otros (Figura 1).

La búsqueda de moléculas involucradas en la guía axonal se ha llevado a cabo en diferentes modelos desde invertebrados como *C. elegans* y *D. melanogaster* hasta vertebrados como rana, pollo, pez y ratón, entre otros. Se ha descubierto que tanto moléculas como mecanismos de acción están altamente conservados entre especies, lo cual ha permitido simplificar el conocimiento en este tópico. A continuación se presentan generalidades de algunas de las moléculas más estudiadas y ejemplos de experimentos desarrollados para dilucidar su papel en el desarrollo del sistema nervioso.

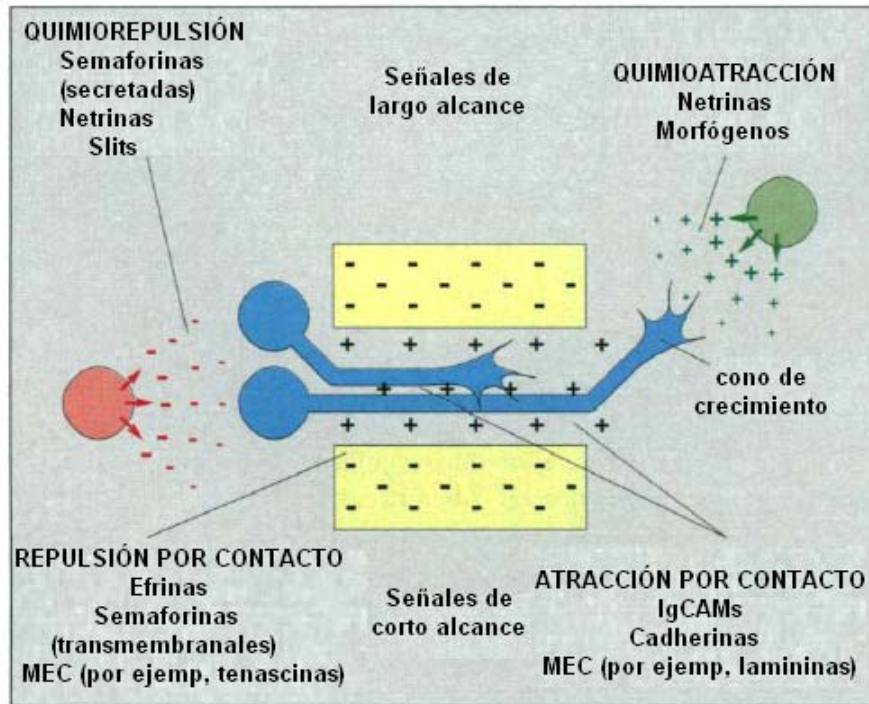


FIGURA 1. Clasificación de las moléculas involucradas en la guía axonal. La guía de conos de crecimiento neuronal está mediada por cuatro tipos de mecanismos principales: atracción por contacto, repulsión por contacto, quimioatracción y quimiorepulsión. El término atracción se refiere a un rango de efectos permisivos y atrayentes, mientras que el término repulsión se refiere a un rango de efectos inhibitorios y repelentes. No obstante, algunas moléculas más que atrayentes o repelentes son bifuncionales y algunas familias de moléculas guía tienen miembros tanto difusibles como no difusibles. Se presentan ejemplos de ligandos implicados en mediar cada uno de estos mecanismos. El cono de crecimiento puede ser “empujado por detrás” por una señal repelente (rojo) mientras es “jalado hacia delante” por una señal atrayente (verde). Así mismo, puede fascicular con otro axón que provee una señal permisiva por contacto (azul) mientras es “rodeado” por señales no permisivas locales (amarillo). Adaptado de: Tessier-Lavigne y Goodman, 1996.

Moléculas de Adhesión Celular (CAMs). La búsqueda de proteínas de superficie celular que mediaran la adhesión celular diferencial llevaron en la década de 1980 a identificar dos familias principales de CAMs: la superfamilia de inmunoglobulinas (rev. en, Edelman, 1993; Rutishauser, 1993), y la superfamilia de cadherinas (rev. en, Takeichi, 1995), las cuales comprenden tanto proteínas transmembranales como ancladas a membrana a través de lípidos. Los primeros miembros de estas dos familias identificados en el sistema nervioso fueron NCAM (Cunningham et al., 1987) y N-cadherina (Hatta et al., 1988).

Existe una baja similitud en secuencia de aminoácidos entre estas familias. Las porciones extracelulares de las cadherinas comprenden arreglos en tandem de los llamados dominios-cadherina, mientras que la superfamilia Ig presenta arreglos en tandem de dominios Ig, así como de fibronectina tipo III (FNIII). La superfamilia Ig se divide en subfamilias definidas por el número de dominios Ig y FNIII que poseen (rev. en, Brummendorf y Rathjen, 1995). Además, la adhesión mediada por cadherinas es dependiente de calcio pero no así la mediada por IgCAMs. No obstante, la topología de los dominios cadherina, Ig y FNIII es similar, lo cual sugiere que un proceso de selección por convergencia definió una topología favorable para ambas familias (Shapiro et al., 1995). Estos dominios son determinantes en la adhesión tanto homofílica como heterofílica y están involucrados en la fasciculación axonal, así como en la adhesión de los axones a substratos o células blanco. Algunos ejemplos de interacciones heterofílicas entre IgCAMs son la interacción de TAG-1 en mamíferos (o su homólogo axonina-1 en pollo) con miembros de la subfamilia L1 (L1, NgCAM, NrCAM) así como con integrinas- β 1 (Kuhn et al., 1991; Rader et

al., 1993; Felsenfeld et al., 1994; Suter et al., 1995); L1 también se une a integrinas (Montgomery et al., 1996). NCAM, L1 y N-cadherina desempeñan el papel tanto de ligando como de receptor para estimular la extensión de axones *in vitro* por medio de interacciones homofílicas (Doherty y Walsh, 1994). TAG1 y NrCAM, por otro lado, participan en la migración celular y crecimiento axonal del sistema nervioso en desarrollo a través de interacciones homofílicas o heterofílicas entre sí y con otras CAMs (rev. en, Chiba y Keshishian, 1996). También se han reportado interacciones heterofílicas entre miembros de la superfamilia de cadherinas (Murphy-Erdosh et al., 1995). Otras CAMs expresadas en el sistema nervioso son la familia de repetidos ricos en leucina (Krantz y Zipursky, 1990; Nose et al., 1992) y la familia de fasciclina I (Zinn et al., 1988; Elkins et al., 1990; Takeshita et al., 1993), las cuales parecen estar altamente conservadas entre invertebrados y vertebrados (Grenningloh et al., 1990; Oda et al., 1994).

Las CAMs son mediadoras de la adhesión célula-célula *in vitro* así como de la fasciculación *in vivo*. Algunas CAMs también participan en la adhesión al substrato por medio de interacciones con proteínas de la MEC, por ejemplo, miembros de la subfamilia F11 se unen a tenascina (Brummendorf et al., 1993; Morales et al., 1993) y un miembro de la subfamilia de L1 (NgCAM) se une a laminina (Grumet et al., 1993).

Un ejemplo de la participación de las CAMs en fasciculación *in vivo* es el fenotipo del mutante de pérdida de función de Fasciclina II (IgCAM de insectos relacionada a NCAM), en el cual los axones que normalmente fasciculan en tres

vías longitudinales dejan de fascicular, mientras que la sobre-expresión de Fasciclina II provoca que axones que deberían permanecer separados fasciculen entre sí (Lin et al., 1994). Por otro lado, estudios en pollo han involucrado al ácido polisiálico (PSA), carbohidrato que se une covalentemente a NCAM, como un importante modulador de la defasciculación axonal. Los axones motores que salen del SNC se encuentran altamente fasciculados hasta la base de la extremidad en donde comienzan a defascicular para tomar diferentes trayectorias. La remoción enzimática del PSA afecta la defasciculación e incrementa los errores de proyección (Tang et al., 1992; Tang et al., 1994).

A su vez, axonina-1 parece tener un papel relevante en la guía de los axones comisurales de la médula espinal, ya que al afectar su función *in vivo* e *in vitro*, los axones comisurales toman rutas erróneas (Stoeckli y Landmesser, 1995; Stoeckli et al., 1997). Además, TAG-1 participa en la migración de interneuronas GABAérgicas de la corteza cerebral (Denaxa et al., 2001) y en la médula caudal dirige la migración tangencial de células que se originan en el labio rómbico y migran ventralmente hasta cruzar la línea media para dar lugar, en el lado contralateral, a los núcleos reticular lateral (NLR) y cuneatus externo (NCE) (Kyriakopoulou et al., 2002). En ambos casos, la migración celular es perturbada al bloquear la función de TAG-1. Otros ensayos funcionales *in vitro* han implicado a TAG-1 como un potente substrato neuritogénico para neuronas del GRD y como un fuerte mediador de la adhesión celular (Furley et al., 1990; Stoeckli et al., 1991; Pavlou et al., 2002), procesos que podrían a su vez estar implicados en la migración celular o extensión de neuritas.

Efrinas/Eph. Las Efrinas se dividen en familias A y B, las Efrinas A se anclan a la membrana celular a través de un grupo GPI mientras que las Efrinas B poseen un dominio transmembranal y un dominio citoplásmico de alrededor de 100 residuos aminoácidos (Frisen y Barbacid, 1997). Así mismo, las proteínas EphA y EphB son receptores tirosina cinasa, nombrados en base a su unión preferencial a las familias de Efrinas A y B respectivamente (Pasquale, 2005). Los receptores Eph se caracterizan por poseer en la región extracelular un dominio "Ig-like" (de baja homología con dominios Ig), una región rica en cisteínas altamente conservada y dos repetidos FNIII. En la región intracelular presentan sólo un dominio catalítico tirosina cinasa (Tuzi y Gullick, 1994; Pandey et al., 1995; Gale y Yancopoulos, 1997). En general, las Efrinas se han clasificado como factores repelentes por contacto para axones de la retina, axones motores, neuronas de la corteza cerebral y células de la cresta neural (rev. en, Drescher, 1997).

Los gradientes de Efrina A y EphA determinan el mapa topográfico a lo largo del eje anteroposterior del tectum. Desde tiempos de Sperry se sabía que en el tectum existe una representación topográfica de la retina, lo que transforma el campo visual en un campo neural definido. En términos neuronales, esto implica que las células del ganglio de la retina (CGR) nasal forman sinapsis con el tectum posterior, mientras que las CGR temporal terminan en el tectum anterior. Dicha especificidad fue demostrada por medio del ensayo de tiras, ya que las células de la retina colapsaban en presencia de membranas derivadas

de la mitad errónea de tectum (Walter et al., 1987a). Más tarde se encontró que Efrina A5 y Efrina A2 se expresan en un gradiente anteroposterior creciente a lo largo del tectum (Monschau et al., 1997). La expresión ectópica de Efrina A2 provoca que los axones temporales eviten esa área (Nakamoto et al., 1996), mientras que en el ratón knock-out para Efrina A5 los axones temporales se extienden hasta regiones posteriores (Frisen et al., 1998).

Los gradientes de Efrina B y EphB, por otro lado, controlan patrones de proyección dorsoventral, logrando actuar incluso como quimioatrayentes (Hindges et al., 2002; Mann et al., 2002). El ratón nulo de EphB2 presenta una comisura anterior disminuida; sin embargo, este tracto es normal en el ratón en que se ha reemplazado el dominio de cinasa de EphB por β -galactosidasa, lo que sugiere que no se requiere la vía de señalización intracelular del receptor para la guía de este tracto. Los axones de la comisura anterior expresan grandes niveles de Efrina B1, mientras que los receptores EphB se encuentran a lo largo de la vía de proyección de dichos axones, lo que sugiere que en este caso las moléculas de Efrina funcionan como receptores (Henkemeyer et al., 1996). Así mismo, se descubrió que tras la unión con EphB2, el dominio intracelular de Efrina B es fosforilado en residuos tirosina, permitiendo la señalización bi-direccional (Gale et al., 1996; Holland et al., 1996; Bruckner et al., 1997). Esto implica que los conos de crecimiento, más que responder pasivamente, pueden influir en su ambiente. Las Efrinas A pueden también señalar “en reversa” (Rashid et al., 2005) a pesar de que carecen de dominio intracelular. La explicación más plausible a este hecho es que interaccionan en

cis con algún otro receptor que es el que transduce la señal (Davy y Robbins, 2000; Huai y Drescher, 2001).

Semaforinas. Las semaforinas son una familia grande de proteínas de señalización, tanto secretadas como unidas a membrana, definidas por la presencia del dominio Sema de alrededor de 420 aa (Raper, 2000). Se dividen en ocho clases de las cuales las mas estudiadas en términos de guía axonal son las Semaforinas clase 3 (Sema3A-3G). Fueron identificadas inicialmente al buscar moléculas que se expresaran en fascículos específicos del SNC de saltamontes (Kolodkin et al., 1992) y posteriormente como un grupo de moléculas con propiedades para colapsar conos de crecimiento, por lo que los ortólogos en pollo fueron llamados inicialmente colapsinas (Luo et al., 1993; Luo et al., 1995). La actividad repelente de las Semaforinas actúa en una variedad de grupos neuronales *in vitro*, incluyendo neuronas motoras, sensoriales, olfatorias y del hipocampo (Luo et al., 1995; Messersmith et al., 1995; Kobayashi et al., 1997; Koppel et al., 1997; Varela-Echavarría et al., 1997; Chedotal et al., 1998). Los primeros receptores identificados para las Semaforinas clase 3 fueron las Neuropilinas, Npn1 y Npn2. La proteína transmembranal Npn1 forma un homodímero para la unión de Sema 3A (He y Tessier-Lavigne, 1997; Kolodkin et al., 1997). Homodímeros de Npn2 a su vez, unen Sema3F mientras que ambos se combinan en un heterodímero para unir Sema3C (Chen et al., 1997; Chen et al., 1998; Giger et al., 1998). Los ratones que carecen de Npn1 presentan un fenotipo muy similar a los que carecen de Sema3A, esto es, una

marcada defasciculación y proyecciones aberrantes de nervios sensoriales y algunos nervios motores craneales (Kitsukawa et al., 1997; Taniguchi et al., 1997). Así mismo, los ratones *knock-out* para Npn2 o Sema3F presentan defectos en nervios troclear, oculomotor, trigémino y facial (Luo et al., 1993; Chen et al., 2000; Giger et al., 2000; Sahay et al., 2003). La afinidad de Semaforinas individuales por las dos Neuropilinas es variable, presentándose casos de promiscuidad y competitividad en la unión, aunque no se conocen claramente las preferencias por receptor de los siete ligandos (Takahashi et al., 1998; Nakamura et al., 2000).

En *Drosophila* se encontró otro receptor para Semaforinas, las Plexinas (Winberg et al., 1998) y se han descubierto más de diez Plexinas en vertebrados, agrupadas en cuatro familias (Tamagnone et al., 1999; Fujisawa, 2004). Estas no se unen a Semaforinas clase 3 pero interaccionan con Semaforinas clase 4 transmembranales y con Semaforinas clase 7 de unión por dominio GPI. Estas dos clases, por su parte, no se unen a Neuropilinas. No obstante, el dominio extracelular de Plexinas contiene una región de homología "Sema" que le permite asociarse con Neuropilinas para formar un complejo receptor funcional (Takahashi et al., 1999; Tamagnone et al., 1999; Rohm et al., 2000). Esto amplía potencialmente la afinidad por Semaforinas y las respuestas subsecuentes.

Por último, la CAM L1 es capaz también de formar un complejo estable con Npn1 (Castellani et al., 2000). La proteína soluble L1 bloquea el efecto colapsante de Sema3A, pero no de Sema3B en neuronas corticales o del

ganglio de la raíz dorsal (GRD), llegando incluso a provocar quimioatracción. Las neuronas de un ratón deficiente en L1 no responden al efecto atrayente o repelente de Sema3A. L1 parece ser un factor clave para la transducción de la señal y para determinar la naturaleza de la respuesta (Castellani et al., 2000). NrCAM, otro miembro de la familia de L1, forma a su vez un complejo con Npn2 para regular la respuesta a Sema3B y Sema3F (Falk et al., 2005).

Netrinas. Como se había mencionado anteriormente, las Netrinas de vertebrados se descubrieron al buscar la identidad de un factor quimioatrayente que emanaba de la placa del piso y era capaz de atraer axones comisurales (Tessier-Lavigne et al., 1988; Placzek et al., 1990). Las proteínas Netrina 1 y 2 se purificaron de extractos de cerebro de pollo y se transfectaron en células heterólogas con el fin de demostrar que tenían actividad quimioatrayente sobre axones en cultivo (Kennedy et al., 1994; Serafini et al., 1994).

Las Netrinas son proteínas difusibles de la familia de las lamininas que están altamente conservadas en insectos, nemátodos y vertebrados (Ishii et al., 1992; Serafini et al., 1994; Mitchell et al., 1996). En *C. elegans* se encontraron además dos proteínas, unc-5 y unc-40, que se requerían junto con unc-6 (homólogo de netrinas en *C. elegans*) para mediar la migración de axones a lo largo del eje dorsoventral (Hedgecock et al., 1990). DCC (Deleted in Colorectal Cancer), el homólogo de unc-40 en vertebrados, es el receptor que media el efecto atrayente de Netrina (Keino-Masu et al., 1996). No obstante, Netrina puede actuar también como repelente para neuronas trocleares motoras

(Colamarino y Tessier-Lavigne, 1995a) y otras neuronas motoras de proyección dorsal del rombencéfalo (Varela-Echavarría et al., 1997). Unc-5 y sus tres homólogos en mamíferos se requieren para el efecto repelente de Netrina (Hamelin et al., 1993; Ackerman et al., 1997; Leonardo et al., 1997). En las neuronas motoras de *Drosophila*, unc-5 es funcional solo (Keleman y Dickson, 2001), pero en el modelo de neuronas espinales de *Xenopus*, la repulsión mediada por Netrina requiere de la asociación de los dominios citoplásmicos de unc-5 y DCC (Hong et al., 1999). Esta asociación no ha sido demostrada en otros modelos de vertebrados.

Slit/Robo. Las proteínas Slit fueron identificadas inicialmente en la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster*. En embriones de esta especie, la proteína Slit, que es una proteína de matriz extracelular, se expresa en la glía de la línea media ventral y fue identificada porque las mutantes presentan un fenotipo de “colapso” en el cual los axones permanecen en la línea media formando un gran fascículo en lugar de cruzar (Rothberg et al., 1990). Roundabout (Robo), identificado también inicialmente en *D. melanogaster*, es el receptor que transduce la señal repelente de Slit. En las mutantes de Robo y de Sax-3 (homólogo de Robo en *Caenorhabditis elegans*) los axones longitudinales y comisurales cruzan en varias ocasiones la línea media ventral formando círculos (Seeger et al., 1993; Zallen et al., 1998).

A la fecha se han identificado tres homólogos de Robo en mamíferos: Robo1, Robo2 y Rig1 y tres homólogos de Slit: Slit1, Slit2 y Slit 3 (Holmes et al.,

1998; Itoh et al., 1998; Kidd et al., 1998a; Brose et al., 1999; Yuan et al., 1999a; Yuan et al., 1999b). Los RNAm de cada una de las proteínas Slit se expresan en la línea media y en otras regiones particulares del SNC y su acción repelente se ha encontrado conservada en vertebrados (Brose et al., 1999; Li et al., 1999; Nguyen Ba-Charvet et al., 1999; Yuan et al., 1999b). En un estudio paralelo, por otro lado, Slit fue purificada como un factor que estimula la ramificación y elongación de axones sensoriales (Wang et al., 1999).

Slit2 puede repeler axones motores espinales y axones del hipocampo del giro dentado (Brose et al., 1999; Nguyen Ba-Charvet et al., 1999). Así mismo, tanto Slit1 como Slit2 repelen axones del bulbo olfatorio (Li et al., 1999; Nguyen Ba-Charvet et al., 1999) y controlan el cruce de los axones de la retina en la línea media del diencefalo a través del receptor Robo2, contribuyendo a definir el sitio donde se formará el quiasma óptico (Hutson y Chien, 2002; Plump et al., 2002). Los mutantes de ratón que carecen de Slit1 o de Slit2 presentan errores en la guía axonal de los tractos corticofugal, calloso y talamo-cortical, así como en el sistema visual (Bagri et al., 2002; Plump et al., 2002; Shu et al., 2003). Sin embargo, no hay defectos evidentes en la trayectoria axonal de las comisurales espinales en ninguno de estos mutantes ni en los dobles mutantes Slit1/2 (Plump et al., 2002). De hecho, en vertebrados superiores sólo se tenían evidencias *in vitro* de un efecto repelente de Slit2 sobre los axones comisurales una vez que éstos habían cruzado la placa del piso (Zou et al., 2000). Pero una vez que fue eliminada la expresión de las 3 formas de Slit en ratón, se observó que un número importante de axones comisurales eran incapaces de abandonar la línea media, mientras que otros cruzaban de forma reiterada, en analogía con

lo observado para las mutantes de Slit y Robo en *Drosophila*. Así mismo, en el ratón mutante para Robo1 los axones comisurales se encontraron detenidos en la placa del piso (Long et al., 2004).

Morfógenos. Aunque fueron caracterizados inicialmente con base a sus efectos en diferenciación celular y formación de patrones tempranos de desarrollo, se han encontrado recientemente implicados también en guía axonal. Las proteínas Wnt despertaron un especial interés dado que se expresan en gradientes anteroposterior y dorsoventral en el tubo neural, además de que han sido implicadas en sinaptogénesis (Hall et al., 2000; Ciani y Salinas, 2005). Evidencia obtenida tanto *in vitro* como por análisis de ratones knockout de Wnt sugieren que están involucradas en guiar a los axones comisurales espinales en dirección rostral una vez que han cruzado la línea media, actuando como quimioatrayentes a través del receptor Frizzled (Lyuksyutova et al., 2003).

En otros ejemplos, las proteínas BMP y Shh, implicadas en la especificación de neuronas de la médula espinal dorsal y ventral, respectivamente (Jessell, 2000), también contribuyen a la guía de las neuronas comisurales espinales en dirección dorso-ventral. BMP tiene un papel repelente para estas neuronas (Augsburger et al., 1999), mientras que Shh actúa en sinergia con Netrina-1 para atraerlos a la línea media ventral (Charron et al., 2003).

Como podrá notarse, la mayor parte de las moléculas guía identificadas a la fecha, desempeñan algún papel en el control del cruce de la línea media ventral de los axones comisurales, el cual es además uno de los modelos de guía axonal más estudiados tanto en vertebrados como en invertebrados. Más adelante se darán más detalles respecto al modo de acción de algunas de estas moléculas en este proceso.

1.2. Fasciculación axonal como mecanismo de guía

En esta sección se da una reseña de uno de los primeros mecanismos de guía propuestos, la fasciculación axonal. A pesar de que su importancia en la guía axonal ha sido demostrada en múltiples ejemplos como se verá más adelante, la búsqueda en años recientes de los mecanismos moleculares involucrados en la guía axonal, ha demeritado la atención al papel de la fasciculación en este proceso.

Para muchos axones, algunos segmentos de su trayectoria de crecimiento están definidos por tractos axonales pre-existentes (“pioneros”) a lo largo de los cuales migran. Este proceso es conocido como fasciculación y ha sido descrito en una amplia variedad de organismos desde insectos hasta mamíferos. En general, los axones que tienen funciones relacionadas suelen viajar en haces fasciculados, segregándose uno de otro al encontrar a su blanco apropiado. La regulación temporal y espacial de estos eventos de segregación

implica un balance entre señales de atracción y repulsión. Por un lado, la expresión de señales específicas en la membrana de los axones determina el grado de asociación entre ellos dentro de un fascículo. Pero ciertas señales neuronales incrementan también la fasciculación al inducir la repulsión entre estos axones y las señales que atraviesan en su camino (Ringstedt et al., 2000; Yu et al., 2000; Cloutier et al., 2002).

Aún cuando la fasciculación axonal es un evento frecuente durante el desarrollo del sistema nervioso, existe controversia acerca de si su papel es esencial para el correcto establecimiento de ciertos tractos axonales. No obstante, hay diferentes ejemplos en insectos en los cuales la ablación celular de una neurona específica impide la proyección axonal de otras células vecinas o las hace seguir rutas aberrantes (Gao y Macagno, 1988; Garriga et al., 1993; Wolszon et al., 1995; Gan y Macagno, 1997; Hidalgo y Brand, 1997).

En insectos fue donde se demostró inicialmente que los patrones de fasciculación son, en la mayoría de los casos, altamente selectivos. En el embrión de saltamontes, por citar un ejemplo, el cono de crecimiento de la neurona G entra en contacto con una variedad de tractos longitudinales después de que ha cruzado la línea media, pero crece sólo a lo largo del fascículo A/P (Raper et al., 1983a; b). Incluso presenta afinidad selectiva por los 3 axones P sobre los dos A que conforman dicho fascículo (Bastiani et al., 1984). La destrucción de las neuronas A no tiene efecto sobre el cono de crecimiento de G, pero la destrucción de las tres neuronas P, provoca su estancamiento en el punto de decisión (Raper et al., 1984). En otro ejemplo, (Bastiani et al., 1986) mostraron que los axones ascendentes pCC de saltamontes fasciculan con la

primera vía longitudinal que se forma en el embrión, los axones descendentes MP1/dMP2. Esta fasciculación es esencial para la correcta proyección de pCC, ya que la eliminación con láser de las neuronas MP1/dMP2 provoca que pCC se detenga o siga al axón de la neurona aCC, proyectando hacia la periferia de forma aberrante. Por último, en 1993 (Myers y Bastiani, 1993) reportaron un efecto similar para las neuronas comisurales pioneras Q1 de embriones de saltamontes. Estas neuronas proyectan inicialmente en sentido longitudinal y después cruzan la línea media en donde se encuentran y fasciculan con el axón de la neurona Q1 homóloga contralateral. Ellos observaron que al eliminar a una neurona Q1 de un lado del embrión con una descarga eléctrica, su homóloga contralateral tampoco proyectaba hacia la línea media.

La fasciculación de neuronas con sus homólogas puede, sin embargo, tener también un efecto inhibitorio del crecimiento. Así, Gao y Macagno (1987) llevaron a cabo una serie de experimentos con el fin de determinar si la presencia o ausencia de homólogos en el mismo ganglio o en uno adyacente del sistema nervioso de embriones de sanguijuela, modificaba el patrón de ramificación de neuronas HA. Existen cuatro de estas neuronas y todas inician su proyección axonal de forma idéntica, pero al llegar al ganglio algunas ramificaciones cesan de crecer y desaparecen. Cuando una célula HA es eliminada, sin embargo, las ramificaciones de las homólogas ipsilaterales sobreviven y retoman las proyecciones de las neuronas desaparecidas. Incluso si dos de las neuronas del mismo lado son eliminadas, o tres de las cuatro que componen un ganglio, las restantes extienden nuevas proyecciones. Ellos obtuvieron resultados similares con las neuronas AP y AE de sanguijuela (Gao y

Macagno, 1987). Es decir que aunque dos ganglios adyacentes pueden tener rutas de crecimiento axonal similares, la proyección de uno de ellos es suficiente y por tanto conlleva a la eliminación de las restantes. Al mismo tiempo sugiere que la señalización que ocurre entre estas neuronas es esencial para el establecimiento de conexiones efectivas en el estado adulto.

La importancia de las interacciones entre axones en la determinación de una dirección de crecimiento adecuada ha sido más difícil de analizar en vertebrados. En casos en los que se han removido tractos axonales completos, otros tractos vecinos específicos de diferentes tipos neuronales proyectan de forma aberrante o no se forman. En pez cebra, por ejemplo, la proyección del tracto de la comisura posterior fascicula con el tracto de la comisura post-óptica (TCPO) y en su ausencia proyecta en forma aberrante hacia tractos que normalmente intersectan el TCPO en el borde entre el mesencéfalo y rombencéfalo (Chitnis et al., 1992). Así mismo, se ha sugerido que las neuronas reticuloespinales en embriones de pollo podrían requerir de la fasciculación con el fascículo longitudinal medial (FLM) para proyectar caudalmente, ya que al separar quirúrgicamente el rombencéfalo del istmo, eliminando de este modo la proyección caudal del FLM, las neuronas reticuloespinales dejan también de proyectar caudalmente (Hernandez-Montiel et al., 2003).

Con el fin de analizar la relevancia de las interacciones entre axones pioneros y tardíos en la comisura post-óptica (CPO) de embriones de pez cebra, Bak y Fraser (2003) desarrollaron un estudio cuantitativo de la cinética de crecimiento de estos axones sobre la línea media por medio de microscopía de fluorescencia en lapsos de tiempo. Encontraron que únicamente el axón líder

disminuye considerablemente su velocidad de crecimiento al llegar a la línea media mientras que los “seguidores” fasciculan con el líder lo cual les permite crecer a la misma velocidad aun en la línea media. Una vez que el axón líder ha cruzado la línea media éste entra en contacto con su homólogo contralateral facilitando también el cruce de éste. El cambio en el comportamiento observado en los axones “seguidores” al entrar en contacto con el líder, sugiere que la fasciculación está cambiando el grado de exposición del axón “seguidor” a las señales negativas de la línea media y de este modo, facilitando su cruce. No obstante, no existen estudios en vertebrados que hayan evaluado que pasaría si se impidiera el cruce de todos los axones de un lado del cerebro.

Existen evidencias que sugieren una posible interacción cooperativa durante el establecimiento de las proyecciones tálamo-corticales y cortico-talámicas en mamíferos. McConnell y colaboradores sugirieron por experimentos realizados en gatos y hurones que una población de neuronas de la subplaca actuaban como pioneras de la migración axonal del tálamo a la corteza cerebral (McConnell et al., 1989). Después se mostró que al eliminar dichas neuronas de la subplaca, los axones de un núcleo talámico en particular erraban en proyectar hacia la región de la corteza cerebral correcta (Ghosh et al., 1990). Por otro lado, diversos autores han sugerido que el crecimiento axonal de cada núcleo talámico parece estar sincronizado con el crecimiento desde la pre-placa de la correspondiente área cortical y que ambas proyecciones se encuentran en la zona intermedia del telencéfalo subcortical o subpallium (Catalano et al., 1991; De Carlos y O'Leary, 1992). Se postula que a partir de este punto los axones de

la subplaca y los talámicos se guían mutuamente hasta el tálamo y la neocorteza, respectivamente (Molnar y Blakemore, 1995). En apoyo a esta hipótesis, (Hevner et al., 2002) encontraron aberraciones en las proyecciones cortico-talámicas y tálamo-corticales a partir de la zona intermedia en ratones mutantes para factores de transcripción de expresión específica en corteza (*Tbr1*), tálamo dorsal (*Gbx2*) o en ambos (*Pax6*). El hecho de que la falta de expresión de un factor específico de corteza alterara también las proyecciones talámicas y viceversa, sugería que éstas no se forman independientemente, sino que una vez que alcanzan el subpallium, cada una requiere de la proyección recíproca intacta para continuar su ruta correcta.

En otro ejemplo, un estudio reciente en el embrión de pez cebra sugiere que en vertebrados las interacciones axonales pueden también tener un efecto repelente del crecimiento axonal. Sagasti y colaboradores (2005) encontraron que al remover el ganglio trigémino en un lado del cerebro del pez, el ganglio en el lado opuesto cruzaba la línea media de forma aberrante, mientras que la remoción de ambos ganglios resultó en una expansión de la proyección de otras vías sensoriales (Sagasti et al., 2005). Al generar organismos con una neurona sensorial aislada, encontraron que ésta posee una enorme capacidad de crecimiento y expansión, llegando a rodear todo el cerebro en ausencia de otras neuronas vecinas. Pero las neuronas que cruzaban la línea media de forma aberrante no respondían de forma adecuada a estímulos eléctricos. Este estudio sugiere que la interacción repelente entre axones del trigémino y sensoriales de la médula espinal determina la organización sensorial y el tamaño y forma de las diferentes ramificaciones individuales.

Sin embargo, experimentos en diferentes organismos proporcionan puntos de vista conflictivos acerca del papel de las neuronas pioneras sugiriendo que éstas son dispensables ya que, al eliminarlas, las neuronas seguidoras son capaces de encontrar su ruta correcta (Eisen et al., 1989; Pike et al., 1992). Por ejemplo, si las neuronas pioneras de la extremidad del saltamontes son eliminadas, las neuronas seguidoras de una clase forman una vía axonal normal (Keshishian y Bentley, 1983). En experimentos similares, la eliminación de un tracto axonal en el cerebro del embrión de pez cebra incrementa los errores de guía de los axones seguidores pero no les impide encontrar finalmente su ruta correcta (Chitnis y Kuwada, 1991). En 1995, Lin y colaboradores llevaron a cabo un análisis más detallado en *Drosophila* que sugería que la fasciculación con los axones pioneros era un proceso temporal y no un requerimiento absoluto para la correcta proyección de los seguidores. En este estudio, las neuronas pioneras fueron eliminadas genéticamente a través de la expresión transgénica específica de la toxina de difteria. Al eliminar de este modo la neurona aCC, pionera de la vía del nervio intersegmental (NIS), los conos de crecimiento de las neuronas U que fasciculan con axones aCC como seguidores, retrasaban su crecimiento y presentaban frecuentes errores de proyección (73% de los segmentos) en el corto plazo. En el largo plazo, al contrario, la vía NIS se formaba eventualmente en la mayoría de los segmentos (88%). Resultados similares fueron obtenidos al eliminar con la misma técnica las vías pioneras de la proyección longitudinal del SNC. En el corto plazo, la formación de las vías longitudinales era retrasada o se encontraba desorganizada en la mayoría de los segmentos (70%), pero a largo plazo el 80% de los segmentos se formaban normalmente (Lin et al., 1995).

La conclusión de esta sección es que las neuronas pioneras tienen un papel importante en facilitar la rápida y correcta formación de los diferentes tractos neuronales tanto del SNC como periférico. En algunos casos, al parecer, la fasciculación con los pioneros sólo se requiere en el corto plazo, ya que los axones seguidores poseen una increíble habilidad de compensar la pérdida de las neuronas pioneras y corregir su trayectoria. Pero se puede sugerir también que la fasciculación axonal es esencial para el correcto establecimiento de algunos tractos axonales durante el desarrollo del sistema nervioso pero dispensable en otros.

2. Modelos de Estudio de la Formación de Comisuras en Vertebrados e Invertebrados

Tanto en vertebrados como en invertebrados, un gran número de neuronas se extienden desde la porción más dorsal del tubo neural en dirección ventral y después se enfrentan con la decisión de cruzar o no cruzar la línea media. Dichos axones viran en ángulo recto en el mismo lado (ipsilateral) o en el lado opuesto (contralateral) de la línea media, ya sea en dirección rostral o caudal.

A pesar de que la mayoría de las neuronas cruzan al lado opuesto del cerebro éstas lo hacen sólo una vez, lo cual sugiere que la formación de decusaciones es un evento finamente regulado por señales de atracción y repulsión y por la capacidad de respuesta del axón a estas señales. Los procesos que controlan la decusación neuronal han sido ampliamente

estudiados en la médula espinal de vertebrados y el cordón neural ventral en *Drosophila melanogaster*. La trayectoria de los axones comisurales en estos dos modelos de estudio se describe enseguida.

En vertebrados, las proyecciones más tempranas (pioneras) de neuronas comisurales espinales proyectan ventralmente desde la porción dorsal del tubo neural a lo largo de los extremos laterales de la médula espinal hasta la placa del piso. En cambio, las proyecciones más tardías (seguidoras), siguen la misma trayectoria inicial pero una vez que alcanzan la posición ocupada por las neuronas motoras viran desde el extremo lateral en dirección ventro-medial hasta alcanzar la placa del piso (Figura 2A). Estos axones cruzan la porción basal en el tercio más ventral de la placa del piso y fasciculan entre sí y con otros axones para proyectar longitudinalmente a lo largo de la zona marginal ventral (Holley, 1982; Bovolenta y Dodd, 1990; Yaginuma et al., 1991; Colamarino y Tessier-Lavigne, 1995b).

El cordón nervioso ventral en el embrión de *Drosophila* presenta muchas similitudes con la médula espinal de vertebrados. Un cordón nervioso está compuesto por alrededor de 15 segmentos idénticos o neurómeros. Muchas de las neuronas en cada neurómero del cordón nervioso ventral proyectan axones que cruzan la línea media en uno de dos tractos distintos, la comisura anterior o posterior. Una vez que estos axones comisurales cruzan la línea media, viran ortogonalmente y proyectan en uno de dos tractos longitudinales, los cuales están colocados simétricamente a cada lado de la línea media y proyectan a lo largo del SNC (Figura 2B). Los tractos longitudinales también contienen

proyecciones ipsilaterales de interneuronas, las cuales viran en dirección longitudinal en el mismo lado del cerebro (Klamt y Goodman, 1991).

Aparentemente, los axones comisurales tanto de vertebrados como de invertebrados ignoran las señales guía presentes en el lado ipsilateral pero no en el lado contralateral de la médula espinal ya que, como se mencionó anteriormente, nunca se observan virando en dirección longitudinal antes de cruzar y tampoco son capaces de volver a cruzar la línea media. Estudios recientes han mostrado que un grupo de células especializadas residentes en la línea media ventral de los vertebrados en desarrollo así como en el cordón neural ventral de invertebrados tienen un papel crítico en la regulación de la guía tanto de axones decusantes como de aquellos que no cruzan.

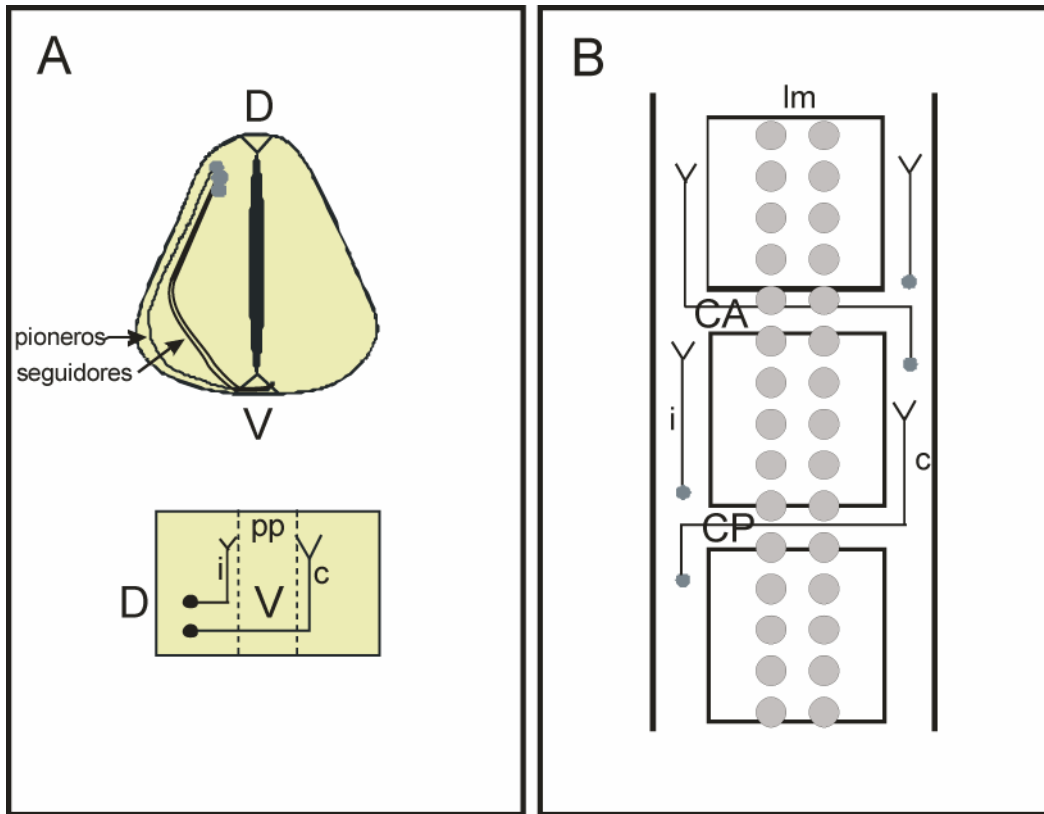


FIGURA 2. Modelos de estudio de la formación de comisuras en vertebrados y *D. melanogaster*. A. Proyección axonal de las neuronas comisurales de la médula espinal de vertebrados mostrando la trayectoria de las neuronas comisurales “pioneras” y “seguidoras” en un corte transversal (arriba) y de las neuronas ipsilaterales y contralaterales en una preparación a “libro abierto” (abajo). D: dorsal, V: ventral, pp: placa del piso, i: ipsilateral, c: contralateral. B. Proyección axonal de neuronas ipsilaterales y contralaterales en el cordón neural ventral de *D. melanogaster*. En ambos casos, las neuronas comisurales proyectan circunferencialmente hasta cruzar la placa del piso o las células de la línea media ventral y continúan en dirección longitudinal en el extremo contralateral de la médula espinal., CA: comisura anterior, CP: comisura posterior, Im: células de la línea media ventral. Modificado de: Kaprielian et al., 2001.

3. Mecanismos que controlan la formación de decusaciones durante el desarrollo

Los estudios realizados en modelos de neuronas comisurales tanto de vertebrados como de invertebrados han permitido dilucidar diversos mecanismos involucrados en el control del cruce de la línea media. Algunos de los principales hallazgos se detallan a continuación:

Se ha mostrado que BMP7, que pertenece a una familia de proteínas con actividad morfogénica y forma un gradiente dorso-ventral en la médula espinal, tiene una actividad quimio-repelente de los axones comisurales *in vitro*, contribuyendo a que éstos sigan una trayectoria en dirección ventral desde el inicio de su crecimiento (Augsburger et al., 1999). Así mismo, en la línea media ventral de la médula espinal existe una alta concentración de Netrina-1, la cual difunde dorsalmente formando un gradiente que funciona como atrayente de células y axones que migran ventralmente y como repelente de aquellos que migran dorsalmente (Tessier-Lavigne et al., 1988; Placzek et al., 1990; Colamarino y Tessier-Lavigne, 1995b). La atracción por netrina-1 es mediada por el receptor DCC (Hedgecock et al., 1990; Keino-Masu et al., 1996) mientras que la repulsión involucra también a Unc-5 (Leung-Hagesteijn et al., 1992; Chan et al., 1996; Keino-Masu et al., 1996; Leonardo et al., 1997). Recientemente, se ha encontrado que el morfógeno ventral Sonic Hedgehog (Shh) posee también actividad quimio-atrayente para los axones comisurales (Charron et al., 2003).

En la línea media ventral existe además una fuerte señal repelente mediada por las proteínas Slit (Rothberg et al., 1990). Esta molécula transduce la señal de repulsión a través del receptor Roundabout (Robo), inicialmente caracterizado en *D. melanogaster* y *C. elegans* (Seeger et al., 1993; Zallen et al., 1998). Dado que en *D. melanogaster* Robo se expresa en niveles altos sólo en axones longitudinales que no cruzan nunca la línea media ventral y en comisurales sólo hasta que éstos han cruzado, este receptor es considerado un importante modulador del cruce de la línea media (Kidd et al., 1998a). La expresión de Robo antes de alcanzar la línea media es reprimida por la proteína Commissureless -Comm- (Kidd et al., 1998b), la cual mantiene a Robo en compartimentos intracelulares lejos de la superficie del axón (Keleman et al., 2002). Una vez que han cruzado, la acción represiva de Comm desaparece (por un mecanismo aún no identificado) y los axones son ahora sensibles a Slit que los aleja de la línea media y les impide volver a cruzar. La diferencia en el fenotipo observado en las mutantes de Slit y Robo en la mosca de la fruta se debe a la presencia en esta especie de dos receptores más de Slit: Robo2 y Robo3, los cuales presentan una actividad parcialmente redundante con Robo 1 (Rajagopalan et al., 2000; Simpson et al., 2000).

Bashaw y Goodman expresaron quimeras del dominio transmembranal de Robo con el dominio citoplásmico de Frazzled (homólogo de DCC en *D. melanogaster*) y viceversa en neuronas de mosca y encontraron que la respuesta mediada por estos receptores a sus ligandos depende de sus dominios citoplásmicos (Bashaw y Goodman, 1999). En ensayos bioquímicos en

células aisladas de *Xenopus laevis*, se ha mostrado incluso que la activación de Robo en el cono de crecimiento cuando éste entra en contacto con su ligando Slit, silencia el efecto atrayente de Netrina-1, pero no su capacidad de inducir el crecimiento, por medio de una interacción directa entre la región citoplásmica de Robo con DCC. Se ha propuesto que esta inactivación aleja al cono de crecimiento de la placa del piso y a la vez le impide volver a cruzar (Stein y Tessier-Lavigne, 2001). Estos hallazgos despertaron la pregunta de qué tanto de la función de Slit-Robo se puede atribuir a repulsión o a inhibición de la atracción. De hecho, reportes recientes en *Drosophila* han sugerido que la principal (o única) función de Slit y Robo durante el cruce de la línea media es inhibir la respuesta a Netrina (Bhat, 2005; Hiramoto y Hiromi, 2006). Bhat et al. (2005) por ejemplo, reportaron que el fenotipo encontrado en las dobles mutantes entre Slit y Netrina (los ligandos) o Robo y Frazzled (receptores) era indistinguible del fenotipo observado en la doble mutante Netrina-Frazzled por lo que llegaron a la conclusión de que la única función de la señalización Slit-Robo es inhibir la atracción mediada por Netrina-Frazzled.

No obstante, cuando Garbe y Bashaw (2007) realizaron combinaciones múltiples de dobles mutantes de ligandos y receptores atrayentes o repelentes encontraron evidencia que contradice los hallazgos de Bath y cols. (2005). Ellos encontraron una combinación de ambos fenotipos: algunos axones dejan de cruzar mientras que otros cruzan de forma anormal, pero la reintroducción de los receptores (ya sea Robo o Frazzled) en los dobles mutantes era suficiente para recuperar el fenotipo observado en los mutantes sencillos. Además, mostraron

que en los mutantes de Robo los axones que ya cruzaron vuelven a cruzar aún en ausencia de la función de Netrina-Frazzled, lo cual sugiere que si en *Drosophila* el recuce requiere del silenciamiento de la atracción, debe de haber otras moléculas además de Netrina mediando dicha atracción o probablemente la repulsión mediada por Robo sea suficiente para evitar el recuce. Aunque los hallazgos obtenidos hasta el momento en *Drosophila* apoyan la hipótesis de que la función repelente de Robo en el control del cruce de la línea media es independiente de la señal de atracción, estudios a futuro analizando por ejemplo el fenotipo de dobles mutantes de Robo y DCC en ratón ayudarían a dilucidar la importancia *in vivo* del silenciamiento de la atracción (Garbe y Bashaw, 2007).

En lo que respecta al ratón, sólo se obtuvo un efecto evidente sobre los axones comisurales espinales hasta que fue eliminada la expresión de las tres formas de Slit, obteniéndose un fenotipo similar al observado para las mutantes de Slit y Robo en *Drosophila* (Long et al., 2004). Así mismo, en el ratón mutante para Robo1 una cantidad importante de axones comisurales se encuentran detenidos en la placa del piso, mientras que la mutación de Robo 2 en ratón provoca que los axones comisurales tiendan a adoptar una posición más medial en la médula espinal contralateral (Long et al., 2004). Sin embargo, no ha sido identificado a la fecha un homólogo de *Comm* en vertebrados que explique por qué los axones comisurales no responden a Slit antes de cruzar la línea media. La proteína Rig-1 (Robo3) parece estar involucrada en este proceso, ya que al contrario que las otras formas de Robo, se expresa en los axones comisurales en niveles altos antes de que crucen la línea media y su expresión disminuye

después de cruzar. Ensayos de pérdida de función sugieren que Rig-1 reprime la respuesta de los axones comisurales a Slit inhibiendo la función de Robo, por un mecanismo diferente al utilizado por Comm pero aún no determinado, por lo que su expresión se requiere para que estos axones puedan entrar a la placa del piso y cruzar al lado contralateral (Sabatier et al., 2004).

En embriones de pollo se ha mostrado, sin embargo, que los conos de crecimiento de axones comisurales responden a una señal repelente antes de cruzar la línea media, ya que el bloqueo de la función de las proteínas TAG1 y NrCAM con anticuerpos específicos en ensayos *in vitro*, impide a los conos de crecimiento invadir la placa del piso. La pérdida de función de TAG-1 provoca incluso el colapso del cono de crecimiento cuando éste se acerca a la placa del piso (Stoeckli et al., 1997).

TAG-1 se expresa en los cuerpos celulares de neuronas comisurales en embriones de ratón y pollo desde antes de que comiencen a extender sus axones y en la superficie axonal durante toda su trayectoria hasta cruzar la placa del piso, por lo cual se utiliza como marcador de la proyección de estos axones. En el ratón, una vez que los axones han cruzado la placa del piso dejan de expresar TAG-1 para comenzar a expresar L1, lo cual les permite responder de forma diferencial en cada lado de la placa del piso. Ensayos *in vitro* sugieren además que TAG-1 es secretada por las neuronas comisurales de forma espontánea, mecanismo que podría estar siendo utilizado para marcar la ruta de crecimiento axonal (Dodd et al., 1988). La proteína NrCAM por su parte, es expresada en células gliales de la placa del piso de embriones de ratón (Lustig et al., 2001) y es detectada a niveles moderados en los axones comisurales

mientras proyectan hacia la línea media ventral, se enriquece al entrar en contacto con la placa del piso y vuelve a caer a niveles muy bajos en el funiculus ventral (Matisse et al., 1999). En embriones de pollo, TAG-1 se expresa junto con L1 en los axones comisurales de la médula espinal durante su crecimiento a través de la placa del piso y su cambio de dirección en sentido rostral (Shiga et al., 1990; Shiga y Oppenheim, 1991; Stoeckli y Landmesser, 1995), mientras que NrCAM se expresa sólo en la placa del piso (Krushel et al., 1993; Denburg et al., 1995). Se ha sugerido, por tanto, que se requiere una interacción entre TAG1 de los conos de crecimiento con NrCAM de la placa del piso para permitir a los axones cruzar y continuar su proyección en el borde contralateral de la placa del piso, mientras que L1 se requiere para mantener la fasciculación de estos axones (Stoeckli y Landmesser, 1995). La interacción de TAG1 con NrCAM y L1 ha sido demostrada *in vitro*, aunque la capacidad de TAG1 de promover el crecimiento de neuritas en cultivo, parece ser independiente de esas interacciones (Pavlou et al., 2002).

En resumen, la decisión del axón de cruzar o no cruzar la línea media ventral está controlada por un fino balance entre señales de atracción y repulsión y por los cambios en la presentación de receptores y proteínas de membrana en la superficie del axón. En la figura 3 se esquematiza el modelo propuesto hasta el momento para la guía axonal en la línea media de acuerdo con los resultados observados en diferentes estudios. Sin embargo, toda la evidencia acumulada no es suficiente para explicar por qué los axones comisurales espinales cruzan la línea media a pesar de la presencia de moléculas repelentes. De acuerdo con los resultados obtenidos por Stoeckli et

al. (1997) al bloquear la función de las proteínas TAG1 y NrCAM en la médula espinal, los axones comisurales son repelidos por las células de la placa del piso aún antes de cruzar la línea media.

En el presente trabajo se sugiere que, además de lo anteriormente expuesto, la capacidad del axón de cruzar la línea media está determinada por interacciones directas o indirectas entre axones contralaterales homólogos a nivel de la línea media ventral. En este sentido, como ya se había mencionado, Myers y Bastiani (1993) encontraron en embriones de saltamontes que la ablación eléctrica de una neurona decusante de un lado del embrión evitaba también el cruce de la neurona homóloga del lado opuesto, sugiriendo que la fasciculación axonal entre axones decusantes homólogos tiene un papel esencial en el cruce de la línea media. Por otro lado, aunque en vertebrados se han observado también contactos frecuentes en la línea media entre axones comisurales contralaterales de la médula espinal tanto de embriones de pollo (Yaginuma et al., 1990; Yaginuma et al., 1991) como de rata (Petko et al., 2004), ninguno de estos estudios mostró evidencias de que dicha interacción tuviera un papel esencial en formación de la decusación.

En la CPO del embrión de pez cebra, Bak y Fraser (2003) encontraron que una vez que el axón líder de un lado del cerebro del pez ha cruzado la línea media éste fascicula con el axón líder contralateral, facilitando de este modo su cruce. No obstante, aunque este estudio presenta una descripción detallada de la dinámica de crecimiento y cruce de la línea media de los axones de la CPO, no es posible afirmar si la interacción observada en la línea media entre axones contralaterales es esencial para la formación de la comisura.

Mientras se desarrollaban experimentos para identificar factores de transcripción que pudieran determinar la identidad neuronal y proyección longitudinal de las neuronas reticuloespinales del rombencéfalo de pollo en el laboratorio del Dr. Varela, se obtuvo un resultado inesperado que sugería la existencia de interacciones entre axones decusantes, necesarias para el correcto establecimiento de la decusación. Se llevaron a cabo ensayos de ganancia y pérdida de función por electroporación unilateral de diferentes proteínas de la familia LIM en embriones de pollo. El efecto sobre los diferentes grupos neuronales fue evaluado por marcaje retrógrado. El resultado inesperado fue que al expresar de forma ectópica por electroporación el factor de transcripción Lhx3 en uno de los lados del rombencéfalo caudal, se observó disminución del 75% de las neuronas contralaterales en el dominio electroporado, pero también se observó una disminución equivalente de las neuronas de proyección contralateral en el lado no electroporado. Esta disminución no parecía relacionarse con alteraciones en el sustrato contralateral producto de la expresión ectópica, dado que la proyección de axones ipsilaterales tanto del fascículo longitudinal medial como del lateral era normal en ambos lados y tampoco se observaron alteraciones en la expresión de otros factores de transcripción. Este resultado sugería entonces la existencia de interacciones recíprocas entre las neuronas contralaterales del rombencéfalo, las cuales además eran necesarias para su proyección, de tal forma que la disminución en la cantidad de axones de un lado del rombencéfalo que cruzaba la línea media tendría un efecto directo en el cruce de los axones del lado opuesto. No obstante, el método utilizado para detectar las neuronas

reticuloespinales en este estudio (marcaje retrógrado en r8) sólo indicaba que había menos neuronas contralaterales proyectando hacia el rombencéfalo caudal, pero no precisaba si se debía a que los axones estaban proyectando de forma aberrante o a que las neuronas estaban muriendo (Cepeda-Nieto et al., 2005).

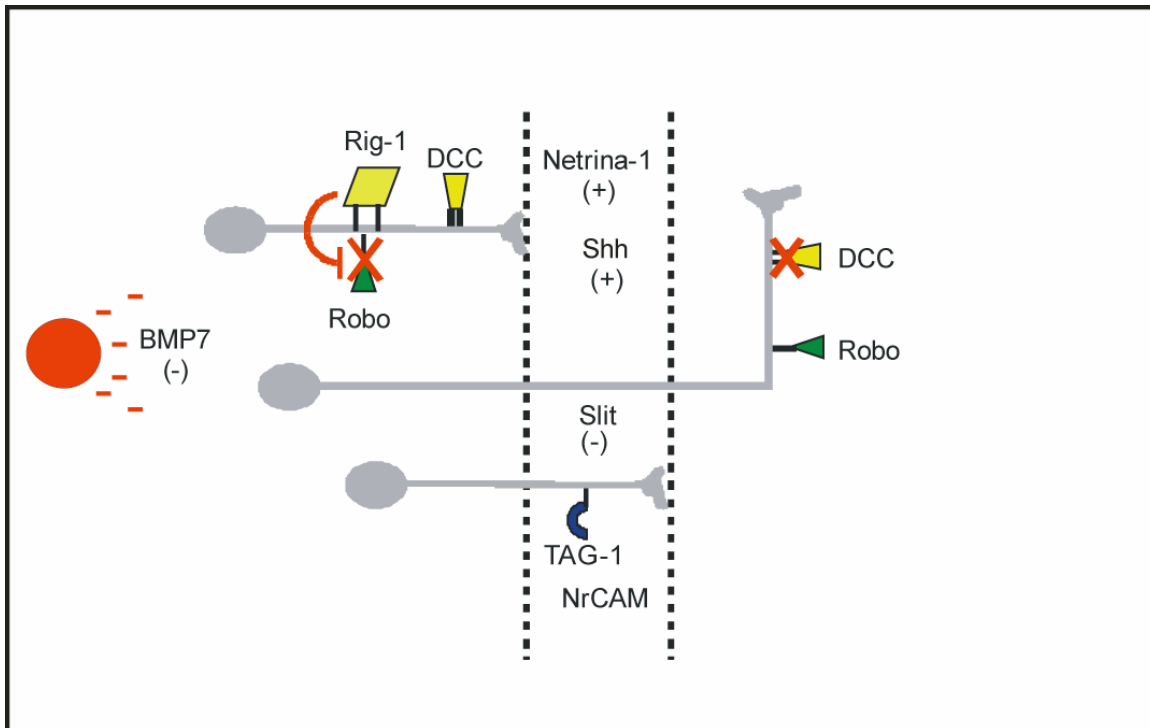


FIGURA 3. Resumen de las principales moléculas involucradas en la guía axonal en la línea media con base en hallazgos obtenidos en diferentes modelos de vertebrados. Los conos de crecimiento de las neuronas comisurales espinales responden inicialmente a la señal repelente de BMP-7 que los “orienta” hacia la línea media ventral, para más tarde ser atraídos por Netrina-1 y Shh hacia la placa del piso. En la placa del piso existe también una fuerte señal repelente mediada por Slit-1, no obstante, los axones no responden a esta molécula dado que su receptor, Robo, es inactivado por Rig-1 antes de cruzar. Una vez que el cono de crecimiento encuentra altas concentraciones de Slit, Robo se activa e interacciona con el dominio intracelular de DCC (receptor de Netrina-1), lo cual inactiva a este receptor y aleja al cono de crecimiento de la placa del piso, impidiéndole volver a cruzar. Por otro lado, la interacción entre TAG-1 presente en la superficie del axón con NrCAM expresado en la placa del piso, permite a los conos de crecimiento contrarrestar la señal repelente de la línea media y cruzar al lado contralateral.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La línea media ventral secreta una serie de moléculas, tanto atrayentes como repelentes, que controlan el cruce axonal hacia el lado contralateral. Los axones comisurales cruzan la línea media ventral una sola vez durante su trayectoria hacia el lado contralateral del sistema nervioso. No obstante, los mecanismos a través de los cuales dichos axones “ignoran” las señales repelentes antes de cruzar y atrayentes, una vez que se encuentran en la línea media, aún no se encuentran del todo comprendidos. En este trabajo se explora el papel de las interacciones entre axones comisurales de lados opuestos del cerebro del ratón, como un mecanismo que facilita el cruce de la línea media en presencia de señales dicótomas.

Utilizando marcaje bilateral para seguir las trayectorias de las neuronas decusantes en la región caudal del rombencéfalo de ratón en desarrollo, los análisis revelaron interacciones entre axones contralaterales al momento de que empiezan a cruzar la línea media que se mantienen después de cruzar. La inhibición unilateral del cruce de la línea media por una barrera mecánica sólida o permeable a moléculas difusibles impidió el cruce de los axones contralaterales mientras que una barrera permeable a axones no tuvo ningún efecto. Los hallazgos experimentales sugieren que se requiere de la interacción directa entre axones contralaterales para el cruce de la línea media. Este podría ser un mecanismo a través del cual los axones comisurales son capaces de crecer en un ambiente adverso.

HIPÓTESIS

El cruce axonal de la línea media ventral por las neuronas decusantes del rombencefalo caudal depende de la interacción recíproca directa o indirecta con los axones de las neuronas contralaterales homólogas.

OBJETIVO GENERAL

Caracterizar la interacción en la línea media ventral de los axones de neuronas decusantes del rombencefalo caudal con sus homólogas contralaterales y con el substrato.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Analizar las características de los axones decusantes del rombencéfalo caudal durante su crecimiento sobre la línea media ventral.
2. Desarrollar un modelo *in vitro* para el estudio de la proyección de las neuronas decusantes del rombencéfalo caudal.
3. Bloquear unilateralmente la proyección de las neuronas decusantes *in vitro* con barreras mecánicas y analizar la proyección de las neuronas contralaterales homólogas.

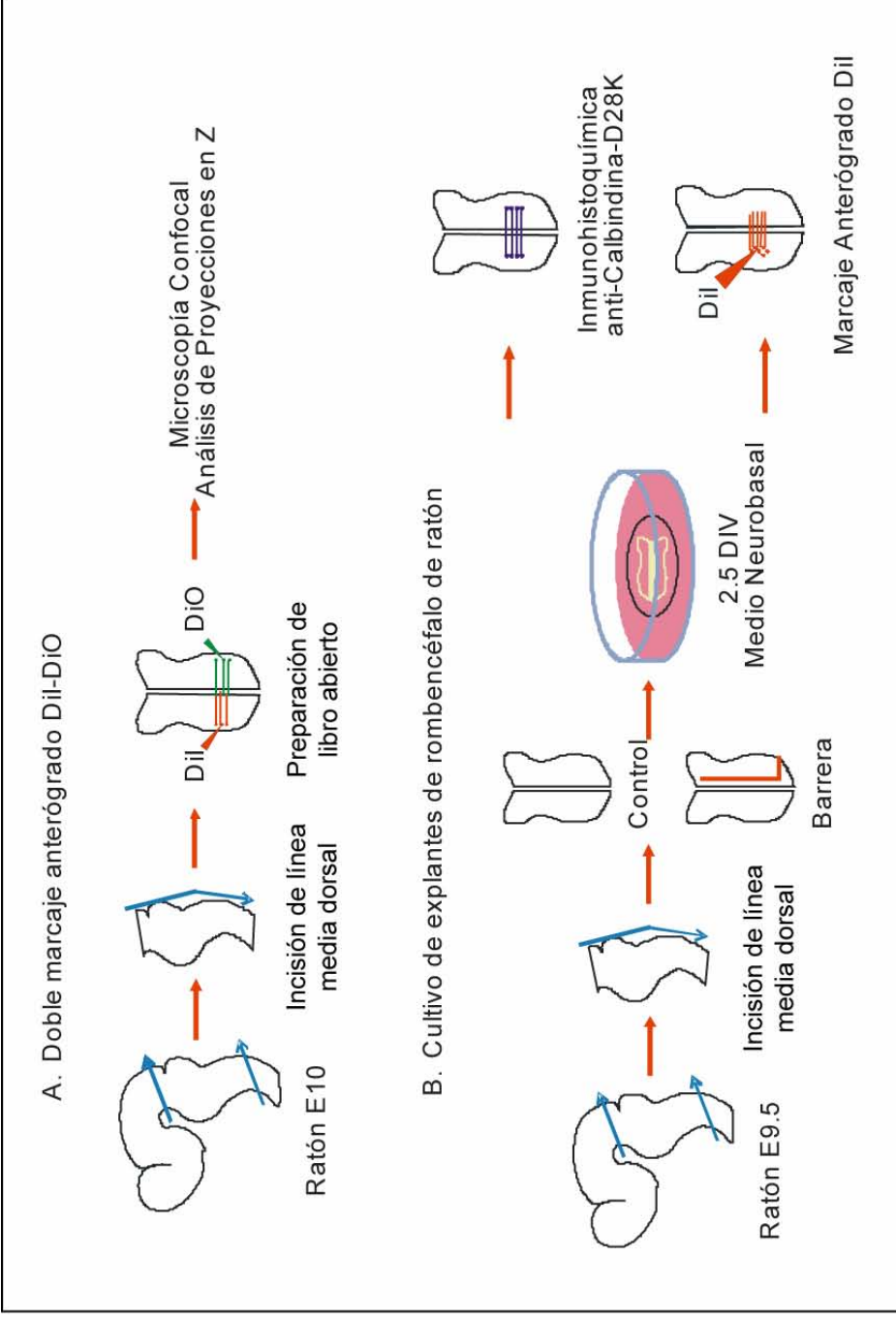


FIGURA 4. Estrategia experimental. A: Se obtuvo el rombencéfalo de ratón E10 en preparación de libro abierto y se fijó durante toda la noche en PFA 3.5%. Posteriormente, se insertó una aguja embebida con cristales de Dil del lado derecho de la porción dorsal del rombencéfalo caudal y en la región equivalente del lado izquierdo se insertó una aguja con cristales de DiO. Se incubó en PBS con unas gotas de PFA por 30 minutos a 37°C, se montó en laminillas con glicerol y se obtuvieron imágenes de los axones marcados por microscopía confocal, analizando varios campos en Z con el fin de seguir la trayectoria de cada axón durante el cruce de la línea media. B: Se obtuvo el rombencéfalo de ratón E9.5 en preparación de libro abierto y se cultivó sobre membranas de policarbonato con la cara ventricular hacia arriba, flotando en medio neurobasal, durante 2.5 días a 37°C. En los explantes experimentales se colocó una laminilla de aluminio o una membrana de policarbonato de tamaño de poro de 15nm o 12mm, lateral a la placa del piso, de r5 a r8, en el lado derecho del rombencéfalo. Después de 2.5 DIV se fijó en PFA 3.5% por una hora y el explante se sometió a inmunohistoquímica contra calbindina D28K o a marcaje anterógrado unilateral con Dil, con el fin de analizar la trayectoria de los axones decusantes contralaterales a la barrera, en embriones control o con algún tipo de barrera. Más detalles en Material y Métodos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Animales

Se utilizaron embriones de ratón de la cepa CD-1 de 8.5 a 10.5 días de gestación (E8.5-E10.5). El día de detección del tapón vaginal se definió como día 0.5. Los animales fueron alojados y manipulados de acuerdo con las regulaciones establecidas por el Gobierno Mexicano para el uso de animales de laboratorio con propósitos de investigación (NOM-062-ZOO-1999) y siguiendo “La Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio” (Institute of Laboratory Animal Resources, National Research Council, USA).

Marcaje anterógrado fluorescente

Para el marcaje con los colorantes fluorescentes Dil (DiI_{C18}, No. cat. D-282, Molecular Probes, Eugene, OR) y DiO (DiO_{C18}, D-275), los embriones fueron disecados haciendo una incisión a lo largo de la línea media dorsal del rombencéfalo y fueron asegurados con agujas de disección a una caja de silicón con PBS con la zona ventricular hacia arriba. Acto seguido, los embriones fueron fijados durante toda la noche en PFA al 3.5% a 4°C. Posteriormente, la punta de agujas de disección se recubrió con Dil o DiO diluídos en etanol y se dejaron secar al aire. Las agujas embebidas con los colorantes se insertaron directamente en el tejido fijado en la porción dorsal de la rombómera 6 y se incubaron a 37°C por 30 minutos. Después de este tiempo, las agujas fueron removidas y los embriones se mantuvieron a 37°C durante toda la noche en PBS con algunas gotas de PFA 3.5%. Para determinar el momento preciso en que los

primeros axones decusantes cruzan la línea media, se fijaron embriones de 8.5 a 10.5 días de gestación y se marcaron de forma anterógrada con Dil en el lado izquierdo de la región dorsal de r6. El doble marcaje anterógrado se llevó a cabo insertando una aguja con Dil del lado izquierdo y una aguja con DiO del lado derecho de la porción dorsal de r6 (Figura 4) seguido de la incubación descrita anteriormente. Por último, los explantes de rombencéfalo se fijaron por una hora a TA en PFA 3.5% al término del cultivo y se insertó una aguja embebida en Dil en la región dorsal de r6 de lado izquierdo de cada explante como se describió previamente.

Cultivo de explantes de rombencéfalo

El rombencéfalo completo más una porción de la médula espinal cervical se preparó en configuración de libro-abierto abriendo la línea media dorsal y removiendo los arcos branquiales y parte del mesénquima subyacente. Estos explantes se cultivaron sobre membranas de policarbonato de 13 mm de diámetro con un tamaño de poro de 8 μm (110414, Whatman, Florham Park, NJ, USA) con el tejido neural (zona ventricular) hacia arriba y flotando en medio Neurobasal (21103-049, GIBCO, Rockville, MD, USA) suplementado con 5% de suero de caballo, 2 mM L-Glutamina (GIBCO 25030-164), 1X suplemento B-27 (GIBCO 17504-044) y 10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de penicilina/estreptomicina, como fue descrito previamente (Echevarria et al., 2001) en una incubadora humidificada a 37°C con 5% CO₂ por 2.5 días. En cultivos con barrera se colocó una laminilla de papel aluminio (2.5 μm de grosor) o de membrana de policarbonato (1.25 μm de

grosor y 12 μm o 15 nm de tamaño de poro, Whatman 111116 o 110601, respectivamente) al principio del cultivo insertándola en el lado derecho del rombencéfalo, de r4 a r8, lateral a la placa del piso, a una distancia de 50-100 μm de ésta (para prevenir daño a la placa del piso pero asegurar el bloqueo de la mayoría de los axones decusantes laterales a la barrera). Al término de la incubación, los explantes fueron fijados por una hora a TA en PFA 3.5% y se mantuvieron en PBS-azida de sodio 0.05% a 4°C hasta ser procesados por inmunohistoquímica o marcaje anterógrado fluorescente (Figura 4).

Inmunohistoquímica en embrión completo

Con el fin de analizar el efecto de la barrera de papel aluminio en la cantidad y en la proyección de los axones de una población de neuronas decusantes del rombencéfalo caudal positivas a calbindina (CB) que forma parte de la formación reticular medular (Jacobowitz y Abbott, 1998), se llevó a cabo una inmunohistoquímica en embriones y explantes después de 2.5 DIV con y sin barrera, contra calbindina D-28K. El procedimiento fue modificado de Chedotal y cols., (1998). Brevemente, se fijaron embriones de 9.5, 10.5 y 11.5 días de gestación en preparación de libro abierto durante toda la noche a 4°C y los cultivos de explantes durante una hora a TA en PFA 3.5%. Los embriones fueron deshidratados en series de metanol e incubados toda la noche en metanol con 6% de peróxido de hidrógeno para inactivar peroxidasas endógenas. Una vez rehidratados, las reacciones no-específicas fueron bloqueadas con leche descremada al 2% en PBS/0.1% Triton X-100 por 2 horas a TA. Después los

embriones se incubaron en la misma solución de bloqueo por 48 horas a 4°C en anticuerpo primario contra calbindina D-28K 1:1000 (AB1778, Chemicon, Temecula, CA, USA) y posteriormente fueron incubados en solución de bloqueo con 10% de SFBI durante toda la noche a 4°C con IgGs de cabra anti-conejo conjugadas con peroxidasa 1:1000 (111-036-003, Jackson, West Grove, PA, USA). La reacción fue revelada con tabletas de *SIGMAFAST* DAB con incrementador de metal (D0426, Sigma, Saint Louis, MO, USA).

Inmunofluorescencia en cortes transversales

Embriones de 10.5 y 11.5 días previamente fijados en PFA 3.5% se enjuagaron varias veces en PBS y se incubaron toda la noche en sacarosa al 30% en PBS a 4°C, posteriormente fueron embebidos y congelados en Tissue-Tek O.C.T. (25608-930, VWR, Batavia, IL, USA). Se obtuvieron cortes transversales de 10 µm de espesor del rombencéfalo caudal y estos fueron sometidos a inmunofluorescencia contra los anticuerpos primarios contra calbindina D-28K 1:1000 (AB1778, Chemicon, Temecula, CA, USA), TAG-1, 1:1000 (4D7, Dev. Studies Hybridoma Bank), NrCAM, 1:300 (policlonal 837), L1, 1:100 (ASC54, Hybridoma Bank), Robo-1, 1:800 y Robo-2, 1:800 (generosamente donados por la Dra. Elke Stein, Yale University, USA) y DCC 5 µg/ml (OP45, Calbiochem, San Diego, CA, USA) durante toda la noche a 4°C. Posteriormente, se incubaron con IgGs de cabra anti-conejo acoplado a Cy3A, 1:1000 (111-166-003, Jackson, West Grove, PA, USA) o anti-ratón acoplado a Cy3A, 1:1000 (115-166-003, Jackson) durante 2 horas a TA. Las reacciones no-específicas fueron

previamente bloqueadas con suero fetal bovino inactivado del 2 al 5% en PBS/0.01% Tritón por 30-60 minutos a TA excepto para la inmunofluorescencia contra DCC donde se utilizó Deoxicolato de sodio al 0.1% como detergente.

Adquisición y procesamiento de imágenes

Para capturar los axones marcados con moléculas fluorescentes se utilizó un microscopio confocal Nikon Eclipse E600 PCM-2000 o Bio-Rad 1024 equipado con láseres 488 (GFP/FITC) o 543 (Rhodamine/Texas Red). Las proyecciones de series de planos focales en Z fueron obtenidas con el software Simple PCI 4.06 (Compix Inc. Imaging Systems, Cranberry Township, PA, USA) para las imágenes obtenidas con el microscopio Nikon y con Image J 1.34s (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) para aquellas obtenidas con el microscopio BioRad. Las imágenes de embriones con doble-marcaje fueron obtenidas independientemente con cada láser a los mismos planos ópticos y las imágenes independientes de Dil y DiO fueron sobrelapadas en Adobe Photoshop 8. Las imágenes fueron recortadas para mostrar regiones específicas y el contraste y brillo se ajustaron uniformemente cuando se consideró necesario. La posición de la línea media se obtuvo al superponer una imagen de campo claro (DIC) con la correspondiente imagen confocal de cada embrión.

Cuantificación de axones y análisis estadístico

Las trayectorias de los axones decusantes fueron visualizadas por marcaje anterógrado con Dil. Aunque los diferentes grados de intensidad de fluorescencia indicaban en cierto grado las diferencias en número y extensión de

los axones en diferentes regiones del embrión y entre muestras, también eran un reflejo de diferencias en la cantidad de marcador fluorescente así como de los parámetros utilizados en la adquisición de cada imagen. Con el fin de normalizar los niveles de fluorescencia de tal forma que la intensidad promedio fuera una referencia de la cantidad y distribución de los axones en los diferentes explantes, todos los axones marcados localizados en la proyección de una serie de imágenes en Z de cada embrión se llevaron al umbral de intensidad y se transformaron en datos binarios de tal forma que los píxeles de fondo tuvieran un valor de 0 y los píxeles con axones un valor de 1. Este procedimiento permitió entonces calcular el número de píxeles marcados (cobertura de axones) que se acercaban y cruzaban la línea media y hacer comparaciones entre muestras como se explica enseguida: se dibujó un rectángulo de aproximadamente 380 μm en el eje longitudinal del embrión desde la mitad de la placa del piso (en la posición de la notocorda) a la derecha, hasta donde la barrera había sido colocada y otro rectángulo de las mismas dimensiones en la posición equivalente a la izquierda de la línea media. Se utilizó un rectángulo de las mismas dimensiones para obtener la intensidad promedio a la derecha y a la izquierda de la placa del piso en cada explante control y con barrera (ver ejemplo en la figura 8E). Todas estas transformaciones y análisis se llevaron a cabo con ayuda del software Metamorph v4.6r10 (Universal Imaging Corporation, Downingtown, PA, USA). Posteriormente, se determinó el radio de cobertura axonal en el lado contralateral versus el lado ipsilateral (razón derecha/izquierda) para cada embrión. Dado que los números percentiles no

tienen una distribución normal, se utilizó el arco seno de la raíz cuadrada de cada dato percentil para hacer comparaciones entre explantes control y con barrera por medio de ANOVA (usando el software SAS v6.02, SAS Institute, Inc., Cary, NC, USA).

Así mismo, se llevó a cabo una comparación más detallada de la cobertura axonal en diferentes regiones medio-laterales de explantes con barrera de papel aluminio o con barrera semi-permeable de 15 nm con condiciones control en las imágenes transformadas a datos binarios con ayuda del software Metamorph v4.6r10. Primero se dibujó un rectángulo de 380 μm x 100 μm de acuerdo con el tamaño promedio de la placa del piso en el campo de imagen (M en ejemplo en Figura 4H) en la región dorsal de cada explante (T, donde fue colocado el cristal de Dil), a la izquierda (I) y a la derecha (D) de la línea media. Se comparó la cobertura axonal en la región dorsal de cada explante (T) con barrera de papel aluminio o con barrera semipermeable y sus controles correspondientes usando el procedimiento del modelo lineal general del sistema SAS. Las medias fueron comparadas por el procedimiento de *media de mínimos cuadrados* con una prueba de dos colas, de acuerdo con el siguiente modelo: $Y = \mu + T_i + E_{ij}$, donde μ es la media general, T_i es el tratamiento (i es cultivo con o sin barrera) y E_{ij} es el error experimental. No se encontraron diferencias significativas en la cobertura axonal entre cultivos con barrera y sus respectivos controles, indicando que las barreras no afectaban la eficiencia del marcaje [papel aluminio: control (n=14): media 0.403 ± 0.150 , barrera (n=14): media 0.326 ± 0.094 ; membrana de tamaño de poro de 15 nm:

control (n=10): media 0.756 ± 0.143 , barrera (n=10): media 0.753 ± 0.129]. Por lo tanto, la cobertura axonal en T fue utilizada como referencia del total del marcaje axonal (100%) en cada explante control y con barrera y fue utilizada para obtener la cobertura axonal en cada región I, M y D. Finalmente, se determinó la cobertura axonal relativa en cada región con respecto a T (razón I/T, M/T, D/T), se obtuvo el arco seno de la raíz cuadrada de la cobertura axonal relativa en cada región y se comparó entre explantes control y con barreras por medio de ANOVA con ayuda del software SAS.

En el caso de los explantes sometidos a inmunohistoquímica contra calbindina, los axones y/o fascículos axonales presentes antes de cruzar (izquierda) y sobre la placa del piso (línea media) se contaron directamente bajo el microscopio de luz a diferentes planos focales y los resultados obtenidos de cultivos control y con barrera se analizaron por ANOVA utilizando el sistema SAS. Las medias fueron comparadas por medio del procedimiento de *media de mínimos cuadrados* con una prueba de dos colas, de acuerdo con el modelo: $Y = \mu + T_i + E_{ij}$, donde μ es la media general, T_i es el tratamiento (i es el número de axones a la izquierda o en la línea media) y E_{ij} es el error experimental.

Hibridación *in situ*

Los embriones de 10.5 días de gestación y los cultivos de explantes de rombencéfalo de E9.5 con y sin barrera de papel aluminio fueron fijados en PFA 3.5% y se sometieron a hibridación in-situ utilizando las sondas contra Netrina-1, Slit-1 y Slit-2, generosamente donadas por el Dr. Marc Tessier-Lavigne, por

medio de la técnica descrita previamente por Varela-Echavarría et al. (Varela-Echavarría et al., 1996). Brevemente, los explantes de rombencéfalo fueron fijados por al menos 2 horas a TA en PFA 3.5%, lavados en PBS - 0.1% Tween-20 (PBT) y deshidratados en series de metanol/PBT 25%, 50%, 75% y 100%. Una vez rehidratados, fueron incubados por una hora a TA en peróxido de hidrógeno 6%, lavados en PBT y consecutivamente tratados por 20 minutos a TA con Proteinasa K 10 µg/ml, después de lo cual fueron nuevamente fijados en PFA 3.5% con glutaraldehído 0.1% en PBT por 20 minutos a TA. Se pre-incubaron por una hora a 70°C en mezcla de hibridación sin sonda (formamida 50%, SSC 5X pH 4.5, Heparina 50 µg/ml, Tween-20 0.1%, ARN de levadura 50 µg/ml y ADN de esperma de salmón 50 µg/ml), y posteriormente se incubaron en 1 ml de solución de hibridación conteniendo aprox. 1 µg de sonda de ARN marcada con DIG-UTP (previamente sintetizada por transcripción *in vitro*) durante toda la noche a 70°C. Para remover la sonda, se realizaron 3 lavados de 30 minutos c/u a 70°C con cada una de las siguientes soluciones: Solución I: Formamida 50%, SSC 4X pH4.5, SDS 1%; Solución II: NaCl 0.5 M, Tris 10 mM pH 7.5, Tween-20 0.1%; Solución III: Formamida 50%, SSC 2X pH 4.5. Finalmente, se pre-incubaron en buffer MABT pH 7.5 (ácido maleico 0.1 M, NaCl 150 mM, Tween-20 0.1%) con suero de cabra al 15% durante 2 horas a TA y posteriormente, se añadió el anticuerpo anti-DIG 1:3000 (11093274910, Roche, IN, USA) y se incubó toda la noche a 4°C. El revelado de la señal se llevó a cabo con NBT (1383213, Roche, IN, USA) y BCIP (1383211, Roche, IN, USA) en

NTMT (NaCl 0.1 M, Tris 0.2 M pH 9.5, MgCl₂ 0.05 M, Tween-20 0.1%) a TA en oscuridad hasta obtener la señal deseada.

RESULTADOS

Los axones del rombencéfalo caudal del ratón comienzan a cruzar la línea media en E10

Con el fin de determinar los tiempos en que los axones de neuronas decusantes proyectan a través de la línea media ventral, se sometió a embriones de ratón de diferentes estadios de gestación, de E8.5 a E10.5, a marcaje anterógrado unilateral con Dil en la porción dorsal de r6. En E9.5 los primeros axones se acercan a la placa del piso (Figura 5A), para E10 algunos de ellos comienzan a cruzar la línea media (Figura 5C-H), mientras que para E10.5 un número considerable de axones ha cruzado al lado contralateral (Figura 5B). Esta población neuronal proyecta desde la porción más dorsal del rombencéfalo caudal en dirección circunferencial hasta la placa del piso. Una vez que los axones pioneros comienzan a cruzar hacia el lado contralateral (Figura 5A), otros más siguen la misma ruta para formar un fascículo grueso que se desarrollará más tarde en una comisura. Finalmente, algunos de los axones viran longitudinalmente en dirección rostral una vez que han cruzado mientras que otros continúan adelante hasta la porción contralateral más dorsal del rombencéfalo (Figura 5B).

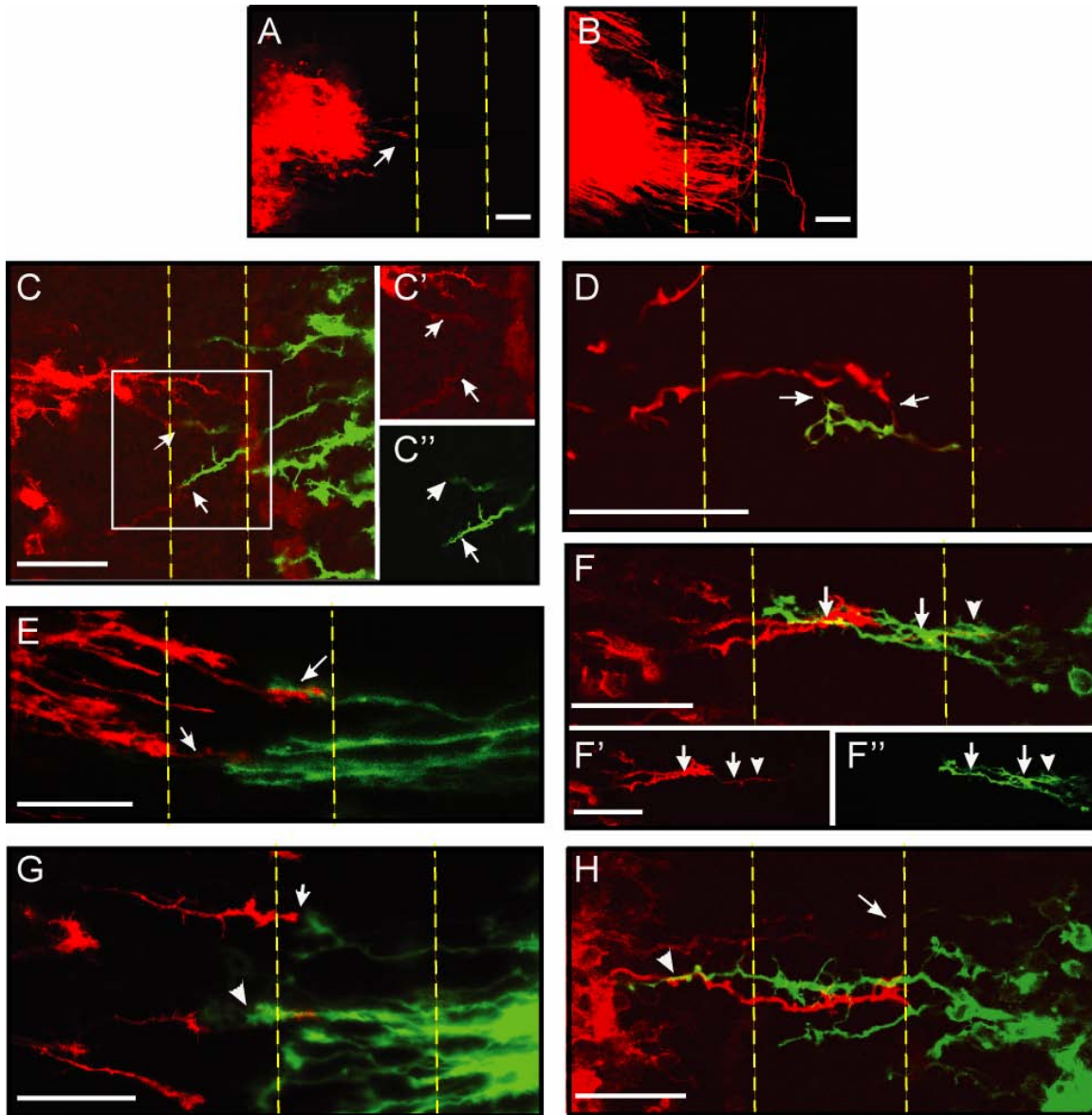


FIGURA 5. Algunas poblaciones de axones del rombencéfalo caudal comienzan a cruzar la línea media a los 10 días de gestación en ratón e interaccionan con sus homólogos contralaterales mientras cruzan. A, B: Proyecciones en Z de series confocales (20 planos focales tomados a intervalos de 2 μm cada uno) del rombencéfalo caudal de ratón en configuración de libro abierto, mostrando los axones decusantes marcados de forma anterógrada con Dil en E9.5 (A) y E10.5 (B). La flecha en A muestra uno de los primeros axones que proyectan hacia la placa del piso. Las líneas punteadas en todos los paneles indican los límites aproximados de la placa del piso. C-H: montajes en configuración de libro abierto de imágenes del rombencéfalo caudal de ratón E10 marcados anterógradamente con Dil (rojo, izquierdo) y DiO (verde, derecho) en el momento en que los primeros axones decusantes comienzan a cruzar la línea media. Las imágenes en C, E y G son proyecciones de dos planos focales adyacentes

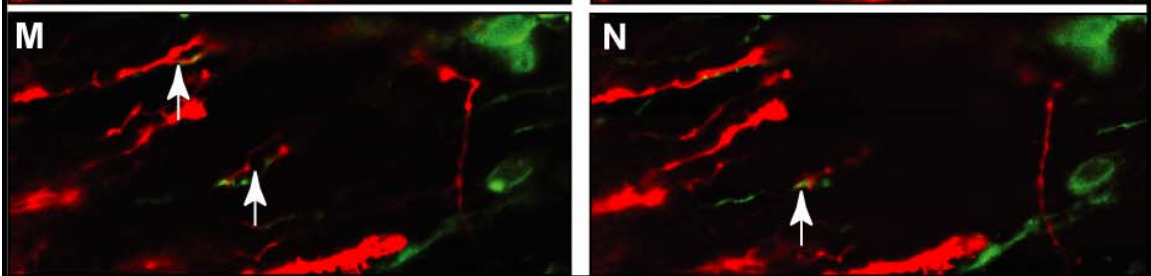
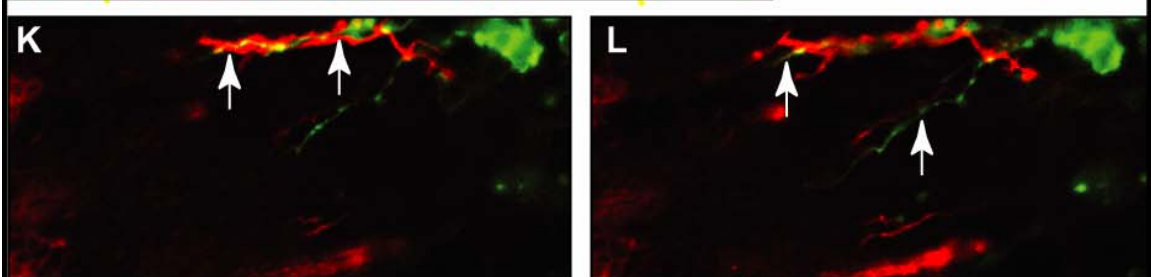
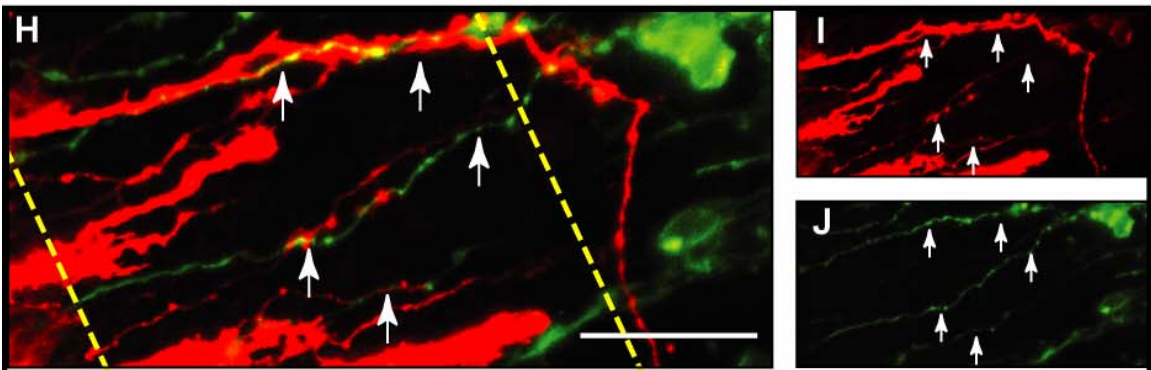
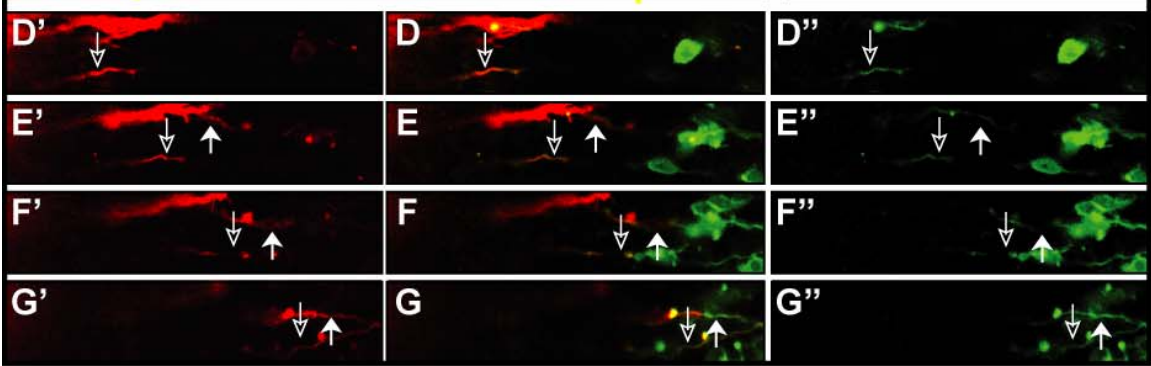
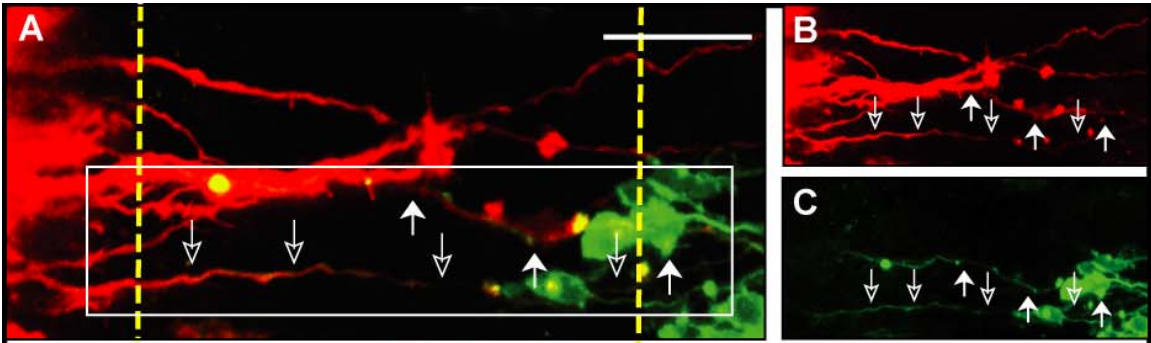
en Z a una distancia de $1.5\mu\text{m}$ mientras que D, F y H muestran planos focales independientes. Las flechas muestran aposiciones tempranas entre axones (C, E, F y H) o conos de crecimiento (D, G) de axones contralaterales en la línea media y las cabezas de flecha en F, H muestran interacciones entre axones una vez que han cruzado hacia el lado contralateral. C' y C'' así como F' y F'' son imágenes independientes de Dil o DiO del montaje mostrado en C o F respectivamente. Barra de escala: $50\mu\text{m}$.

Los axones de neuronas decusantes del rombencéfalo caudal se encuentran en cercana aposición con sus homólogos contralaterales en la línea media

La proyección axonal en la línea media de embriones de ratón E10 se estudió marcando de forma anterógrada con Dil y DiO lados opuestos de la región dorsal del rombencéfalo caudal con el fin de analizar posibles interacciones tempranas entre axones contralaterales. Se marcaron más de 50 ratones E10 y en alrededor del 80% de ellos se identificaron aposiciones muy cercanas entre axones pioneros y conos de crecimiento de lados opuestos del rombencéfalo en cuanto comienzan a cruzar la línea media (Figura 5C-E). Una vez que el contacto se ha establecido, muchos de estos axones se mantienen en cercana proximidad mientras cruzan (Figura 5E, F) y en algunos casos aún después de que han cruzado la línea media (Figura 5G, H). Estas observaciones son consistentes con la interpretación de que los axones contralaterales interactúan y fasciculan entre sí mientras cruzan la placa del piso. No obstante, no es posible concluir de forma inequívoca la existencia de contactos entre axones sin un análisis ultraestructural detallado. Por medio de microscopía confocal fue posible analizar la proyección de los axones de cada lado del rombencéfalo en

planos focales individuales de series en Z, así como seguir la trayectoria de axones particulares en la placa del piso y más allá de ésta (Figura 6). En un estadio en el que apenas unos pocos axones han decusado, la trayectoria de axones individuales parecía coincidir con axones individuales o con fascículos axonales provenientes del lado contralateral durante la mayor parte de su trayectoria sobre la placa del piso y aún después de cruzar (Figura 6). El hallazgo de que los conos de crecimiento y axones de lados opuestos del rombencéfalo proyectan muy cerca uno de otro en la región de la línea media ventral, sugirió que algún tipo de interacción entre axones que cruzan la línea media tendría un papel relevante en posibilitar la decusación.

FIGURA 6. La trayectoria de los axones decusantes del rombencéfalo caudal parece seguir la de sus contrapartes contralaterales al cruzar la línea media en ratón E10. En A-G: se muestran imágenes obtenidas en el mismo espécimen y en H-N en un espécimen diferente. A-C, H-J: proyecciones en Z de series confocales de axones decusantes del rombencéfalo marcados anterógradamente con Dil (rojo) y DiO (verde) mostrando el montaje de ambos marcajes (A, H), así como la trayectoria de los axones marcados ya sea con Dil (B, I) o DiO (C, J) durante el cruce de la línea media en preparaciones a libro abierto. A-C y H-J son proyecciones de 8 y 7 planos focales respectivamente, tomadas a intervalos de 1 μm . Las líneas punteadas en A y H indican los límites aproximados de la placa del piso y el rectángulo en A corresponde con la región de la imagen mostrada en los montajes de dos colores de planos focales individuales selectos en D-G (D'-G', Dil; D''-G'', DiO). Los dos tipos de flechas en A y H indican diferentes puntos en la trayectoria de los axones donde la marca de Dil parece coincidir con la marca de DiO. Los mismos puntos son indicados por el mismo tipo de flecha en los planos focales mostrados en D-G y en K-N. Barra de escala: 25 μm .



El cruce de la línea media de los axones decusantes del rombencéfalo es impedido por una barrera mecánica unilateral contralateral

Con el fin de evaluar si las interacciones entre axones decusantes contralaterales observadas en estadios tempranos del cruce de la línea media ventral facilitaban este proceso, se interrumpió la proyección de los axones decusantes de un lado del rombencéfalo caudal y se evaluó si los axones contralaterales a ésta eran aún capaces de cruzar. De acuerdo con la predicción, si la interacción entre axones contralaterales en la línea media fuera relevante para su decusación, al bloquear la proyección de un lado del rombencéfalo observaríamos un efecto en la proyección de los axones del lado opuesto. Como fue descrito anteriormente, por medio de marcaje anterógrado con Dil en la porción dorsal de r6 se determinó que los primeros axones decusantes de esta población neuronal comienzan a proyectar hacia la línea media en E9.5 (Figura 7A) para cruzar en E10 (Figura 5C-H), mientras que para E10.5 ya un gran número de axones ha cruzado (Figura 7B). Con el fin de evaluar si el bloqueo por medio de una barrera unilateral tenía un efecto contralateral en el cruce de la línea media de esta población de axones, se desarrolló un cultivo de explantes de rombencéfalo de embriones de estadios E9.5 y E10.5. Después de 2.5 DIV aparece una prominente comisura en los cultivos control de rombencéfalo E9.5 (Figura 7C) mientras que en los cultivos de E10.5 el número de axones decusantes se incrementa considerablemente (Figura 7D). Analizando los patrones de crecimiento axonal de 14 controles E9.5 encontramos que los axones parecen fascicular entre ellos mientras cruzan la línea media y continúan creciendo en línea recta hasta el extremo contralateral

del rombencéfalo (Figura 7C y 8A) mientras que en sólo un caso de 14 se encontraron axones detenidos en la placa del piso (no mostrado). Sin embargo, al colocar una barrera de papel aluminio en el lado derecho del rombencéfalo al principio del cultivo y analizar la proyección del lado contralateral a la barrera por marcaje anterógrado con Dil, se encontró una disminución significativa en la cantidad de axones que eran capaces de cruzar después de 2.5 DIV en cultivos de E9.5 (Figura 7E, 8B-D) pero no en los de E10.5 (Figura 7F). Esto era de esperarse ya que en los cultivos de rombencéfalo de E10.5, al momento de colocar la barrera había ya un número considerable de axones cruzando la línea media (Figura 7B). En los cultivos de explantes de E9.5 con barrera se observaron diferentes comportamientos aberrantes en los axones contralaterales a la barrera. De un total de 14 cultivos, se observó una gran fasciculación de axones en 7 casos, muchos axones virando en dirección longitudinal antes o justo después de cruzar la línea media en 5 casos mientras que en todos los explantes con barrera la mayoría de los axones se encontraban detenidos antes o en la línea media, algunos presentando grandes conos de crecimiento (Figura 7E; 8C, D) o formando marañas desorganizadas mientras cruzaban la línea media (Figura 8B). Con el fin de determinar si la cantidad de axones marcados con Dil que cruzaban la línea media en cultivos de rombencéfalo E9.5 control y con barrera era significativamente diferente, las proyecciones de series en Z de imágenes confocales de cada explante se transformaron a datos binarios, con el fin de controlar posibles diferencias en la intensidad del marcaje fluorescente entre experimentos (ver métodos y figura 8E para mayor detalle). Este análisis permitió calcular el área cubierta por axones

marcados en diferentes regiones a la cual me referiré como “cobertura axonal” tomando en consideración lo siguiente. Dado que el número de pixeles marcados puede estar influenciado por una serie de factores como el número y calibre de los axones así como el grado de fasciculacion y ramificación de los mismos, la “cobertura axonal” únicamente da una aproximación del número total de axones presentes. Esto permitía, sin embargo, detectar cambios importantes en la decusación axonal en las diferentes condiciones analizadas. Se analizaron un total de 14 explantes control y 14 con barrera (después de descartar aquellos en los que la placa del piso estaba dañada) y se compararon con un ANOVA. Se encontró diferencia significativa ($P \leq 0.001$) en el radio de cobertura axonal en lado derecho (después de cruzar) con respecto al izquierdo (antes de cruzar) en explantes con barrera (media $31.6\% \pm 12.8$) en comparación con controles sin barrera (media $64.9\% \pm 14.9$) (Figura 8F). Esto sugería que la barrera estaba bloqueando una señal contralateral necesaria para el cruce de la línea media.

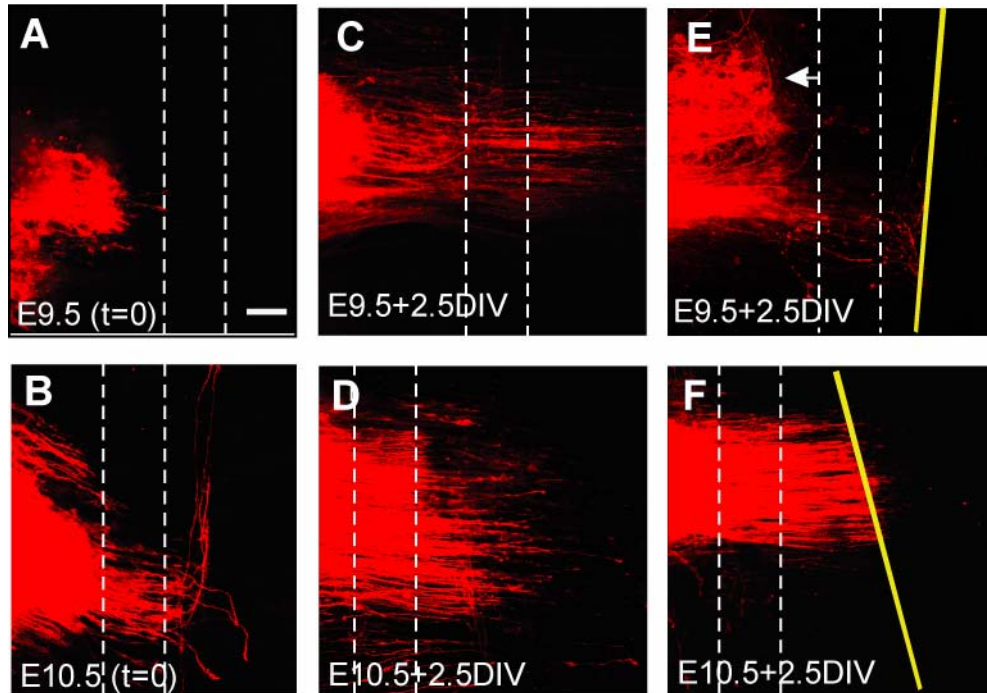


FIGURA 7. El cruce de la línea media de una población de axones decusantes del rombencéfalo caudal marcados con Dil es bloqueado por una barrera mecánica de papel aluminio contralateral a la misma. El marcaje anterógrado con Dil en la porción dorsal izquierda del rombencéfalo caudal de embriones de ratón E9.5 (A) y E10.5 (B) muestra la proyección axonal de un grupo de neuronas decusantes del rombencéfalo en esos estadios de desarrollo (las imágenes en A y B corresponden a las mostradas en Fig. 5A y 5B) y en explantes de rombencéfalo de ratón E9.5 (C) o E10.5 (D) después de 2.5 días *in vitro* (DIV). E y F muestran, respectivamente, explantes de rombencéfalo de ratón E9.5 y E10.5 cultivados por 2.5 DIV con una barrera mecánica unilateral (indicada por las líneas amarillas), seguido de marcaje anterógrado con Dil del lado izquierdo. Las imágenes son proyecciones de series confocales en configuración de libro abierto. La doble línea punteada demarca los límites aproximados de la placa del piso. La flecha en E muestra algunas aberraciones en la proyección de los axones decusantes que no logran cruzar la línea media. Barra de escala: 50 μ m.

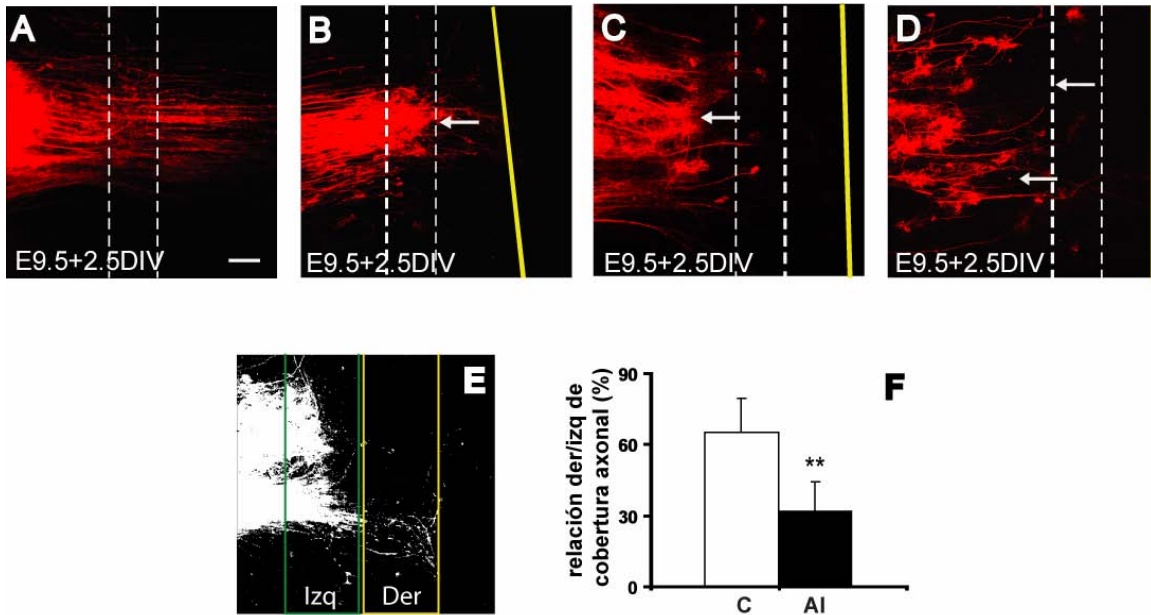


FIGURA 8. Los axones decusantes del rombencéfalo se detienen y proyectan de forma aberrante al alcanzar la línea media en lugar de cruzar en presencia de una barrera contralateral. El marcaje anterógrado unilateral con Dil muestra la proyección de los axones decusantes del rombencéfalo caudal de ratón E9.5 después de 2.5 DIV en un control (A) o en presencia de una barrera contralateral indicada por una línea amarilla (B-D) en configuración de libro abierto. La doble línea punteada demarca los límites de la placa del piso mientras que las flechas muestran ejemplos de las proyecciones aberrantes que llevan a cabo los axones decusantes en lugar de cruzar la línea media. E: Esquema del método utilizado para comparar la cobertura axonal antes y después de la línea media en explantes con y sin barrera, mostrando la transformación binaria de la proyección de una serie en Z de un explante con barrera, así como las regiones a la izquierda (rectángulo verde) y a la derecha (rectángulo amarillo) en donde se calculó el área cubierta por pixeles marcados. F: Relación de cobertura axonal derecha/izquierda sin (control: C) y con barrera (AI) en explantes de rombencéfalo de ratón E9.5 después de 2.5 DIV expresado en porcentaje relativo a la cobertura axonal en el lado izquierdo. Las barras muestran la media y SD de 14 unidades experimentales control y 14 con barrera. Datos analizados por ANOVA, **: $P \leq 0.001$ (ver Materiales y Métodos para más detalles en la determinación de los datos y el análisis estadístico). Barra de escala: 50 μm .

El cruce de la línea media de los axones decusantes del rombencéfalo caudal es bloqueado también por una barrera unilateral permeable sólo a moléculas difusibles

La observación de que el cruce de la línea media de los axones decusantes del rombencéfalo caudal se afectaba en presencia de una barrera unilateral de aluminio colocada en el lado opuesto del rombencéfalo sugería que la barrera estaba bloqueando alguna señal contralateral permisiva. Dado que la barrera de aluminio estaría bloqueando todas las señales provenientes del lado contralateral, se decidió utilizar una barrera que impidiera el paso de conos de crecimiento y axones pero no de moléculas difusibles. Con este fin, se colocó una membrana de policarbonato de tamaño de poro de 15 nm de un lado del rombencéfalo al principio del cultivo y se comparó la cantidad de axones cruzando en estas condiciones con explantes sin barrera o en presencia de una barrera de policarbonato de tamaño de poro de 12 μm . De acuerdo con mediciones reportadas de conos de crecimiento y filopodios, se esperaba que tanto axones como moléculas más pequeñas pudieran cruzar la membrana de poro de 12 μm mientras que la barrera de poro de 15 nm permitiría únicamente la difusión de moléculas (Bouquet et al., 2004; Kohno et al., 2005). Esto fue confirmado al aplicar Dil en el lado derecho de las barreras de membrana de policarbonato, ya que se encontró una proyección abundante, comparable al control sin barrera, pasando a través de la barrera de poro de 12 μm (Figura 9A, B). En contraste a lo observado con la membrana de poro de 12 μm , sólo se observaron unas pocas fibras delgadas en algunos casos con barreras de poro

de 15 nm (Figura 9C). Después de 2.5 DIV los axones decusantes contralaterales a la barrera se marcaron anterógradamente con Dil como fue descrito para los cultivos con barreras de aluminio. La proyección axonal y el cruce de la línea media fue amplia tanto en controles sin barrera (Figura 9D) como en explantes con barreras de tamaño de poro de 12 μm (Figura 9E), pero en los explantes con barreras de tamaño de poro de 15 nm se observó disminución en la cantidad de axones cruzando la línea media (Figura 9F). Se analizó también en este caso la cobertura axonal antes de la línea media (izquierda) y después de cruzar (derecha) en los explantes control y con barreras de 12 μm y 15 nm (ver métodos y figura 8E). Se descartó nuevamente aquellos que parecieran dañados y consideramos un total de 10 embriones por procedimiento experimental. Se obtuvo también el radio de cobertura axonal en el lado derecho con respecto al izquierdo en cada condición experimental y los resultados se analizaron por ANOVA. Se encontró un decremento significativo en la cantidad de axones cruzando la línea media ($P \leq 0.001$) en cultivos con barreras de tamaño de poro de 15 nm (media 38.3% \pm 23.1) en comparación con la barrera de tamaño de poro de 12 μm (media 73.2% \pm 13.1) y explantes sin barrera (media 64.2% \pm 11.8; Figura 9G). En este caso, sin embargo, se observó algo de crecimiento axonal sobre la línea media en todos los explantes con barreras de 15 nm aún cuando la mayoría de ellos no lograban alcanzar el lado contralateral.

Para llevar a cabo una comparación más detallada del comportamiento de los axones en presencia de una barrera contralateral de aluminio versus una

barrera semi-permeable de poro de 15 nm, se calculó la cobertura axonal en la región más dorsal de cada explante y ésta fue utilizada como referencia de la cantidad total (T, 100%) de axones marcados en cada explante (cobertura axonal relativa, más detalles en métodos y figura 10A). Después, se calculó la cobertura axonal relativa justo antes de la placa del piso (izquierda), en la placa del piso (línea media) y justo después de cruzar (derecha) y comparamos cada barrera con sus respectivos controles. Se detectó tanto en controles como en presencia de cualquiera de las barreras que la cantidad de axones disminuye de manera significativa conforme se alejan del punto de origen (porción dorsal). Este resultado era de esperarse ya que no todos los axones proyectan y cruzan la línea media al mismo tiempo (Figura 10B, C). Sin embargo, aún cuando no había diferencias significativas en la cantidad de axones marcados con Dil presentes en la región más dorsal del explante entre controles y cultivos con barrera (ver Material y Métodos), se encontró una diferencia significativa entre controles y explantes con barreras de aluminio en la cobertura axonal relativa justo antes de la línea media (Izquierda, controles: media $84\% \pm 12.4$; barreras: media $59.3\% \pm 24.4$, $P \leq 0.01$), en la línea media (controles: media $60.9\% \pm 19.6$; barreras: media $27.1\% \pm 21.1$, $P \leq 0.001$) y después de cruzar (derecha, controles: media $42\% \pm 21.4$; barreras: media $6.4\% \pm 6.6$, $P \leq 0.001$) (Figura 10B). En presencia de una barrera contralateral de tamaño de poro de 15 nm, por otro lado, sólo se encontraron diferencias significativas después de cruzar (derecha, controles: media $35.2\% \pm 11.4$; barreras: media $13.6\% \pm 18.3$, $P \leq 0.001$) (Figura 10C). En resumen, la barrera sólida tuvo un efecto más importante en el cruce

de la línea media de los axones contralaterales que la barrera de tamaño de poro de 15 nm. Esta observación sugería que alguna señal difusible podría cruzar a través de la membrana de policarbonato de 15 nm pero ésta no sería suficiente por sí misma para permitir que los axones continuaran cruzando hacia el lado contralateral como lo observado en cultivos controles. Sin embargo, considerando todos los resultados en conjunto se puede afirmar que las perturbaciones observadas en el cruce axonal tanto en presencia de una barrera sólida como de una semipermeable apoyaban fuertemente la hipótesis de que las interacciones entre axones decusantes de lados opuestos del rombencéfalo facilitan el cruce de la línea media.

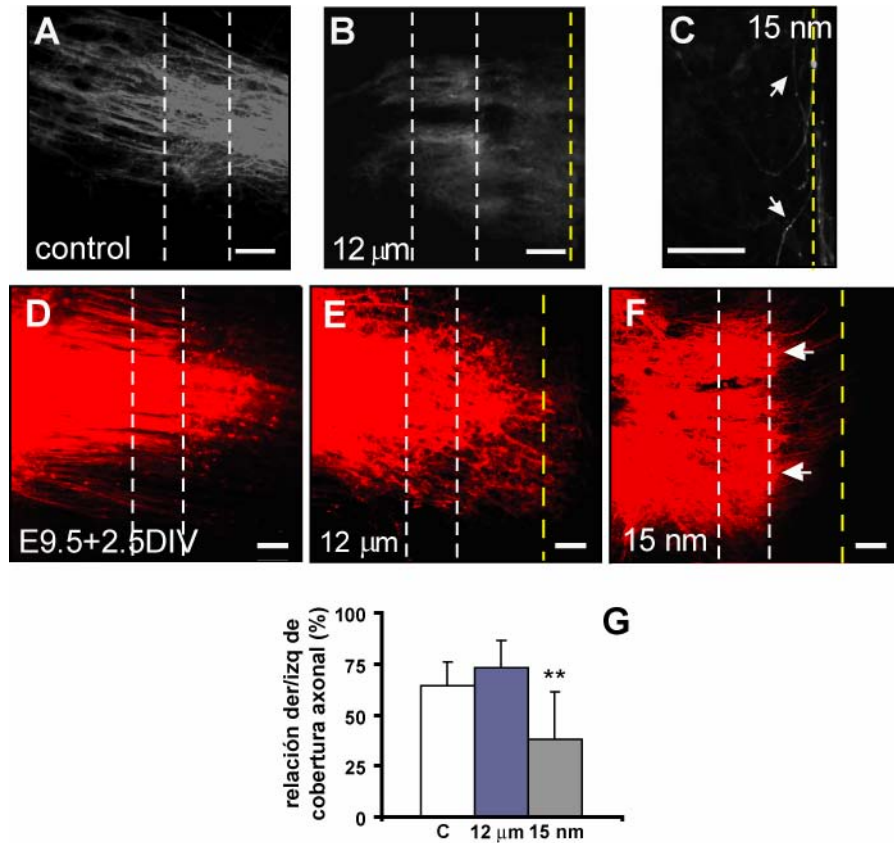


FIGURA 9. La presencia de una barrera unilateral permeable a moléculas pequeñas bloquea también el cruce de la línea media de una población de neuronas decusantes del rombencéfalo caudal marcadas con Dil. A-F: Proyección axonal de neuronas decusantes marcadas con Dil en explantes de rombencéfalo de ratón E9.5 después de 2.5 DIV sin barrera (A, D) y con una barrera unilateral con poros de 12 μm (B, E) o 15 nm (C, F) marcadas con Dil ya sea del mismo lado de la barrera (derecho, A-C) o del lado contralateral a ella (izquierdo, D-F). Las imágenes son proyecciones de series confocales en Z en configuración de libro abierto. La doble línea punteada demarca los límites de la placa del piso (ausentes en C debido al aumento de la imagen) y la línea punteada amarilla, la posición de las membranas porosas. Las flechas en C muestran unas cuantas fibras que proyectan a través de los poros de 15 nm, mientras que las flechas en F indican un grupo de axones que se detiene en la línea media formando marañas desorganizadas. G: Relación de cobertura axonal derecha/izquierda (como en Fig. 8F) en explantes de rombencéfalo de ratón E9.5 sin barrera (control, C), con barrera de poro de 12 μm o de 15 nm después de 2.5 DIV obtenido con el procedimiento ejemplificado en Fig. 8E. Las barras muestran la media de la relación Der/Izq de cobertura axonal (siendo cobertura del lado izquierdo=100%) y la SD de 10 experimentos control y 10 con barrera. Datos analizados por ANOVA **: $P \leq 0.001$ (ver Material y Métodos para detalles). Barra de escala ajustada a 50 μm .

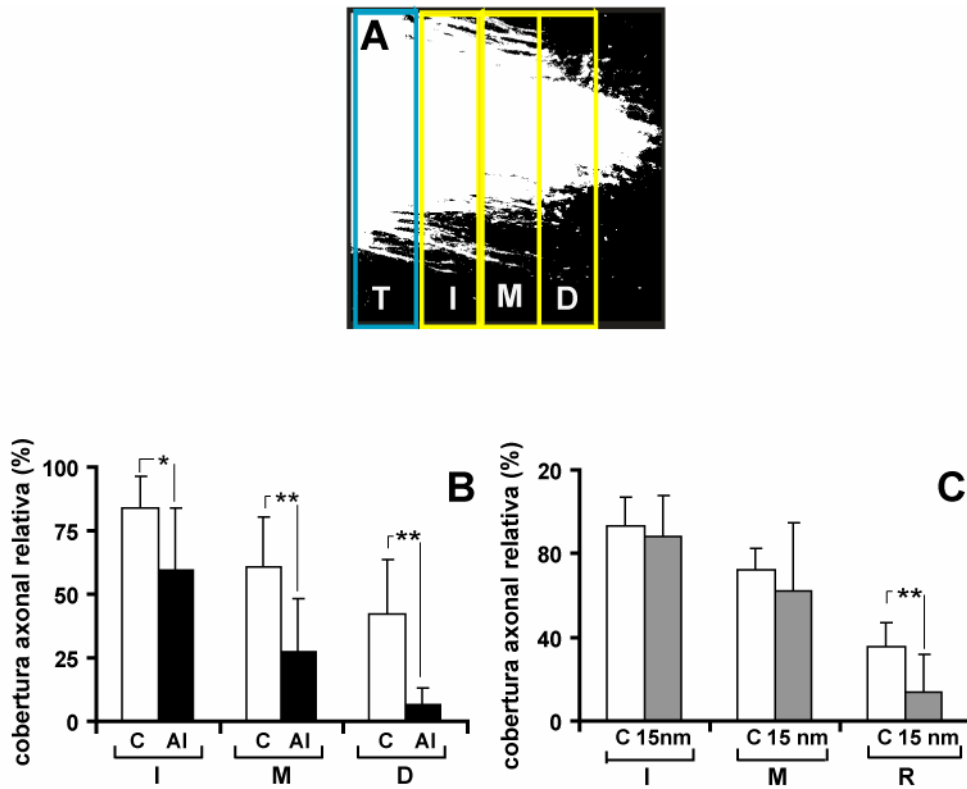


FIGURA 10. Comparación entre el comportamiento de los axones en cultivos sin barrera o en presencia de una barrera contralateral sólida o semi-permeable. A: Ejemplo del método utilizado para comparar la cobertura axonal relativa en diferentes posiciones medio-laterales en explantes con y sin barrera. La imagen muestra la transformación binaria de proyecciones de series en Z de un explante control y la región donde se determinó la cobertura axonal tomada como referencia del total del marcaje axonal (T=100%, rectángulo azul; ver Materiales y Métodos para la descripción), así como en diferentes regiones laterales a mediales en donde también se calculó la cobertura axonal relativa con respecto a T (rectángulos amarillos; I-izquierda, M-línea media y D-derecha). B, C: Cobertura axonal relativa de explantes control y con barrera de aluminio en regiones I, M y D (B) así como en explantes control y con barrera de poro de 15 nm (C). El grupo de explantes en B es el mismo utilizado en la figura 8F. Las barras muestran la media de la cobertura axonal relativa en cada región por explante y SD de 14 unidades experimentales control y 14 con barrera de aluminio para (B), así como 10 experimentos control y 10 con barrera semi-permeable para (C). Datos analizados por ANOVA, *: $P \leq 0.01$ y **: $P \leq 0.001$ (ver Materiales y Métodos para detalles en la determinación de los datos y análisis estadístico).

La barrera unilateral afecta la decusación pero no la cantidad de axones decusantes de una población de neuronas positiva a calbindina, y tampoco afecta la expresión de moléculas guía en la línea media

Se decidió después analizar si la presencia de una barrera unilateral de papel aluminio afectaba también la decusación de una población específica de axones comisurales, tal como se describe anteriormente para los axones marcados con Dil. Utilizando inmunohistoquímica contra calbindina D-28K (CB) en embriones de ratón, se detectó tanto cuerpos celulares como axones de una población de neuronas decusantes del rombencéfalo caudal en la región dorsal de las rombómeras 6 y 7, la cual forma parte de la formación reticular medular (Jacobowitz y Abbott, 1998). En E9.5, cuando los primeros axones marcados con Dil comienzan a alcanzar la línea media del rombencéfalo caudal, no se detectaron cuerpos neuronales ni axones positivos a calbindina en esa región (Figura 11A). Los primeros axones CB cruzando la línea media fueron detectados en E10.5 (Figura 11B, C) y estos forman una comisura completa en E11.5 (Figura 11D).

Para los ensayos *in vitro* se utilizaron ratones E9.5 con el fin de asegurar que no hubiera axones cruzando la línea media en el momento en que se disectó y cultivó el rombencéfalo (Figura 12A). Después de 2.5 DIV hay un gran número de axones CB en el rombencéfalo caudal cruzando la línea media ventral (Figura 12B). No obstante, cuando se colocó una laminilla de papel aluminio del lado derecho del rombencéfalo, lateral a la placa del piso, al principio del cultivo, se observó un decremento considerable en la cantidad de

axones CB del lado contralateral que cruzaban la línea media (Figura 12C, D). Se analizaron un total de 17 cultivos control y 17 con barrera, considerando únicamente aquellos en que la barrera bloqueaba la mayor parte de axones CB laterales a ella. Este resultado es consistente con los resultados con axones marcados con Dil. Por otro lado, si la barrera era colocada en una posición más lateral a la placa del piso o no era suficientemente grande para bloquear todas las neuronas decusantes laterales a ella, un mayor número de axones decusantes cruzaban la línea media formando una comisura (Figura 12E).

Adicionalmente, fue posible detectar cuerpos celulares y axones proyectando de forma aberrante tanto del lado lateral como contralateral a la barrera, lo cual indicaba que la falta de proyección a la línea media no era consecuencia de un efecto tóxico del aluminio en el explante de rombencéfalo (Figuras 12C-E). Para analizar si había una diferencia significativa en la cantidad de axones cruzando la línea media en cultivos control y con barrera, se contó al microscopio de luz la cantidad de axones y fascículos axonales presentes del lado contralateral (izquierda) y en la línea media en la comisura completa en cada explante control y con barrera y los resultados se analizaron por ANOVA. El número de axones presente a la izquierda en un total de 17 explantes con barrera (media 64.3 ± 18.5) fue significativamente mayor al número presente en la línea media (media 29.6 ± 17.6 ; $P \leq 0.001$) (Figura 12F). No se observó esta diferencia en los 17 cultivos control analizados, pero sí había una cantidad significativamente mayor de axones en la línea media en cultivos control (media 70.4 ± 15.4 ; $P \leq 0.001$) que en explantes con barrera (Figura 12F). En resumen, la

presencia de una barrera unilateral de aluminio que evitaba la decusación de los axones laterales a ella, afectó también la decusación de los axones CB contralaterales, corroborando los resultados descritos anteriormente utilizando marcaje anterógrado con Dil. Más aún, el hecho de que se detectaran somas y axones de neuronas CB tanto del lado lateral como contralateral a la barrera indicaba que la barrera de aluminio no tenía un efecto tóxico y no inhibía el crecimiento axonal.

Finalmente, con el fin de evaluar si la disminución en el número de axones decusantes que cruzaban la línea media en presencia de una barrera no era resultado de una alteración considerable en la configuración de la placa del piso, se determinó la localización del ARNm de algunas de las moléculas guía que se expresan en la línea media como Netrina-1, Slit-1 y Slit-2 por hibridación in-situ en explantes de ratón E9.5 después de 2.5 DIV con y sin barrera unilateral de aluminio. La expresión y distribución del ARNm de todas estas moléculas en explantes de rombencéfalo después de 2.5 DIV (Figura 13D-F) fue comparable a la observada en ratón E10.5 (Figura 13A-C) y no se afectó en presencia de una barrera (Figura 13G-I).

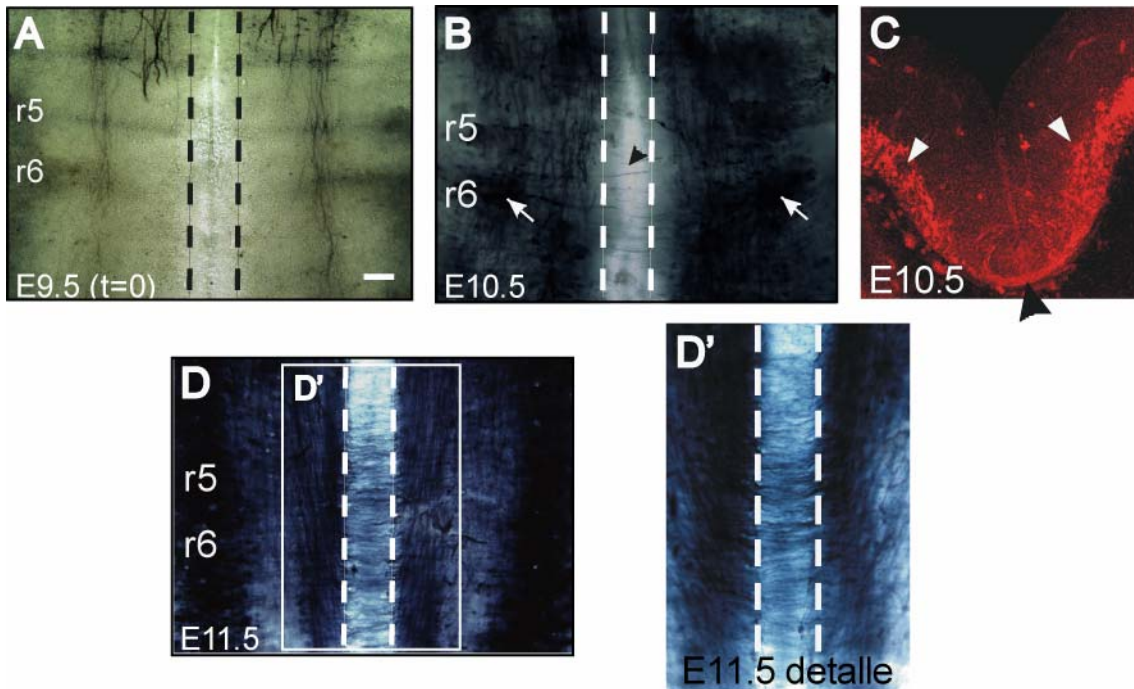


FIGURA 11. Localización y desarrollo ontogenético de una subpoblación de neuronas decusantes positivas a calbindina. A, B, D: Inmunohistoquímica en embrión completo de ratón de diferentes estadios contra calbindina D28K (CB), mostrando una región del rombencéfalo caudal en preparación de libro abierto. La doble línea punteada demarca los límites de la placa del piso. C: Inmunofluorescencia contra CB en un corte transversal de rombencéfalo caudal de ratón de 10.5 días de gestación. En E9.5 no se observan aún células ni axones decusantes positivos a CB en el rombencéfalo caudal (A). Las flechas blancas en B, C muestran las primeras células positivas a CB mientras que la cabeza de flecha negra indica los primeros axones proyectando hacia la línea media. D' señala un acercamiento de la línea media en E11.5 (rectángulo en D) en donde se muestra que para este estadio ya se ha formado una comisura robusta. r: rombómera. Barra de escala: 50 μ m.

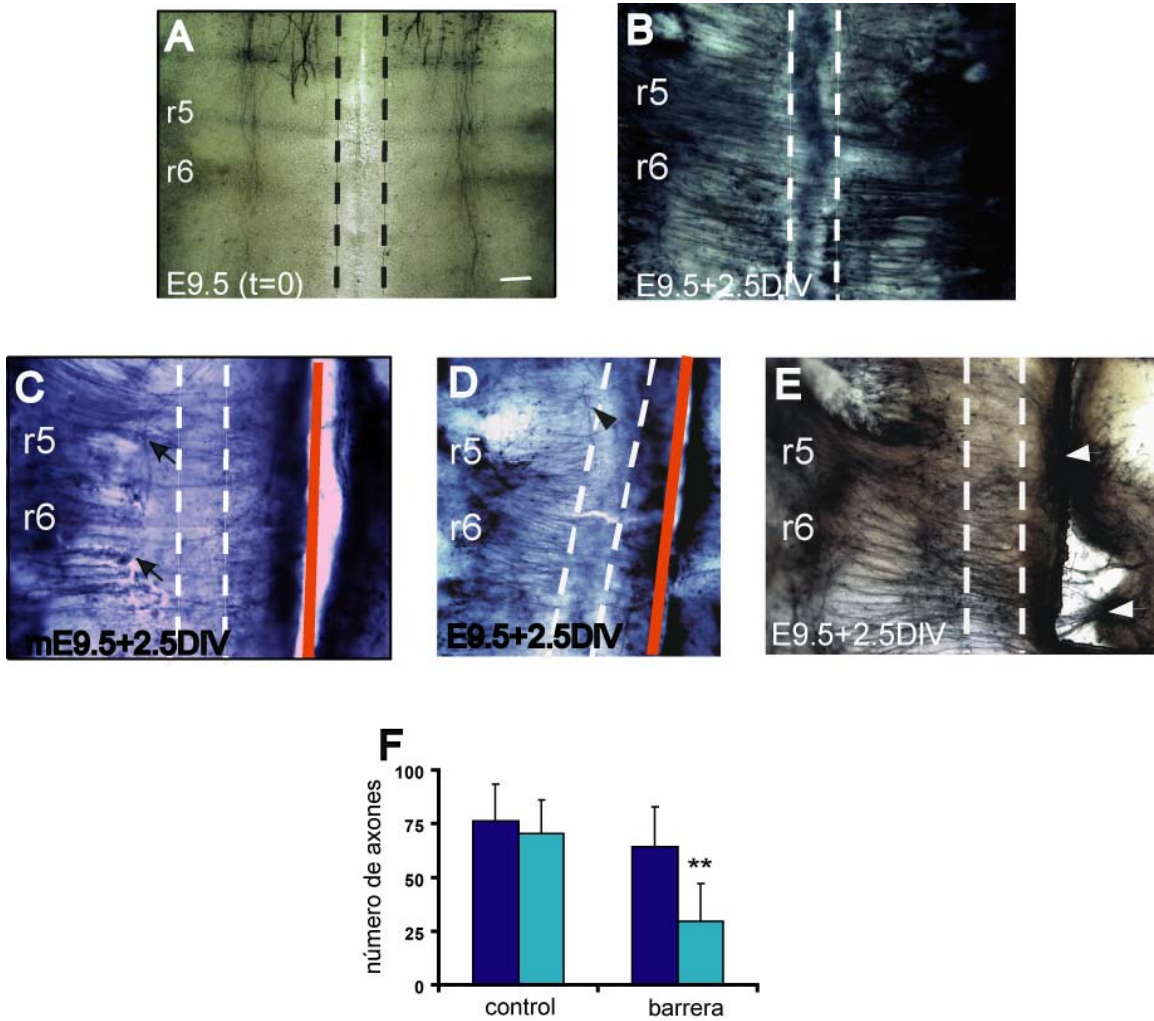


FIGURA 12. Una barrera sólida unilateral bloquea tanto la proyección lateral como contralateral de un sub-grupo de neuronas decusantes del rombencéfalo caudal positivo a calbindina (CB). A-E: Inmunohistoquímica contra CB en embrión completo de ratón (A) y en explantes de rombencéfalo de ratón E9.5 después de 2.5 DIV sin barrera (B) o con una barrera unilateral de papel aluminio (C-E) en configuración de libro abierto. La doble línea punteada demarca los límites de la placa del piso mientras que la línea roja indica la posición de la barrera. r: rombómera. Las flechas en C y D muestran axones proyectando de forma aberrante o detenidos antes de cruzar la línea media mientras que las flechas en E muestran grupos de células en posición lateral a la barrera que no fueron bloqueadas o axones que crecieron por encima de la barrera. F: Promedio del número de axones y/o fascículos axonales contralaterales a la barrera que se acercan al límite de la placa del piso (azul marino) o que se extienden hacia la línea media (azul claro) en cultivos control y con barrera. Las barras muestran la media del número de axones por explante y SD de 17 unidades experimentales control y 17 con barrera. Datos analizados por ANOVA, *: $P \leq 0.001$. Barra de escala: 50 μm .

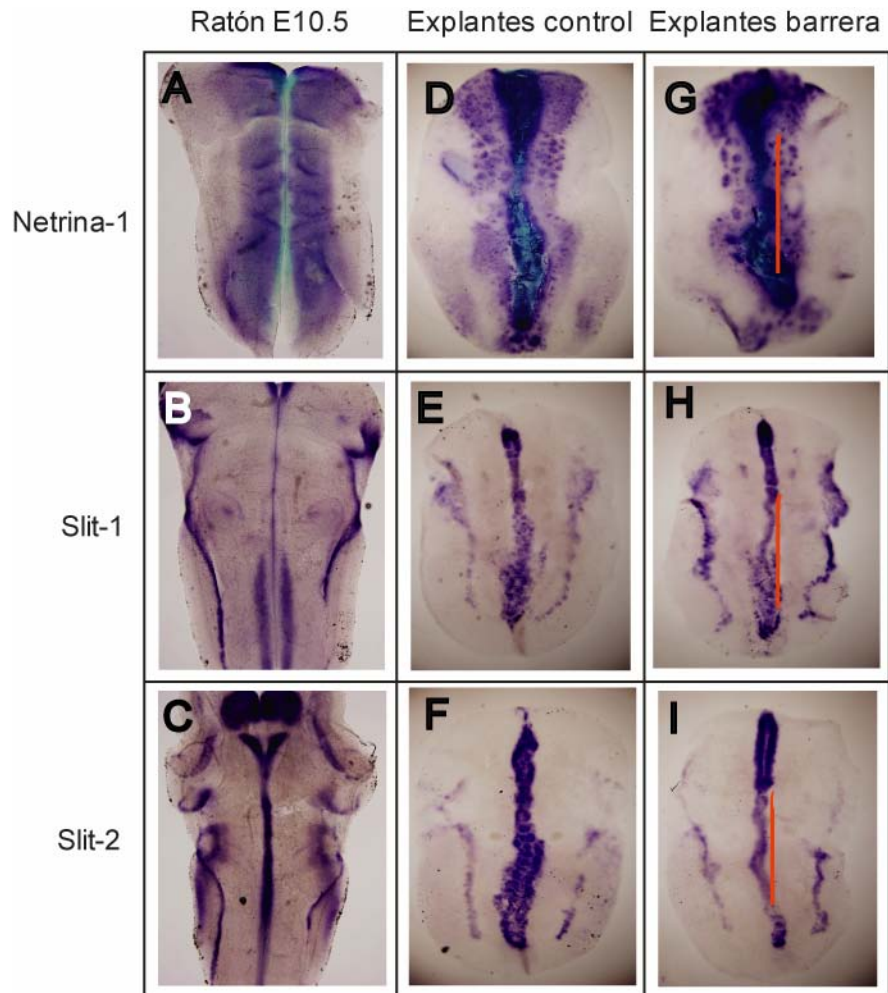


FIGURA 13. La expresión de moléculas guía en la línea media del rombencéfalo se conserva después de 2.5 DIV con y sin barrera. Expresión del ARNm de Netrina-1 (A, D, G), Slit-1 (B, E, H), and Slit-2 (C, F, I). La expresión en el embrión de ratón E10.5 (A-C) es comparable con la encontrada en explantes de rombencéfalo de ratón E9.5 después de 2.5 DIV sin barrera (D-F) y se conserva también después de 2.5 DIV en presencia de una barrera unilateral de aluminio (G-I). La línea roja indica la posición de la barrera en G-I.

Los axones decusantes del rombencéfalo caudal expresan algunas moléculas de adhesión celular y receptores a moléculas guía antes y durante el cruce de la línea media

Con el fin de determinar la identidad de las moléculas involucradas en la interacción axonal que coadyuva al cruce de la línea media antes descrita, se decidió analizar la expresión de algunas de las proteínas que se han encontrado en la superficie de los axones comisurales espinales y cuyo papel en la interacción con moléculas de la placa del piso ha sido ampliamente descrito. De este modo, se realizaron cortes transversales de rombencéfalo de ratón E10.5 y se sometieron a inmunofluorescencia contra TAG-1, NrCAM y L1 (de la familia de las CAMs), Robo-1 y Robo-2 (receptores a Slit) y DCC (receptor a Netrina).

Únicamente TAG-1 se encontró expresado desde la porción dorsal del rombencéfalo caudal, durante toda la trayectoria de los axones decusantes hasta cruzar la placa del piso (Figura 14A), como había sido reportado para las neuronas comisurales de la médula espinal (Dodd et al., 1988). NrCAM se encontró únicamente a nivel de la placa del piso, tanto en las propias células de la placa del piso como en los axones decusantes (Figura 14B), mientras que una ligera expresión de L1 fue detectada en los axones decusantes también durante el cruce (Figura 14C).

En el caso de Robo-1 y Robo-2 se observó una ligera expresión antes del cruce de la línea media que se incrementa considerablemente al momento de cruzar (Figura 14D, E), mientras que DCC se expresa también desde antes de cruzar pero disminuye a nivel de la placa del piso (Figura 14E).

Al comparar la inmunofluorescencia contra calbindina (Figura 11C) con el patrón de expresión de estas moléculas, se puede deducir que las poblaciones de axones decusantes del rombencéfalo caudal en estudio siguen una trayectoria similar a la descrita para las comisurales espinales (Holley, 1982; Wentworth, 1984; Bovolenta y Dodd, 1990; Yaginuma et al., 1991; Colamarino y Tessier-Lavigne, 1995b). Estas neuronas también proyectan ventralmente en el extremo lateral del rombencéfalo, para después virar en dirección ventro-medial hasta llegar a la placa del piso donde forman un fascículo grueso en la cara pial (porción más ventral) del tubo neural (cabezas de flecha en figura 11C y figura 14A-F). Esta fasciculación podría estar determinada por la presencia de señales repelentes presentes en la placa del piso y de acuerdo con lo expuesto en el presente estudio, facilitaría el crecimiento axonal sobre un ambiente adverso.

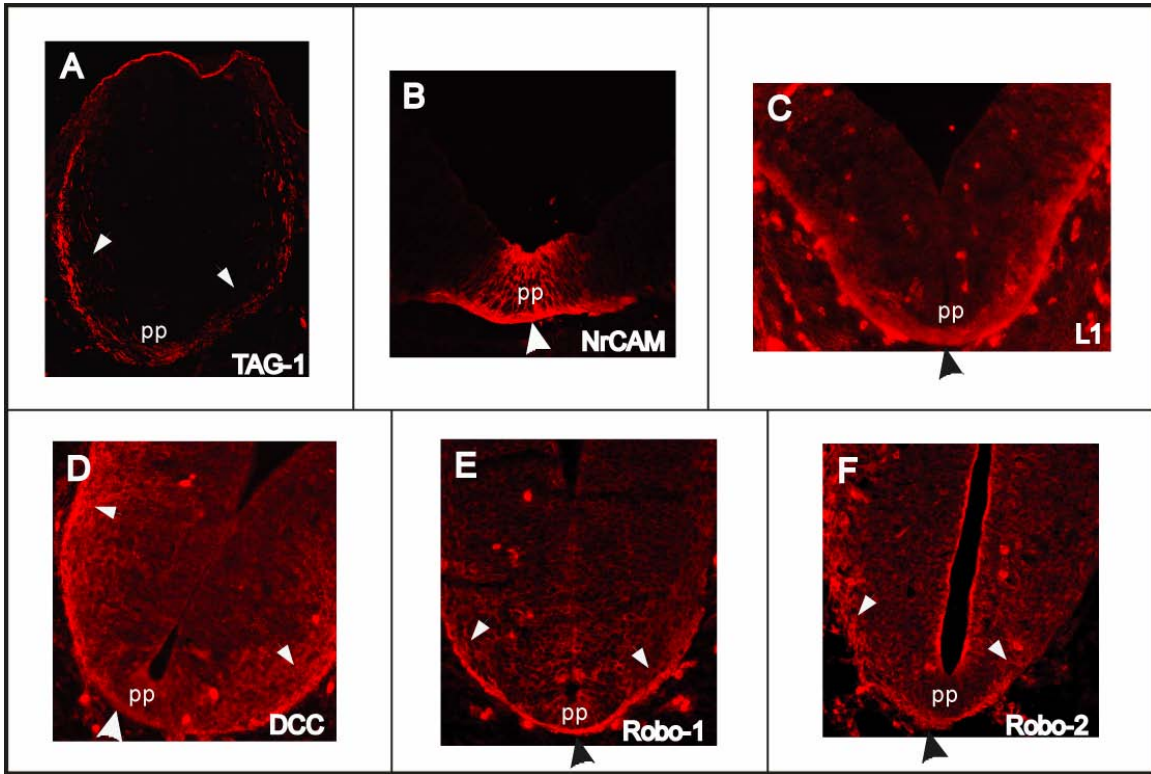


FIGURA 14. Los axones decusantes del rombencéfalo caudal de ratón E10.5 expresan algunas CAMs y receptores a moléculas guía durante el cruce de la línea media. A-F: Inmunofluorescencia en cortes transversales de rombencéfalo caudal de ratón E10.5 mostrando la expresión de TAG-1 (A), NrCAM (B), L1 (C), DCC (D), Robo-1 (E) y Robo-2 (F). Las flechas en A, D-F muestran la expresión de la proteína correspondiente antes del cruce de la línea media, mientras que las cabezas de flecha indican la expresión en un fascículo compacto a nivel de la placa del piso en todos los casos. pp: placa del piso.

DISCUSIÓN

El análisis de la proyección axonal de las neuronas decusantes del rombencéfalo caudal reveló que los conos de crecimiento y axones de neuronas de lados opuestos del cerebro se encuentran en cercana aposición en la línea media. Más aún, al bloquear la extensión de los axones decusantes de un lado del cerebro en el rombencéfalo caudal del ratón en desarrollo se provocó reducción significativa en el cruce de la línea media de los axones contralaterales del lado opuesto del cerebro. Otros experimentos revelaron que los axones decusantes pueden crecer sobre la placa del piso en ausencia de los axones contralaterales si se permitía la difusión de moléculas pequeñas provenientes del lado contralateral, pero dichos axones no fueron capaces de abandonar la línea media. La expresión de señales de guía en la línea media no se ve afectada por la barrera, indicando que la disminución en el cruce de la línea media no se debía a una alteración de las propiedades generales de la misma. Estos resultados sugieren que el cruce de la línea media ocurre en dos pasos: (1) los axones decusantes entran a la placa del piso en respuesta a factores solubles que les permiten sobrellevar señales inhibitorias de la línea media seguido de (2) un importante papel de las interacciones recíprocas entre axones decusantes contralaterales para completar el cruce de la línea media y salir de la placa del piso (Figura 15; detalles más adelante). Los hallazgos sugieren, por primera vez en vertebrados, un mecanismo novedoso por el cual las interacciones entre axones comisurales opuestos pueden facilitar el cruce hacia el lado contralateral.

Los axones decusantes del rombencéfalo crecen en aposición con sus contrapartes contralaterales mientras cruzan la línea media.

Por medio de marcaje anterógrado unilateral con el marcador lipofílico Dil en diferentes estadios de ratón en desarrollo, se determinó que los primeros axones de una población de neuronas de la porción dorsal del rombencéfalo caudal comienzan a cruzar la línea media en E10. Después, por doble marcaje anterógrado con Dil y DiO en E10, se detectaron las interacciones más tempranas entre axones pioneros. Se encontraron múltiples aposiciones cercanas entre axones decusantes de lados opuestos del rombencéfalo mientras cruzaban la línea media, la mayoría en la placa del piso. Las interacciones más tempranas parecen ocurrir entre axones pioneros largos y delgados de neuronas contralaterales (Figura 5C) y se encontraron un gran número de conos de crecimiento provenientes de cada lado del rombencéfalo muy cerca uno de otro (Figura 5D-F). Las primeras interacciones entre axones se observaron cuando uno de ellos había comenzado a cruzar (Figura 5C-F), y posteriormente continúan creciendo en cercana aposición uno de otro durante toda su trayectoria a través de la placa del piso (Figura 6). En algunos casos, se observaron contactos entre conos de crecimiento contralaterales cuando uno de ellos ya había cruzado la línea media (Figura 5G,H), como se había reportado anteriormente en axones de la CPO del pez cebra (Bak y Fraser, 2003). Estas observaciones apoyan la hipótesis de que el papel de dichas interacciones es ayudar a los axones a dejar la línea media. El análisis de imágenes de embriones vivos en lapsos de tiempo permitiría analizar con más detalle la

dinámica de estas interacciones. Algunas interacciones similares entre conos de crecimiento y/o axones en la línea media han sido observadas en la médula espinal de embriones de pollo (Yaginuma et al., 1990; Yaginuma et al., 1991) y rata adulta (Petko et al., 2004). Al marcar con dos marcadores lipofílicos diferentes, en este trabajo fue posible identificar interacciones muy cercanas entre axones provenientes de cada lado del rombencéfalo durante y después del cruce de la línea media. El hecho de detectar interacciones tan frecuentes en una etapa en que solo unos pocos axones han comenzado a cruzar la línea media, sugiere un mecanismo por el cual la fasciculación axonal es favorecida sobre el crecimiento axonal aislado.

Interacciones axonales entre neuronas contralaterales en la línea media como un mecanismo adicional para salir de la placa del piso y consolidar la decusación.

La presencia de una barrera mecánica unilateral bloqueó la decusación de al menos dos diferentes poblaciones de neuronas del rombencéfalo caudal del lado opuesto del cerebro. La mayoría de los axones contralaterales en explantes con barrera se encontraron de hecho detenidos justo antes de cruzar la línea media (Figuras 7E; 8C-D y 9F) y se observó además un número importante de proyecciones aberrantes, principalmente axones virando en dirección longitudinal al acercarse a la línea media pero también se encontró la formación de fascículos gruesos o conos de crecimiento muy grandes (Figuras 7E, 8B-D y 9G).

Al llevar a cabo un análisis detallado de la cantidad de axones por región medio-lateral en cultivos con una barrera sólida, se encontró una cantidad significativa de axones detenidos justo antes de cruzar la línea media mientras que se encontró una reducción del 70% en la cantidad de axones sobre la línea media y de más del 90% después de cruzar, en comparación con 40% y 60%, respectivamente, encontrado en los controles (Figura 10B). Con el fin de detectar posibles alteraciones en las propiedades generales de la región ventral del rombencéfalo debidas a la presencia de una barrera sólida, se analizó la expresión de Netrina-1, Slit-1 y Slit-2, moléculas que se sabe tienen propiedades atractantes o repelentes sobre los axones en crecimiento (Rothberg et al., 1990; Serafini et al., 1994; Mitchell et al., 1996; Long et al., 2004). Dado que, al menos a nivel de ARNm, la expresión de estas moléculas en la línea media se conserva en cultivos control y con barrera (Figura 13), esto sugeriría que la barrera no estaba afectando las propiedades generales de la placa del piso. Más aún, el comportamiento de los axones en cultivos con barrera de aluminio sugeriría que estaban respondiendo a una fuerte señal repelente de la línea media, que normalmente sería contrarrestada por una señal permisiva proveniente del lado contralateral que estaba siendo bloqueada por la barrera. El hallazgo de que los axones comisurales responden a una señal repelente antes de cruzar la línea media, coincide con lo reportado por Stoeckli y Landmesser (1995) y Stoeckli et al. (1997), pero contradice los resultados mostrados por Zuo et al. (2000) y por Sabatier et al. (2004). Los experimentos *in vitro* de Zuo et al., fueron realizados en embriones de ratón E13.5. Dado que los axones comisurales espinales comienzan a cruzar la línea media a los 11.5 días de

gestación, esto sugiere que ellos evaluaron regeneración neuronal más que crecimiento de novo. Por otro lado, el hecho de que los axones respondan a una señal repelente antes de cruzar, sugiere que existe otra señal fuertemente repelente además de Slit en la línea media, o que la inactivación de Robo-2 por Rig-1 no es suficiente para eliminar la respuesta de repulsión.

Al colocar una barrera semipermeable (membranas con poros de 15 nm) para bloquear las proyecciones axonales laterales a ella, se observó que los conos de crecimiento de los axones contralaterales se detenían en la placa del piso y fasciculaban de forma aberrante (Figura 9F). En este caso, sin embargo, se detectó crecimiento axonal en la placa del piso en la mayoría de los cultivos y no hubo diferencia significativa en el porcentaje de axones que crecieron en la línea media entre explantes control y con barrera semi-permeable (Figura 10C). Ésto sugiere que existen señales contralaterales difusibles adicionales que pueden facilitar el cruce o consolidar la decusación. Sin embargo, dado que el rombencéfalo es un sistema simétrico aún queda abierta la pregunta de cómo podría el cono de crecimiento responder a una señal difusible presente en el lado contralateral pero no a la misma señal en el lado ipsilateral. Podría especularse que existe un gradiente dorso-ventral de una molécula difusible cuyo origen estaría en la porción dorsal de la placa basal o de la placa alar del rombencéfalo, la cual se podría sobrelapar en la placa del piso. En esta región, la molécula tendría que alcanzar una concentración superior al umbral necesario para afectar las propiedades ambientales de la placa del piso y/o el comportamiento local del cono de crecimiento. Dicha molécula difusible debía

tener la habilidad de modular la respuesta del cono de crecimiento a señales de guía inhibitorias, como ha sido reportado para la quimiocina (ver glosario) SDF-1 (Chalasanani et al., 2003; Chalasanani et al., 2007). Estas especulaciones serían consistentes con las manipulaciones experimentales mostradas en este trabajo. En presencia de una barrera sólida de un lado del rombencéfalo, la concentración de la señal difusible caería debajo del umbral requerido para bloquear la señal repelente de la línea media y los axones no podrían entrar a la placa del piso (Figura 7E). Por otro lado, la barrera semi-permeable colocada de un lado del rombencéfalo no evitaría que la molécula difusible pudiera alcanzar su concentración normal en la línea media, permitiendo a los axones crecer en la placa del piso (Figura 9F).

No obstante, aún cuando los axones parecían ser capaces de ignorar la señal repelente y crecer en la línea media en presencia de una barrera semi-permeable, su habilidad de continuar creciendo hacia el lado contralateral seguía estando afectada en ausencia de sus homólogos contralaterales. En este caso, habría que considerar la presencia de señales fuertemente atrayentes en la placa del piso como Netrina-1 y Shh (Serafini et al., 1996; Charron et al., 2003), las cuales podrían impedir a los axones seguir adelante a menos que una nueva señal atrayente fuera activada. En el caso de axones comisurales espinales, se ha reportado que algunos receptores para ciertas moléculas guía están presentes en la superficie del axón sólo hasta después de que han cruzado la línea media, proceso que podría estar involucrado en la activación de la respuesta a ciertas señales repelentes de la línea media así como en el cambio

en la dirección de crecimiento rostral que los axones efectúan una vez que han cruzado la línea media (Dodd et al., 1988; Imondi et al., 2000; Zou et al., 2000; Stein y Tessier-Lavigne, 2001). De hecho, de acuerdo con lo reportado por Stein y Tessier-Lavigne (2001), una vez que los axones comisurales han cruzado la línea media, la respuesta a la señal atrayente sería inactivada, alejando a los conos de crecimiento de la línea media e impidiéndoles volver a cruzar. No obstante, en caso de que dicha inactivación estuviera ocurriendo en presencia de una barrera semi-permeable, ésta no sería suficiente para permitir a los axones comisurales continuar creciendo hacia el lado contralateral en ausencia de sus homólogos contralaterales. Alternativamente, los hallazgos aquí mostrados favorecen la hipótesis de que los axones contralaterales que están creciendo sobre la placa del piso podrían actuar recíprocamente como “substrato permisivo” para el crecimiento a través de la línea media hasta el lado contralateral.

Por otro lado, se ha reportado en los axones de la CPO del pez cebra un comportamiento diferencial entre el axón líder y los seguidores (Bak y Fraser, 2003) que podría también tener lugar en los cultivos aquí desarrollados. De hecho, cuando se aplicó la barrera sólida en explantes en los que un número considerable de axones han cruzado la línea media (E10.5), no fue posible bloquear la proyección de axones seguidores que engrosaban la comisura notablemente (comparar figuras 7B y 7F). Ésto sugiere que la interacción entre axones contralaterales que permite el cruce de la línea media, podría

desempeñar un papel más relevante durante la decusación de axones líderes o ser exclusiva de grupos neurales que cruzan más temprano.

Finalmente, con el fin de determinar cuáles proteínas de membrana podrían estar involucradas en dicha interacción entre axones contralaterales en la línea media, se evaluó la expresión de algunas CAMs y receptores a moléculas guía que se expresan en los axones comisurales espinales y que tienen una función determinante en el cruce de la línea media. Aunque los patrones de expresión varían, todas las proteínas evaluadas se expresan en la superficie de los axones decusantes del rombencéfalo caudal mientras cruzan la línea media. En comparación con lo reportado previamente para los axones comisurales espinales (Dodd et al., 1988; Imondi et al., 2000), se encontró expresión de L1 antes y durante el cruce de la línea media (Figura 14C), mientras que la expresión de TAG-1 se mantiene aún después de haber cruzado (Figura 14A). Por ensayos *in vitro* se ha mostrado que las CAMs analizadas en este estudio pueden llevar a cabo interacciones tanto homofílicas como heterofílicas entre sí (rev. en Chiba y Keshishian, 1996) y ésto ha sido mostrado recientemente también para Robo 1 y 2 (Hivert et al., 2002). En particular, la interacción de TAG-1 en la superficie del axón con NrCAM presente en las células de la placa del piso parece ser relevante para el cruce de la línea media mientras que L1 mantiene la fasciculación axonal una vez que los axones han cruzado al lado contralateral, todo esto en las neuronas comisurales espinales de pollo (Stoeckli y Landmesser, 1995). En lo que respecta a Robo-1, Robo-2 y DCC su participación en el cruce de la línea media sólo ha sido evaluado en

función de la interacción con sus ligandos, las proteínas Slit y Netrina, secretadas por células de la placa del piso, y los fenotipos mutantes se han adjudicado a la falta de interacción de estos receptores con sus ligandos rev. en (Kaprielian et al., 2000; Kaprielian et al., 2001). Sin embargo, dada su importancia en el mecanismo de cruce de la línea media y su expresión específica al momento del cruce, alguno o varios de ellos podrían estar participando también en la interacción entre axones contralaterales, facilitando a su vez el cruce de la línea media. Para evaluar esta hipótesis, es necesario generar un modelo *in vitro* que permita llevar a cabo ensayos de pérdida de función de cada una de estas proteínas pero eliminando el contacto directo con las células de la placa del piso, con el fin de distinguir un fenotipo derivado de la falta de interacción con sus ligandos de la disrupción de la interacción homofílica entre receptores presentes en axones provenientes de lados opuestos del rombencéfalo. Una forma de desarrollar estos experimentos sería cultivando en una matriz de colágena de rata un explante de la región caudal del rombencéfalo donde se localizan las neuronas decusantes pero eliminando las células de la placa del piso. Estas células podrían ser colocadas en una capa inferior de colágena con el fin de proveer las señales que atraen el crecimiento de los axones decusantes hacia la línea media, pero evitando el contacto directo de estas moléculas con los axones. Cada lado del explante sería marcado con una molécula lipofílica diferente con el fin de analizar las interacciones entre axones decusantes provenientes de cada lado del rombencéfalo. Así mismo, la función de cada receptor podría ser bloqueada por medio de anticuerpos que reconozcan las regiones extracelulares de los mismos o con dominantes

negativos que compitan por la unión a ligando. La alteración de las interacciones al bloquear la función de alguno de los receptores, podría sugerir que está involucrado en este mecanismo.

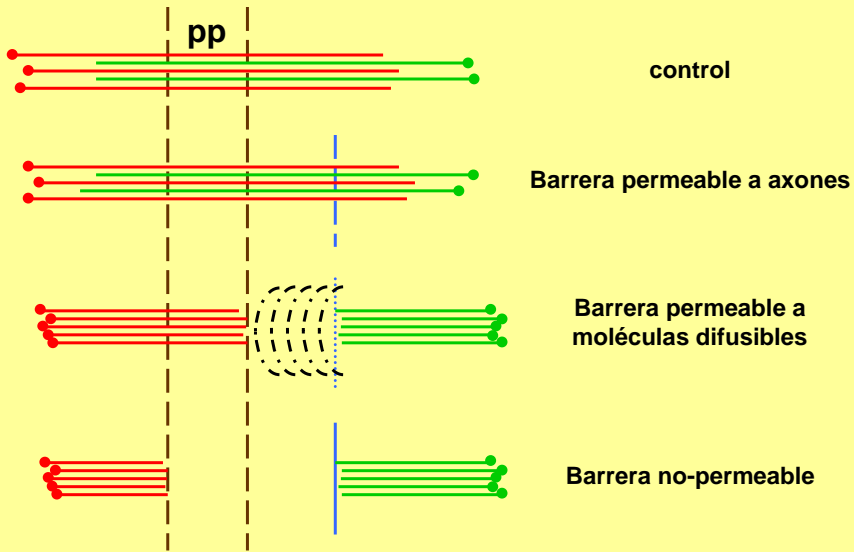
Así mismo, en estadios tempranos del desarrollo de invertebrados es frecuente encontrar entre células acoplamiento eléctrico, por colorantes o ambos, a través de uniones tipo “gap”, el cual va disminuyendo con la edad (Bossinger y Schierenberg, 1992; Wolszon et al., 1994; Boyan et al., 1995). Este acoplamiento podría facilitar la comunicación entre grupos de células específicos al permitir el paso de moléculas de señalización entre ellas (Warner, 1992). En lo que se refiere a vertebrados, se ha propuesto por ejemplo que las uniones transitorias que se forman entre células de la neocorteza de rata, permiten la sincronización de la actividad eléctrica (Peinado et al., 1993) y la generación de la arquitectura columnar (Yuste et al., 1992). En referencia a la línea media, los experimentos de acoplamiento de colorantes llevados a cabo por Boyan et al. (1995) sugieren que en invertebrados la comunicación entre neuronas decusantes en la línea media se lleva a cabo, al menos en parte, por medio de uniones tipo “gap”. Sería importante entonces, diseñar experimentos en vertebrados para determinar si la interacción entre neuronas decusantes encontrada en el presente estudio, podría estar mediada también por acoplamiento eléctrico o por uniones tipo “gap”.

En resumen, los resultados aquí expuestos muestran que al bloquear de forma unilateral la proyección de neuronas comisurales del rombencéfalo hay un decremento en la cantidad de axones que cruzan la línea media y continúan

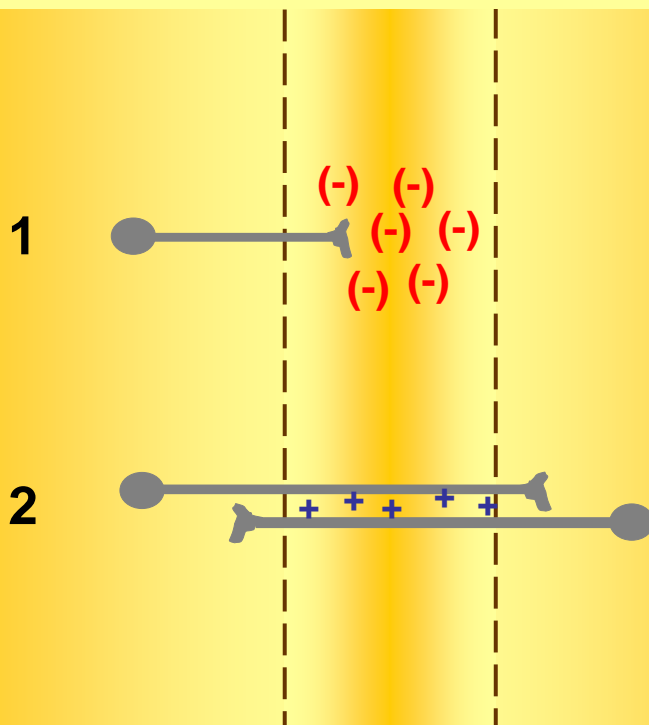
adelante hacia el lado contralateral. La línea media constituye una encrucijada para los conos de crecimiento dado que los expone a múltiples señales tanto atractivas como repelentes. Contrario a lo expuesto por otros grupos de investigación, los hallazgos aquí mostrados sugieren que los axones comisurales responden a una señal repelente antes de cruzar y una vez en la línea media, continúan respondiendo a la señal atractiva a menos que una nueva señal permisiva más atractiva sea activada. La fasciculación axonal entre axones decusantes se propone aquí como un mecanismo que facilita el crecimiento axonal a través de la línea media en presencia de esas señales. Existe un número de ejemplos en el desarrollo del sistema nervioso en los que la fasciculación axonal se ha propuesto como un mecanismo que permite a los axones evitar señales repelentes vecinas y crecer en un ambiente más permisivo (Cloutier et al., 2002; Ringstedt et al., 2000; Yu et al., 2000). En lo que se refiere a la línea media, se ha propuesto que la interacción entre axones contralaterales facilita el cruce de la línea media en invertebrados (Myers y Bastiani, 1993). Estos resultados contribuyen a ampliar el conocimiento acerca de los mecanismos que controlan el cruce de la línea media. Será necesario, en el futuro, diseñar experimentos que permitan evaluar la participación de quimiocinas u otras moléculas difusibles pequeñas, en la respuesta del cono de crecimiento a las señales de la línea media. Así mismo, estudios a futuro permitirán identificar los mecanismos, moléculas y receptores involucrados en las interacciones entre axones contralaterales en la línea media y evaluar su relevancia en la formación de las numerosas poblaciones de neuronas decusantes identificadas a la fecha.

FIGURA 15. Modelo de los mecanismos que controlan el cruce de la línea media ventral de los axones decusantes del rombencéfalo caudal, basado en los hallazgos experimentales obtenidos en el presente trabajo. A: Trayectoria que siguen los axones comisurales en ausencia o en presencia de diferentes tipos de barrera unilateral. La doble línea punteada indica los límites de la placa del piso, mientras que las líneas azules indican la posición de la barrera. Los axones de cada lado del rombencéfalo son mostrados en diferente color siguiendo el código utilizado en el doble marcaje anterógrado con Dil y DiO. B: El cruce de la línea media sería facilitado por un mecanismo en dos pasos: 1. La presencia de una molécula difusible de bajo peso molecular formando un gradiente dorso-ventral en ambos lados del rombencéfalo (mostrado aquí en diferentes tonalidades de amarillo), llegaría a alcanzar una concentración determinada en la placa del piso, en la cual tendría la capacidad de contrarrestar la respuesta a la señal repelente y facilitaría el cruce de la línea media. En presencia de una barrera sólida unilateral, dicha molécula se acumularía en el lado contralateral, rebasando la concentración idónea para su actividad. 2. La interacción entre axones decusantes de lados opuestos del rombencéfalo, competiría con la señal atrayente de la línea media al proveer un sustrato permisivo del crecimiento. Esto facilitaría a los axones salir de la línea media permitiendo, de este modo, la consolidación de la decusación.

A



B



CONCLUSIONES

Los axones comisurales del rombencéfalo caudal del embrión de ratón crecen en cercana aposición con sus contrapartes contralaterales en la línea media mientras cruzan. Al bloquear de forma mecánica la proyección de los axones comisurales de un lado del rombencéfalo, se observó una disminución significativa en la cantidad de axones contralaterales que cruzaba la línea media. En comparación, en presencia de una barrera unilateral permeable a axones, la decusación se formó normalmente. La inmunohistoquímica contra calbindina mostró que la barrera sólida no afecta la cantidad de axones decusantes pero provoca que éstos proyecten de forma aberrante en lugar de cruzar. La expresión de algunas de las moléculas guía en la línea media tampoco se ve afectada en presencia de la barrera. Por otro lado, al colocar una barrera permeable sólo a moléculas pequeñas, los axones decusantes contralaterales crecieron sobre la placa del piso pero no fueron capaces de continuar hacia el lado contralateral del cerebro. Estos resultados sugieren que el cruce de la línea media es controlado en parte por moléculas difusibles que contrarrestan la señal repelente de la línea media y coadyuvan al cruce de los axones contralaterales, así como por interacciones entre axones decusantes que permiten la consolidación de la decusación. Éste constituye un mecanismo novedoso a través del cual, los axones decusantes pueden contrarrestar señales opuestas a su crecimiento en la línea media ventral y continuar así su trayectoria hacia el lado contralateral del cerebro.

Glosario de términos

Colapso. Retracción de filopodios y velos del cono de crecimiento neuronal en respuesta a una señal inhibitoria.

Comisura. Grupo de axones que proyecta a través de la línea media ventral del cerebro.

Cono de crecimiento. Región especializada en el extremo terminal de axones y dendritas en crecimiento que dirige el crecimiento axonal.

Contralateral. Que proyecta hacia el lado opuesto del cerebro.

Decusación. Acto de cruzar la línea media ventral del cerebro.

Heterofílico. Que interacciona con una molécula de diferente especie.

Homofílico. Que interacciona con una molécula de la misma especie.

Ipsilateral. Que proyecta en el mismo lado del cerebro.

Quimioatracción. Proceso de atracción del crecimiento axonal a distancia.

Quimiocina. Hormonas peptídicas relativamente pequeñas, definidas originalmente como quimioatrayentes de leucocitos que participan además en la promoción de la angiogénesis, regulación de la diferenciación de células T y aumento de la sobrevivencia celular (Luster, 1998; Luther y Cyster, 2001).

Quimiorrepulsión. Proceso de repulsión del crecimiento axonal a distancia.

Quimiotrófico. Factor que influye en la supervivencia y crecimiento celular.

Quimiotrópico. Factor que dirige el crecimiento del axón, ya sea por atracción o repulsión del cono de crecimiento.

REFERENCIAS

- Ackerman SL, Kozak LP, Przyborski SA, Rund LA, Boyer BB, Knowles BB. 1997. The mouse rostral cerebellar malformation gene encodes an UNC-5-like protein. *Nature* 386:838-842.
- Augsburger A, Schuchardt A, Hoskins S, Dodd J, Butler S. 1999. BMPs as mediators of roof plate repulsion of commissural neurons. *Neuron* 24:127-141.
- Bagri A, Marin O, Plump AS, Mak J, Pleasure SJ, Rubenstein JL, Tessier-Lavigne M. 2002. Slit proteins prevent midline crossing and determine the dorsoventral position of major axonal pathways in the mammalian forebrain. *Neuron* 33:233-248.
- Bak M, Fraser SE. 2003. Axon fasciculation and differences in midline kinetics between pioneer and follower axons within commissural fascicles. *Development* 130:4999-5008.
- Bashaw GJ, Goodman CS. 1999. Chimeric axon guidance receptors: the cytoplasmic domains of slit and netrin receptors specify attraction versus repulsion. *Cell* 97:917-926.
- Bastiani MJ, Raper JA, Goodman CS. 1984. Pathfinding by neuronal growth cones in grasshopper embryos. III. Selective affinity of the G growth cone for the P cells within the A/P fascicle. *J Neurosci* 4:2311-2328.
- Bastiani MJ, du Lac S, Goodman CS. 1986. Guidance of neuronal growth cones in the grasshopper embryo. I. Recognition of a specific axonal pathway by the pCC neuron. *J Neurosci* 6:3518-3531.
- Bate CM. 1976. Embryogenesis of an insect nervous system. I. A map of the thoracic and abdominal neuroblasts in *Locusta migratoria*. *J Embryol Exp Morphol* 35:107-123.
- Bhat KM. 2005. Slit-roundabout signaling neutralizes netrin-Frazzled-mediated attractant cue to specify the lateral positioning of longitudinal axon pathways. *Genetics* 170:149-159.
- Bossinger O, Schierenberg E. 1992. Cell-cell communication in the embryo of *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol* 151:401-409.
- Bouquet C, Soares S, von Boxberg Y, Ravaille-Veron M, Propst F, Nothias F. 2004. Microtubule-associated protein 1B controls directionality of growth cone migration and axonal branching in regeneration of adult dorsal root ganglia neurons. *J Neurosci* 24:7204-7213.
- Bovolenta P, Dodd J. 1990. Guidance of commissural growth cones at the floor plate in embryonic rat spinal cord. *Development* 109:435-447.
- Boyan G, Therianos S, Williams JL, Reichert H. 1995. Axogenesis in the embryonic brain of the grasshopper *Schistocerca gregaria*: an identified cell analysis of early brain development. *Development* 121:75-86.
- Bray D. 1979. Mechanical tension produced by nerve cells in tissue culture. *J Cell Sci* 37:391-410.
- Bray D, Wood P, Bunge RP. 1980. Selective fasciculation of nerve fibres in culture. *Exp Cell Res* 130:241-250.
- Brose K, Bland KS, Wang KH, Arnott D, Henzel W, Goodman CS, Tessier-Lavigne M, Kidd T. 1999. Slit proteins bind Robo receptors and have an evolutionarily conserved role in repulsive axon guidance. *Cell* 96:795-806.
- Bruckner K, Pasquale EB, Klein R. 1997. Tyrosine phosphorylation of transmembrane ligands for Eph receptors. *Science* 275:1640-1643.
- Brummendorf T, Hubert M, Treubert U, Leuschner R, Tarnok A, Rathjen FG. 1993. The axonal recognition molecule F11 is a multifunctional protein: specific domains mediate interactions with Ng-CAM and restrictin. *Neuron* 10:711-727.
- Brummendorf T, Rathjen FG. 1995. Cell adhesion molecules 1: immunoglobulin superfamily. *Protein Profile* 2:963-1108.
- Caroni P, Schwab ME. 1988. Antibody against myelin-associated inhibitor of neurite growth neutralizes nonpermissive substrate properties of CNS white matter. *Neuron* 1:85-96.
- Castellani V, Chedotal A, Schachner M, Faivre-Sarrailh C, Rougon G. 2000. Analysis of the L1-deficient mouse phenotype reveals cross-talk between Sema3A and L1 signaling pathways in axonal guidance. *Neuron* 27:237-249.

- Catalano SM, Robertson RT, Killackey HP. 1991. Early ingrowth of thalamocortical afferents to the neocortex of the prenatal rat. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:2999-3003.
- Cepeda-Nieto AC, Pfaff SL, Varela-Echavarría A. 2005. Homeodomain transcription factors in the development of subsets of hindbrain reticulospinal neurons. *Mol Cell Neurosci* 28:30-41.
- Chalasanani SH, Sabelko KA, Sunshine MJ, Littman DR, Raper JA. 2003. A chemokine, SDF-1, reduces the effectiveness of multiple axonal repellents and is required for normal axon pathfinding. *J Neurosci* 23:1360-1371.
- Chalasanani SH, Sabol A, Xu H, Gyda MA, Rasband K, Granato M, Chien CB, Raper JA. 2007. Stromal cell-derived factor-1 antagonizes slit/robo signaling in vivo. *J Neurosci* 27:973-980.
- Chan SS, Zheng H, Su MW, Wilk R, Killeen MT, Hedgecock EM, Culotti JG. 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.
- Charron F, Stein E, Jeong J, McMahon AP, Tessier-Lavigne M. 2003. The morphogen sonic hedgehog is an axonal chemoattractant that collaborates with netrin-1 in midline axon guidance. *Cell* 113:11-23.
- Chedotal A, Del Rio JA, Ruiz M, He Z, Borrell V, de Castro F, Ezan F, Goodman CS, Tessier-Lavigne M, Sotelo C, Soriano E. 1998. Semaphorins III and IV repel hippocampal axons via two distinct receptors. *Development* 125:4313-4323.
- Chen H, Chedotal A, He Z, Goodman CS, 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.
- Chen H, He Z, Tessier-Lavigne M. 1998. Axon guidance mechanisms: semaphorins as simultaneous repellents and anti-repellents. *Nat Neurosci* 1:436-439.
- Chen H, Bagri A, Zupicich JA, Zou Y, Stoeckli E, Pleasure SJ, Lowenstein DH, Skarnes WC, Chedotal A, Tessier-Lavigne M. 2000. Neuropilin-2 regulates the development of selective cranial and sensory nerves and hippocampal mossy fiber projections. *Neuron* 25:43-56.
- Chiba A, Keshishian H. 1996. Neuronal pathfinding and recognition: roles of cell adhesion molecules. *Dev Biol* 180:424-432.
- Chitnis AB, Kuwada JY. 1991. Elimination of a brain tract increases errors in pathfinding by follower growth cones in the zebrafish embryo. *Neuron* 7:277-285.
- Chitnis AB, Patel CK, Kim S, Kuwada JY. 1992. A specific brain tract guides follower growth cones in two regions of the zebrafish brain. *J Neurobiol* 23:845-854.
- Ciani L, Salinas PC. 2005. WNTs in the vertebrate nervous system: from patterning to neuronal connectivity. *Nat Rev Neurosci* 6:351-362.
- Cloutier JF, Giger RJ, Koentges G, Dulac C, Kolodkin AL, Ginty DD. 2002. Neuropilin-2 mediates axonal fasciculation, zonal segregation, but not axonal convergence, of primary accessory olfactory neurons. *Neuron* 33:877-892.
- Colamarino SA, Tessier-Lavigne M. 1995a. The axonal chemoattractant netrin-1 is also a chemorepellent for trochlear motor axons. *Cell* 81:621-629.
- Colamarino SA, Tessier-Lavigne M. 1995b. The role of the floor plate in axon guidance. *Annu Rev Neurosci* 18:497-529.
- Cunningham BA, Hemperly JJ, Murray BA, Prediger EA, Brackenbury R, Edelman GM. 1987. Neural cell adhesion molecule: structure, immunoglobulin-like domains, cell surface modulation, and alternative RNA splicing. *Science* 236:799-806.
- Davy A, Robbins SM. 2000. Ephrin-A5 modulates cell adhesion and morphology in an integrin-dependent manner. *Embo J* 19:5396-5405.
- De Carlos JA, O'Leary DD. 1992. Growth and targeting of subplate axons and establishment of major cortical pathways. *J Neurosci* 12:1194-1211.
- Denaxa M, Chan CH, Schachner M, Parnavelas JG, Karagogeos D. 2001. The adhesion molecule TAG-1 mediates the migration of cortical interneurons from the ganglionic eminence along the corticofugal fiber system. *Development* 128:4635-4644.
- Denburg JL, Caldwell RT, Marnier JM. 1995. Developmental changes in epitope accessibility as an indicator of multiple states of an immunoglobulin-like neural cell adhesion molecule. *J Comp Neurol* 354:533-550.

- Dodd J, Morton SB, Karagogeos D, Yamamoto M, Jessell TM. 1988. Spatial regulation of axonal glycoprotein expression on subsets of embryonic spinal neurons. *Neuron* 1:105-116.
- Doherty P, Walsh FS. 1994. Signal transduction events underlying neurite outgrowth stimulated by cell adhesion molecules. *Curr Opin Neurobiol* 4:49-55.
- Drescher U. 1997. The Eph family in the patterning of neural development. *Curr Biol* 7:R799-807.
- Echevarria D, Vieira C, Martinez S. 2001. Mammalian neural tube grafting experiments: an in vitro system for mouse experimental embryology. *Int J Dev Biol* 45:895-902.
- Edelman GM. 1993. A golden age for adhesion. *Cell Adhes Commun* 1:1-7.
- Eisen JS, Pike SH, Debu B. 1989. The growth cones of identified motoneurons in embryonic zebrafish select appropriate pathways in the absence of specific cellular interactions. *Neuron* 2:1097-1104.
- Elkins T, Hortsch M, Bieber AJ, Snow PM, Goodman CS. 1990. *Drosophila* fasciclin I is a novel homophilic adhesion molecule that along with fasciclin III can mediate cell sorting. *J Cell Biol* 110:1825-1832.
- Falk J, Bechara A, Fiore R, Nawabi H, Zhou H, Hoyo-Becerra C, Bozon M, Rougon G, Grumet M, Puschel AW, Sanes JR, Castellani V. 2005. Dual functional activity of semaphorin 3B is required for positioning the anterior commissure. *Neuron* 48:63-75.
- Felsenfeld DP, Hynes MA, Skoler KM, Furley AJ, Jessell TM. 1994. TAG-1 can mediate homophilic binding, but neurite outgrowth on TAG-1 requires an L1-like molecule and beta 1 integrins. *Neuron* 12:675-690.
- Frisen J, Barbacid M. 1997. Genetic analysis of the role of Eph receptors in the development of the mammalian nervous system. *Cell Tissue Res* 290:209-215.
- Frisen J, Yates PA, McLaughlin T, Friedman GC, O'Leary DD, Barbacid M. 1998. Ephrin-A5 (AL-1/RAGS) is essential for proper retinal axon guidance and topographic mapping in the mammalian visual system. *Neuron* 20:235-243.
- Fujisawa H. 2004. [Roles of semaphorins in neuron network formation]. *Nihon Shinkei Seishin Yakurigaku Zasshi* 24:187-192.
- Furley AJ, Morton SB, Manalo D, Karagogeos D, Dodd J, Jessell TM. 1990. The axonal glycoprotein TAG-1 is an immunoglobulin superfamily member with neurite outgrowth-promoting activity. *Cell* 61:157-170.
- Gale NW, Holland SJ, Valenzuela DM, Flenniken A, Pan L, Ryan TE, Henkemeyer M, Strebhardt K, Hirai H, Wilkinson DG, Pawson T, Davis S, Yancopoulos GD. 1996. Eph receptors and ligands comprise two major specificity subclasses and are reciprocally compartmentalized during embryogenesis. *Neuron* 17:9-19.
- Gale NW, Yancopoulos GD. 1997. Ephrins and their receptors: a repulsive topic? *Cell Tissue Res* 290:227-241.
- Gan WB, Macagno ER. 1997. Competition among the axonal projections of an identified neuron contributes to the retraction of some of those projections. *J Neurosci* 17:4293-4301.
- Gao WQ, Macagno ER. 1987. Extension and retraction of axonal projections by some developing neurons in the leech depends upon the existence of neighboring homologues. II. The AP and AE neurons. *J Neurobiol* 18:295-313.
- Gao WQ, Macagno ER. 1988. Axon extension and retraction by leech neurons: severing early projections to peripheral targets prevents normal retraction of other projections. *Neuron* 1:269-277.
- Garbe DS, Bashaw GJ. 2007. Independent functions of Slit-Robo repulsion and Netrin-Frazzled attraction regulate axon crossing at the midline in *Drosophila*. *J Neurosci* 27:3584-3592.
- Garriga G, Desai C, Horvitz HR. 1993. Cell interactions control the direction of outgrowth, branching and fasciculation of the HSN axons of *Caenorhabditis elegans*. *Development* 117:1071-1087.
- Ghosh A, Antonini A, McConnell SK, Shatz CJ. 1990. Requirement for subplate neurons in the formation of thalamocortical connections. *Nature* 347:179-181.
- Giger RJ, Urquhart ER, Gillespie SK, Levengood DV, Ginty DD, Kolodkin AL. 1998. Neuropilin-2 is a receptor for semaphorin IV: insight into the structural basis of receptor function and specificity. *Neuron* 21:1079-1092.

- Giger RJ, Cloutier JF, Sahay A, Prinjha RK, Levensgood DV, Moore SE, Pickering S, Simmons D, Rastan S, Walsh FS, Kolodkin AL, Ginty DD, Geppert M. 2000. Neuropilin-2 is required in vivo for selective axon guidance responses to secreted semaphorins. *Neuron* 25:29-41.
- Godement P, Salaun J, Mason CA. 1990. Retinal axon pathfinding in the optic chiasm: divergence of crossed and uncrossed fibers. *Neuron* 5:173-186.
- Godement P, Wang LC, Mason CA. 1994. Retinal axon divergence in the optic chiasm: dynamics of growth cone behavior at the midline. *J Neurosci* 14:7024-7039.
- Goodman CS. 1996. Mechanisms and molecules that control growth cone guidance. *Annu Rev Neurosci* 19:341-377.
- Goodman CS, Tessier-Lavigne M. 1997. Molecular mechanisms of axon guidance and target recognition. In: Cowan WM, Jessell TM, Zipursky SL, Cowan WM, Jessell TM, Zipursky SLs. *Molecular and Cellular Approaches to Neural Development*. New York, NY, USA: Oxford University Press Inc. p 563.
- Grenningloh G, Bieber AJ, Rehm EJ, Snow PM, Traquina ZR, Hortsch M, Patel NH, Goodman CS. 1990. Molecular genetics of neuronal recognition in *Drosophila*: evolution and function of immunoglobulin superfamily cell adhesion molecules. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 55:327-340.
- Grumet M, Friedlander DR, Edelman GM. 1993. Evidence for the binding of Ng-CAM to laminin. *Cell Adhes Commun* 1:177-190.
- Gundersen RW, Barrett JN. 1979. Neuronal chemotaxis: chick dorsal-root axons turn toward high concentrations of nerve growth factor. *Science* 206:1079-1080.
- Gundersen RW. 1987. Response of sensory neurites and growth cones to patterned substrata of laminin and fibronectin in vitro. *Dev Biol* 121:423-431.
- Guthrie S, Pini A. 1995. Chemorepulsion of developing motor axons by the floor plate. *Neuron* 14:1117-1130.
- Hall AC, Lucas FR, Salinas PC. 2000. Axonal remodeling and synaptic differentiation in the cerebellum is regulated by WNT-7a signaling. *Cell* 100:525-535.
- Hamelin M, Zhou Y, Su MW, Scott IM, Culotti JG. 1993. Expression of the UNC-5 guidance receptor in the touch neurons of *C. elegans* steers their axons dorsally. *Nature* 364:327-330.
- Harrison RG. 1910. The outgrowth of the nerve fiber as a mode of protoplasmic movement. *J Exp Zool* 9:787-846.
- Hatta K, Nose A, Nagafuchi A, Takeichi M. 1988. Cloning and expression of cDNA encoding a neural calcium-dependent cell adhesion molecule: its identity in the cadherin gene family. *J Cell Biol* 106:873-881.
- He Z, Tessier-Lavigne M. 1997. Neuropilin is a receptor for the axonal chemorepellent Semaphorin III. *Cell* 90:739-751.
- Hedgecock EM, Culotti JG, Hall DH. 1990. The unc-5, unc-6, and unc-40 genes guide circumferential migrations of pioneer axons and mesodermal cells on the epidermis in *C. elegans*. *Neuron* 4:61-85.
- Henkemeyer M, Orioli D, Henderson JT, Saxton TM, Roder J, Pawson T, Klein R. 1996. Nuk controls pathfinding of commissural axons in the mammalian central nervous system. *Cell* 86:35-46.
- Hernandez-Montiel HL, Melendez-Herrera E, Cepeda-Nieto AC, Mejia-Viggiano C, Larriva-Sahd J, Guthrie S, Varela-Echavarría A. 2003. Diffusible signals and fasciculated growth in reticulospinal axon pathfinding in the hindbrain. *Dev Biol* 255:99-112.
- Hevner RF, Miyashita-Lin E, Rubenstein JL. 2002. Cortical and thalamic axon pathfinding defects in *Tbr1*, *Gbx2*, and *Pax6* mutant mice: evidence that cortical and thalamic axons interact and guide each other. *J Comp Neurol* 447:8-17.
- Hidalgo A, Brand AH. 1997. Targeted neuronal ablation: the role of pioneer neurons in guidance and fasciculation in the CNS of *Drosophila*. *Development* 124:3253-3262.
- Hindges R, McLaughlin T, Genoud N, Henkemeyer M, O'Leary DD. 2002. EphB forward signaling controls directional branch extension and arborization required for dorsal-ventral retinotopic mapping. *Neuron* 35:475-487.
- Hiramoto M, Hiromi Y. 2006. ROBO directs axon crossing of segmental boundaries by suppressing responsiveness to relocalized Netrin. *Nat Neurosci* 9:58-66.

- Hivert B, Liu Z, Chuang CY, Doherty P, Sundaresan V. 2002. Robo1 and Robo2 are homophilic binding molecules that promote axonal growth. *Mol Cell Neurosci* 21:534-545.
- Holland SJ, Gale NW, Mbamalu G, Yancopoulos GD, Henkemeyer M, Pawson T. 1996. Bidirectional signalling through the EPH-family receptor Nuk and its transmembrane ligands. *Nature* 383:722-725.
- Holley JA. 1982. Early development of the circumferential axonal pathway in mouse and chick spinal cord. *J Comp Neurol* 205:371-382.
- Holmes GP, Negus K, Burridge L, Raman S, Algar E, Yamada T, Little MH. 1998. Distinct but overlapping expression patterns of two vertebrate slit homologs implies functional roles in CNS development and organogenesis. *Mech Dev* 79:57-72.
- Hong K, Hinck L, Nishiyama M, Poo MM, Tessier-Lavigne M, Stein E. 1999. A ligand-gated association between cytoplasmic domains of UNC5 and DCC family receptors converts netrin-induced growth cone attraction to repulsion. *Cell* 97:927-941.
- Huai J, Drescher U. 2001. An ephrin-A-dependent signaling pathway controls integrin function and is linked to the tyrosine phosphorylation of a 120-kDa protein. *J Biol Chem* 276:6689-6694.
- Hutson LD, Chien CB. 2002. Pathfinding and error correction by retinal axons: the role of astray/robo2. *Neuron* 33:205-217.
- Imondi R, Wideman C, Kaprielian Z. 2000. Complementary expression of transmembrane ephrins and their receptors in the mouse spinal cord: a possible role in constraining the orientation of longitudinally projecting axons. *Development* 127:1397-1410.
- Ishii N, Wadsworth WG, Stern BD, Culotti JG, Hedgecock EM. 1992. UNC-6, a laminin-related protein, guides cell and pioneer axon migrations in *C. elegans*. *Neuron* 9:873-881.
- Itoh A, Miyabayashi T, Ohno M, Sakano S. 1998. Cloning and expressions of three mammalian homologues of *Drosophila* slit suggest possible roles for Slit in the formation and maintenance of the nervous system. *Brain Res Mol Brain Res* 62:175-186.
- Jacobowitz DM, Abbott LC. 1998. Chemoarchitectonic atlas of the developing brain. USA: CRC Press.
- Jessell TM. 2000. Neuronal specification in the spinal cord: inductive signals and transcriptional codes. *Nat Rev Genet* 1:20-29.
- Kapfhammer JP, Grunewald BE, Raper JA. 1986. The selective inhibition of growth cone extension by specific neurites in culture. *J Neurosci* 6:2527-2534.
- Kapfhammer JP, Raper JA. 1987. Collapse of growth cone structure on contact with specific neurites in culture. *J Neurosci* 7:201-212.
- Kaprielian Z, Imondi R, Runko E. 2000. Axon guidance at the midline of the developing CNS. *Anat Rec* 261:176-197.
- Kaprielian Z, Runko E, Imondi R. 2001. Axon guidance at the midline choice point. *Dev Dyn* 221:154-181.
- Keino-Masu K, Masu M, Hinck L, Leonardo ED, Chan SS, Culotti JG, Tessier-Lavigne M. 1996. Deleted in Colorectal Cancer (DCC) encodes a netrin receptor. *Cell* 87:175-185.
- Keleman K, Dickson BJ. 2001. Short- and long-range repulsion by the *Drosophila* Unc5 netrin receptor. *Neuron* 32:605-617.
- Keleman K, Rajagopalan S, Cleppien D, Teis D, Paiha K, Huber LA, Technau GM, Dickson BJ. 2002. Comm sorts robo to control axon guidance at the *Drosophila* midline. *Cell* 110:415-427.
- Kennedy TE, Serafini T, de la Torre JR, Tessier-Lavigne M. 1994. Netrins are diffusible chemotropic factors for commissural axons in the embryonic spinal cord. *Cell* 78:425-435.
- Keshishian H, Bentley D. 1983. Embryogenesis of peripheral nerve pathways in grasshopper legs. III. Development without pioneer neurons. *Dev Biol* 96:116-124.
- Keynes R, Cook GM. 1995. Axon guidance molecules. *Cell* 83:161-169.
- Keynes RJ, Stern CD. 1984. Segmentation in the vertebrate nervous system. *Nature* 310:786-789.
- Kidd T, Brose K, Mitchell KJ, Fetter RD, Tessier-Lavigne M, Goodman CS, Tear G. 1998a. Roundabout controls axon crossing of the CNS midline and defines a novel subfamily of evolutionarily conserved guidance receptors. *Cell* 92:205-215.

- Kidd T, Russell C, Goodman CS, Tear G. 1998b. Dosage-sensitive and complementary functions of roundabout and commissureless control axon crossing of the CNS midline. *Neuron* 20:25-33.
- Kitsukawa T, Shimizu M, Sanbo M, Hirata T, Taniguchi M, Bekku Y, Yagi T, Fujisawa H. 1997. Neuropilin-semaphorin III/D-mediated chemorepulsive signals play a crucial role in peripheral nerve projection in mice. *Neuron* 19:995-1005.
- Klamt C, Goodman CS. 1991. Role of the midline glia and neurons in the formation of the axon commissures in the central nervous system of the *Drosophila* embryo. *Ann N Y Acad Sci* 633:142-159.
- Kobayashi H, Koppel AM, Luo Y, Raper JA. 1997. A role for collapsin-1 in olfactory and cranial sensory axon guidance. *J Neurosci* 17:8339-8352.
- Kohno K, Kawakami T, Hiruma H. 2005. Effects of soluble laminin on organelle transport and neurite growth in cultured mouse dorsal root ganglion neurons: difference between primary neurites and branches. *J Cell Physiol* 205:253-261.
- Kolodkin AL, Matthes DJ, O'Connor TP, Patel NH, Admon A, Bentley D, Goodman CS. 1992. Fasciclin IV: sequence, expression, and function during growth cone guidance in the grasshopper embryo. *Neuron* 9:831-845.
- Kolodkin AL. 1996. Semaphorins: mediators of repulsive growth cone guidance. *Trends Cell Biol* 6:15-22.
- Kolodkin AL, Levengood DV, Rowe EG, Tai YT, Giger RJ, Ginty DD. 1997. Neuropilin is a semaphorin III receptor. *Cell* 90:753-762.
- Koppel AM, Feiner L, Kobayashi H, Raper JA. 1997. A 70 amino acid region within the semaphorin domain activates specific cellular response of semaphorin family members. *Neuron* 19:531-537.
- Krantz DE, Zipursky SL. 1990. *Drosophila* chaoptin, a member of the leucine-rich repeat family, is a photoreceptor cell-specific adhesion molecule. *Embo J* 9:1969-1977.
- Krushel LA, Prieto AL, Cunningham BA, Edelman GM. 1993. Expression patterns of the cell adhesion molecule Nr-CAM during histogenesis of the chick nervous system. *Neuroscience* 53:797-812.
- Kuhn TB, Stoeckli ET, Condrau MA, Rathjen FG, Sonderegger P. 1991. Neurite outgrowth on immobilized axonin-1 is mediated by a heterophilic interaction with L1(G4). *J Cell Biol* 115:1113-1126.
- Kyriakopoulou K, de Diego I, Wassef M, Karagogeos D. 2002. A combination of chain and neurophilic migration involving the adhesion molecule TAG-1 in the caudal medulla. *Development* 129:287-296.
- Lemmon V, Burden SM, Payne HR, Elmslie GJ, Hlavin ML. 1992. Neurite growth on different substrates: permissive versus instructive influences and the role of adhesive strength. *J Neurosci* 12:818-826.
- Leonardo ED, Hinck L, Masu M, Keino-Masu K, Ackerman SL, Tessier-Lavigne M. 1997. Vertebrate homologues of *C. elegans* UNC-5 are candidate netrin receptors. *Nature* 386:833-838.
- Letourneau PC. 1975. Cell-to-substratum adhesion and guidance of axonal elongation. *Dev Biol* 44:92-101.
- Leung-Hagesteijn C, Spence AM, Stern BD, Zhou Y, Su MW, Hedgecock EM, Culotti JG. 1992. UNC-5, a transmembrane protein with immunoglobulin and thrombospondin type 1 domains, guides cell and pioneer axon migrations in *C. elegans*. *Cell* 71:289-299.
- Li HS, Chen JH, Wu W, Fagaly T, Zhou L, Yuan W, Dupuis S, Jiang ZH, Nash W, Gick C, Ornitz DM, Wu JY, Rao Y. 1999. Vertebrate slit, a secreted ligand for the transmembrane protein roundabout, is a repellent for olfactory bulb axons. *Cell* 96:807-818.
- Lin DM, Fetter RD, Kopczyński C, Grenningloh G, Goodman CS. 1994. Genetic analysis of Fasciclin II in *Drosophila*: defasciculation, refasciculation, and altered fasciculation. *Neuron* 13:1055-1069.
- Lin DM, Auld VJ, Goodman CS. 1995. Targeted neuronal cell ablation in the *Drosophila* embryo: pathfinding by follower growth cones in the absence of pioneers. *Neuron* 14:707-715.

- Long H, Sabatier C, Ma L, Plump A, Yuan W, Ornitz DM, Tamada A, Murakami F, Goodman CS, Tessier-Lavigne M. 2004. Conserved roles for Slit and Robo proteins in midline commissural axon guidance. *Neuron* 42:213-223.
- Lumsden AG, Davies AM. 1983. Earliest sensory nerve fibres are guided to peripheral targets by attractants other than nerve growth factor. *Nature* 306:786-788.
- Luo Y, Raible D, Raper JA. 1993. Collapsin: a protein in brain that induces the collapse and paralysis of neuronal growth cones. *Cell* 75:217-227.
- Luo Y, Raper JA. 1994. Inhibitory factors controlling growth cone motility and guidance. *Curr Opin Neurobiol* 4:648-654.
- Luo Y, Shepherd I, Li J, Renzi MJ, Chang S, Raper JA. 1995. A family of molecules related to collapsin in the embryonic chick nervous system. *Neuron* 14:1131-1140.
- Luster AD. 1998. Chemokines--chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N Engl J Med* 338:436-445.
- Lustig M, Erskine L, Mason CA, Grumet M, Sakurai T. 2001. Nr-CAM expression in the developing mouse nervous system: ventral midline structures, specific fiber tracts, and neuropilar regions. *J Comp Neurol* 434:13-28.
- Luther SA, Cyster JG. 2001. Chemokines as regulators of T cell differentiation. *Nat Immunol* 2:102-107.
- Lyuksyutova AI, Lu CC, Milanesio N, King LA, Guo N, Wang Y, Nathans J, Tessier-Lavigne M, Zou Y. 2003. Anterior-posterior guidance of commissural axons by Wnt-frizzled signaling. *Science* 302:1984-1988.
- Mann F, Ray S, Harris W, Holt C. 2002. Topographic mapping in dorsoventral axis of the *Xenopus* retinotectal system depends on signaling through ephrin-B ligands. *Neuron* 35:461-473.
- Matise MP, Lustig M, Sakurai T, Grumet M, Joyner AL. 1999. Ventral midline cells are required for the local control of commissural axon guidance in the mouse spinal cord. *Development* 126:3649-3659.
- McConnell SK, Ghosh A, Shatz CJ. 1989. Subplate neurons pioneer the first axon pathway from the cerebral cortex. *Science* 245:978-982.
- Messersmith EK, Leonardo ED, Shatz CJ, Tessier-Lavigne M, Goodman CS, Kolodkin AL. 1995. Semaphorin III can function as a selective chemorepellent to pattern sensory projections in the spinal cord. *Neuron* 14:949-959.
- Mitchell KJ, Doyle JL, Serafini T, Kennedy TE, Tessier-Lavigne M, Goodman CS, Dickson BJ. 1996. Genetic analysis of Netrin genes in *Drosophila*: Netrins guide CNS commissural axons and peripheral motor axons. *Neuron* 17:203-215.
- Molnar Z, Blakemore C. 1995. How do thalamic axons find their way to the cortex? *Trends Neurosci* 18:389-397.
- Monschau B, Kremoser C, Ohta K, Tanaka H, Kaneko T, Yamada T, Handwerker C, Hornberger MR, Loschinger J, Pasquale EB, Siever DA, Verderame MF, Muller BK, Bonhoeffer F, Drescher U. 1997. Shared and distinct functions of RAGS and ELF-1 in guiding retinal axons. *Embo J* 16:1258-1267.
- Montgomery AM, Becker JC, Siu CH, Lemmon VP, Cheresch DA, Pancook JD, Zhao X, Reisfeld RA. 1996. Human neural cell adhesion molecule L1 and rat homologue NILE are ligands for integrin alpha v beta 3. *J Cell Biol* 132:475-485.
- Morales G, Hubert M, Brummendorf T, Treubert U, Tarnok A, Schwarz U, Rathjen FG. 1993. Induction of axonal growth by heterophilic interactions between the cell surface recognition proteins F11 and Nr-CAM/Bravo. *Neuron* 11:1113-1122.
- Murphy-Erdosh C, Yoshida CK, Paradies N, Reichardt LF. 1995. The cadherin-binding specificities of B-cadherin and LCAM. *J Cell Biol* 129:1379-1390.
- Myers PZ, Bastiani MJ. 1993. Cell-cell interactions during the migration of an identified commissural growth cone in the embryonic grasshopper. *J Neurosci* 13:115-126.
- Nakamoto M, Cheng HJ, Friedman GC, McLaughlin T, Hansen MJ, Yoon CH, O'Leary DD, Flanagan JG. 1996. Topographically specific effects of ELF-1 on retinal axon guidance in vitro and retinal axon mapping in vivo. *Cell* 86:755-766.
- Nakamura F, Kalb RG, Strittmatter SM. 2000. Molecular basis of semaphorin-mediated axon guidance. *J Neurobiol* 44:219-229.

- Nguyen Ba-Charvet KT, Brose K, Marillat V, Kidd T, Goodman CS, Tessier-Lavigne M, Sotelo C, Chedotal A. 1999. Slit2-Mediated chemorepulsion and collapse of developing forebrain axons. *Neuron* 22:463-473.
- Nose A, Mahajan VB, Goodman CS. 1992. Connectin: a homophilic cell adhesion molecule expressed on a subset of muscles and the motoneurons that innervate them in *Drosophila*. *Cell* 70:553-567.
- Oakley RA, Tosney KW. 1993. Contact-mediated mechanisms of motor axon segmentation. *J Neurosci* 13:3773-3792.
- Oda H, Uemura T, Harada Y, Iwai Y, Takeichi M. 1994. A *Drosophila* homolog of cadherin associated with armadillo and essential for embryonic cell-cell adhesion. *Dev Biol* 165:716-726.
- Pandey A, Duan H, Dixit VM. 1995. Characterization of a novel Src-like adapter protein that associates with the Eck receptor tyrosine kinase. *J Biol Chem* 270:19201-19204.
- Pasquale EB. 2005. Eph receptor signalling casts a wide net on cell behaviour. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6:462-475.
- Pavlou O, Theodorakis K, Falk J, Kutsche M, Schachner M, Faivre-Sarrailh C, Karagogeos D. 2002. Analysis of interactions of the adhesion molecule TAG-1 and its domains with other immunoglobulin superfamily members. *Mol Cell Neurosci* 20:367-381.
- Peinado A, Yuste R, Katz LC. 1993. Gap junctional communication and the development of local circuits in neocortex. *Cereb Cortex* 3:488-498.
- Petko M, Veress G, Vereb G, Storm-Mathisen J, Antal M. 2004. Commissural propriospinal connections between the lateral aspects of laminae III-IV in the lumbar spinal cord of rats. *J Comp Neurol* 480:364-377.
- Pike SH, Melancon EF, Eisen JS. 1992. Pathfinding by zebrafish motoneurons in the absence of normal pioneer axons. *Development* 114:825-831.
- Pini A. 1993. Chemorepulsion of axons in the developing mammalian central nervous system. *Science* 261:95-98.
- Placzek M, Tessier-Lavigne M, Jessell T, Dodd J. 1990. Orientation of commissural axons in vitro in response to a floor plate-derived chemoattractant. *Development* 110:19-30.
- Plump AS, Erskine L, Sabatier C, Brose K, Epstein CJ, Goodman CS, Mason CA, Tessier-Lavigne M. 2002. Slit1 and Slit2 cooperate to prevent premature midline crossing of retinal axons in the mouse visual system. *Neuron* 33:219-232.
- Rader C, Stoekli ET, Ziegler U, Osterwalder T, Kunz B, Sonderegger P. 1993. Cell-cell adhesion by homophilic interaction of the neuronal recognition molecule axonin-1. *Eur J Biochem* 215:133-141.
- Rajagopalan S, Vivancos V, Nicolas E, Dickson BJ. 2000. Selecting a longitudinal pathway: Robo receptors specify the lateral position of axons in the *Drosophila* CNS. *Cell* 103:1033-1045.
- Ramón y Cajal S. 1892. La rétine des vertébrés. *La Cellule* 9:119-258.
- Ramón y Cajal S. 1909. *Histologie du système nerveux de l'homme et des vertèbres*. Paris: A. Maloine.
- Raper JA, Bastiani M, Goodman CS. 1983a. Pathfinding by neuronal growth cones in grasshopper embryos. II. Selective fasciculation onto specific axonal pathways. *J Neurosci* 3:31-41.
- Raper JA, Bastiani M, Goodman CS. 1983b. Pathfinding by neuronal growth cones in grasshopper embryos. I. Divergent choices made by the growth cones of sibling neurons. *J Neurosci* 3:20-30.
- Raper JA, Bastiani MJ, Goodman CS. 1984. Pathfinding by neuronal growth cones in grasshopper embryos. IV. The effects of ablating the A and P axons upon the behavior of the G growth cone. *J Neurosci* 4:2329-2345.
- Raper JA. 2000. Semaphorins and their receptors in vertebrates and invertebrates. *Curr Opin Neurobiol* 10:88-94.
- Rashid T, Upton AL, Blentic A, Ciossek T, Knoll B, Thompson ID, Drescher U. 2005. Opposing gradients of ephrin-As and EphA7 in the superior colliculus are essential for topographic mapping in the mammalian visual system. *Neuron* 47:57-69.

- Ringstedt T, Braisted JE, Brose K, Kidd T, Goodman C, Tessier-Lavigne M, O'Leary DD. 2000. Slit inhibition of retinal axon growth and its role in retinal axon pathfinding and innervation patterns in the diencephalon. *J Neurosci* 20:4983-4991.
- Rohm B, Ottemeyer A, Lohrum M, Puschel AW. 2000. Plexin/neuropilin complexes mediate repulsion by the axonal guidance signal semaphorin 3A. *Mech Dev* 93:95-104.
- Rothberg JM, Jacobs JR, Goodman CS, Artavanis-Tsakonas S. 1990. slit: an extracellular protein necessary for development of midline glia and commissural axon pathways contains both EGF and LRR domains. *Genes Dev* 4:2169-2187.
- Rutishauser U. 1993. Adhesion molecules of the nervous system. *Curr Opin Neurobiol* 3:709-715.
- Sabatier C, Plump AS, Le M, Brose K, Tamada A, Murakami F, Lee EY, Tessier-Lavigne M. 2004. The divergent Robo family protein rig-1/Robo3 is a negative regulator of slit responsiveness required for midline crossing by commissural axons. *Cell* 117:157-169.
- Sagasti A, Guido MR, Raible DW, Schier AF. 2005. Repulsive interactions shape the morphologies and functional arrangement of zebrafish peripheral sensory arbors. *Curr Biol* 15:804-814.
- Sahay A, Molliver ME, Ginty DD, Kolodkin AL. 2003. Semaphorin 3F is critical for development of limbic system circuitry and is required in neurons for selective CNS axon guidance events. *J Neurosci* 23:6671-6680.
- Seeger M, Tear G, Ferres-Marco D, Goodman CS. 1993. Mutations affecting growth cone guidance in *Drosophila*: genes necessary for guidance toward or away from the midline. *Neuron* 10:409-426.
- Serafini T, Kennedy TE, Galko MJ, Mirzayan C, Jessell TM, Tessier-Lavigne M. 1994. The netrins define a family of axon outgrowth-promoting proteins homologous to *C. elegans* UNC-6. *Cell* 78:409-424.
- Serafini T, Colamarino SA, Leonardo ED, Wang H, Beddington R, Skarnes WC, Tessier-Lavigne M. 1996. Netrin-1 is required for commissural axon guidance in the developing vertebrate nervous system. *Cell* 87:1001-1014.
- Shapiro L, Kwong PD, Fannon AM, Colman DR, Hendrickson WA. 1995. Considerations on the folding topology and evolutionary origin of cadherin domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:6793-6797.
- Shiga T, Oppenheim RW, Grumet M, Edelman GM. 1990. Neuron-glia cell adhesion molecule (Ng-CAM) expression in the chick embryo spinal cord: observations on the earliest developing intersegmental interneurons. *Brain Res Dev Brain Res* 55:209-217.
- Shiga T, Oppenheim RW. 1991. Immunolocalization studies of putative guidance molecules used by axons and growth cones of intersegmental interneurons in the chick embryo spinal cord. *J Comp Neurol* 310:234-252.
- Shirasaki R, Tamada A, Katsumata R, Murakami F. 1995. Guidance of cerebellofugal axons in the rat embryo: directed growth toward the floor plate and subsequent elongation along the longitudinal axis. *Neuron* 14:961-972.
- Shirasaki R, Mirzayan C, Tessier-Lavigne M, Murakami F. 1996. Guidance of circumferentially growing axons by netrin-dependent and -independent floor plate chemotropism in the vertebrate brain. *Neuron* 17:1079-1088.
- Shu T, Sundaresan V, McCarthy MM, Richards LJ. 2003. Slit2 guides both precrossing and postcrossing callosal axons at the midline in vivo. *J Neurosci* 23:8176-8184.
- Simpson JH, Kidd T, Bland KS, Goodman CS. 2000. Short-range and long-range guidance by slit and its Robo receptors. Robo and Robo2 play distinct roles in midline guidance. *Neuron* 28:753-766.
- Speidel CC. 1941. Adjustments to nerve endings. *Harvey Lect* 36:126-158.
- Sperry RW. 1963. Chemoaffinity in the Orderly Growth of Nerve Fiber Patterns and Connections. *Proc Natl Acad Sci U S A* 50:703-710.
- Squire LR, Bloom FE, McConnell SK, Roberts JL, Spitzer NC, Zigmond MJ. 2003. *Fundamental Neuroscience*. San Diego, California, USA: Academic Press. 1426.
- Sretavan DW. 1990. Specific routing of retinal ganglion cell axons at the mammalian optic chiasm during embryonic development. *J Neurosci* 10:1995-2007.
- Stein E, Tessier-Lavigne M. 2001. Hierarchical organization of guidance receptors: silencing of netrin attraction by slit through a Robo/DCC receptor complex. *Science* 291:1928-1938.

- Stoeckli ET, Kuhn TB, Duc CO, Ruegg MA, Sonderegger P. 1991. The axonally secreted protein axonin-1 is a potent substratum for neurite growth. *J Cell Biol* 112:449-455.
- Stoeckli ET, Landmesser LT. 1995. Axonin-1, Nr-CAM, and Ng-CAM play different roles in the in vivo guidance of chick commissural neurons. *Neuron* 14:1165-1179.
- Stoeckli ET, Sonderegger P, Pollerberg GE, Landmesser LT. 1997. Interference with axonin-1 and NrCAM interactions unmasks a floor-plate activity inhibitory for commissural axons. *Neuron* 18:209-221.
- Suter DM, Pollerberg GE, Buchstaller A, Giger RJ, Dreyer WJ, Sonderegger P. 1995. Binding between the neural cell adhesion molecules axonin-1 and Nr-CAM/Bravo is involved in neuron-glia interaction. *J Cell Biol* 131:1067-1081.
- Takahashi T, Nakamura F, Jin Z, Kalb RG, Strittmatter SM. 1998. Semaphorins A and E act as antagonists of neuropilin-1 and agonists of neuropilin-2 receptors. *Nat Neurosci* 1:487-493.
- Takahashi T, Fournier A, Nakamura F, Wang LH, Murakami Y, Kalb RG, Fujisawa H, Strittmatter SM. 1999. Plexin-neuropilin-1 complexes form functional semaphorin-3A receptors. *Cell* 99:59-69.
- Takeichi M. 1995. Morphogenetic roles of classic cadherins. *Curr Opin Cell Biol* 7:619-627.
- Takeshita S, Kikuno R, Tezuka K, Amann E. 1993. Osteoblast-specific factor 2: cloning of a putative bone adhesion protein with homology with the insect protein fasciclin I. *Biochem J* 294 (Pt 1):271-278.
- Tamada A, Shirasaki R, Murakami F. 1995. Floor plate chemoattracts crossed axons and chemorepels uncrossed axons in the vertebrate brain. *Neuron* 14:1083-1093.
- Tamagnone L, Artigiani S, Chen H, He Z, Ming GI, Song H, Chedotal A, Winberg ML, Goodman CS, Poo M, Tessier-Lavigne M, Comoglio PM. 1999. Plexins are a large family of receptors for transmembrane, secreted, and GPI-anchored semaphorins in vertebrates. *Cell* 99:71-80.
- Tang J, Landmesser L, Rutishauser U. 1992. Polysialic acid influences specific pathfinding by avian motoneurons. *Neuron* 8:1031-1044.
- Tang J, Rutishauser U, Landmesser L. 1994. Polysialic acid regulates growth cone behavior during sorting of motor axons in the plexus region. *Neuron* 13:405-414.
- Taniguchi M, Yuasa S, Fujisawa H, Naruse I, Saga S, Mishina M, Yagi T. 1997. Disruption of semaphorin III/D gene causes severe abnormality in peripheral nerve projection. *Neuron* 19:519-530.
- Tessier-Lavigne M, Placzek M, Lumsden AG, Dodd J, Jessell TM. 1988. Chemotropic guidance of developing axons in the mammalian central nervous system. *Nature* 336:775-778.
- Tessier-Lavigne M. 1992. Axon guidance by molecular gradients. *Curr Opin Neurobiol* 2:60-65.
- Tessier-Lavigne M. 1994. Axon guidance by diffusible repellants and attractants. *Curr Opin Genet Dev* 4:596-601.
- Tessier-Lavigne M, Goodman CS. 1996. The molecular biology of axon guidance. *Science* 274:1123-1133.
- Tosney KW, Landmesser LT. 1985. Growth cone morphology and trajectory in the lumbosacral region of the chick embryo. *J Neurosci* 5:2345-2358.
- Tosney KW. 1987. Proximal tissues and patterned neurite outgrowth at the lumbosacral level of the chick embryo: deletion of the dermamyotome. *Dev Biol* 122:540-558.
- Tuzi NL, Gullick WJ. 1994. eph, the largest known family of putative growth factor receptors. *Br J Cancer* 69:417-421.
- Varela-Echavarria A, Pfaff SL, Guthrie S. 1996. Differential expression of LIM homeobox genes among motor neuron subpopulations in the developing chick brain stem. *Mol Cell Neurosci* 8:242-257.
- Varela-Echavarria A, Tucker A, Puschel AW, Guthrie S. 1997. Motor axon subpopulations respond differentially to the chemorepellents netrin-1 and semaphorin D. *Neuron* 18:193-207.
- Walter J, Henke-Fahle S, Bonhoeffer F. 1987a. Avoidance of posterior tectal membranes by temporal retinal axons. *Development* 101:909-913.
- Walter J, Kern-Veits B, Huf J, Stolze B, Bonhoeffer F. 1987b. Recognition of position-specific properties of tectal cell membranes by retinal axons in vitro. *Development* 101:685-696.

- Wang KH, Brose K, Arnott D, Kidd T, Goodman CS, Henzel W, Tessier-Lavigne M. 1999. Biochemical purification of a mammalian slit protein as a positive regulator of sensory axon elongation and branching. *Cell* 96:771-784.
- Warner A. 1992. Gap junctions in development--a perspective. *Semin Cell Biol* 3:81-91.
- Weiss P. 1941. Nerve patterns: the mechanics of nerve growth. *Growth* 5(Suppl.):163-203.
- Wentworth LE. 1984. The development of the cervical spinal cord of the mouse embryo. II. A Golgi analysis of sensory, commissural, and association cell differentiation. *J Comp Neurol* 222:96-115.
- Wessells NK, Nuttall RP. 1978. Normal branching, induced branching, and steering of cultured parasympathetic motor neurons. *Exp Cell Res* 115:111-122.
- Winberg ML, Noordermeer JN, Tamagnone L, Comoglio PM, Spriggs MK, Tessier-Lavigne M, Goodman CS. 1998. Plexin A is a neuronal semaphorin receptor that controls axon guidance. *Cell* 95:903-916.
- Wizenmann A, Thanos S, von Boxberg Y, Bonhoeffer F. 1993. Differential reaction of crossing and non-crossing rat retinal axons on cell membrane preparations from the chiasm midline: an in vitro study. *Development* 117:725-735.
- Wolszon LR, Gao WQ, Passani MB, Macagno ER. 1994. Growth cone "collapse" in vivo: are inhibitory interactions mediated by gap junctions? *J Neurosci* 14:999-1010.
- Wolszon LR, Passani MB, Macagno ER. 1995. Interactions during a critical period inhibit bilateral projections in embryonic neurons. *J Neurosci* 15:1506-1515.
- Yaginuma H, Shiga T, Homma S, Ishihara R, Oppenheim RW. 1990. Identification of early developing axon projections from spinal interneurons in the chick embryo with a neuron specific beta-tubulin antibody: evidence for a new 'pioneer' pathway in the spinal cord. *Development* 108:705-716.
- Yaginuma H, Homma S, Kunzi R, Oppenheim RW. 1991. Pathfinding by growth cones of commissural interneurons in the chick embryo spinal cord: a light and electron microscopic study. *J Comp Neurol* 304:78-102.
- Yu HH, Huang AS, Kolodkin AL. 2000. Semaphorin-1a acts in concert with the cell adhesion molecules fasciclin II and connectin to regulate axon fasciculation in *Drosophila*. *Genetics* 156:723-731.
- Yuan SS, Cox LA, Dasika GK, Lee EY. 1999a. Cloning and functional studies of a novel gene aberrantly expressed in RB-deficient embryos. *Dev Biol* 207:62-75.
- Yuan W, Zhou L, Chen JH, Wu JY, Rao Y, Ornitz DM. 1999b. The mouse SLIT family: secreted ligands for ROBO expressed in patterns that suggest a role in morphogenesis and axon guidance. *Dev Biol* 212:290-306.
- Yuste R, Peinado A, Katz LC. 1992. Neuronal domains in developing neocortex. *Science* 257:665-669.
- Zallen JA, Yi BA, Bargmann CI. 1998. The conserved immunoglobulin superfamily member SAX-3/Robo directs multiple aspects of axon guidance in *C. elegans*. *Cell* 92:217-227.
- Zinn K, McAllister L, Goodman CS. 1988. Sequence analysis and neuronal expression of fasciclin I in grasshopper and *Drosophila*. *Cell* 53:577-587.
- Zou Y, Stoeckli E, Chen H, Tessier-Lavigne M. 2000. Squeezing axons out of the gray matter: a role for slit and semaphorin proteins from midline and ventral spinal cord. *Cell* 102:363-375.

Cross-Midline Interactions Between Mouse Commissural Hindbrain Axons Contribute to Their Efficient Decussation

Teresa Sandoval-Minero, Alfredo Varela-Echavarría

Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México, Querétaro, Qro.,
C.P. 76230, México

Received 14 June 2007; accepted 26 September 2007

ABSTRACT: Information from both sides of the brain is integrated by axons that project across the midline of the central nervous system via numerous commissures present at all axial levels. Despite the accumulated experimental evidence, questions remain regarding the formation of commissures in the presence of strong repulsive signals in the ventral midline. Studies from invertebrates suggest that interaction at the midline between homologous axons of specific decussating neurons contributes to efficient midline crossing, but such evidence is lacking in vertebrate systems. We performed experiments to determine whether commissural axons of the caudal region of the hindbrain interact with their contralateral counterparts at the ventral midline and to evaluate the relevance of this reciprocal interaction. Double anterograde axon labeling with lipophilic tracers

revealed close apposition between growth cones of contralateral pioneer decussating axons at the midline. Later, we detected fasciculation between contralateral axons that is maintained even after they have crossed the midline. Blocking axon projections unilaterally with a solid mechanical barrier decreased dramatically the midline crossing of the equivalent population from the contralateral side. Decussation was also blocked by a unilateral barrier permeable to diffusible molecules but not by an axon-permeable barrier. These results suggest that in the caudal region of the hindbrain, midline crossing is facilitated by interactions between decussating contralateral axon partners. © 2007 Wiley Periodicals, Inc.

Develop Neurobiol 68: 349–364, 2008

Keywords: axon interactions; commissural neurons; midline crossing; vertebrates

INTRODUCTION

In bilateral organisms, communication between the two sides of the brain is made possible by numerous commissures comprised of axon tracts that cross the midline. Midline crossing is a highly regulated devel-

opmental process controlled by specific attractive and repulsive signals present at the midline and by the ability of an axon to respond to them (Kaprielian et al., 2001; Garbe and Bashaw, 2004). Interestingly, axons normally project to the contralateral side across the midline only once. Recent evidence suggests that axons modulate their responsiveness to the guidance cues to prevent recrossing by first ignoring the repellent ipsilateral signals and then responding to the same signals once the axon has crossed the midline (Zou et al., 2000; Imondi and Kaprielian, 2001). This mechanism involves the dynamic activation–inactivation of attractant and repellent guidance receptors present on the growth cone (Kidd et al., 1998; Stein and Tessier-Lavigne, 2001; Sabatier et al., 2004). However, it is likely that additional

Correspondence to: Alfredo Varela-Echavarría (varela@inb.unam.mx).

Contract grant sponsor: The Wellcome Trust, contract grant number: GR071174AIA.

Contract grant sponsor: CONACYT, contract grant numbers: 40286M, 46754Q.

© 2007 Wiley Periodicals, Inc.

Published online 17 December 2007 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com).

DOI 10.1002/dneu.20586

mechanisms involving cell adhesion molecules (CAMs) contribute to efficient crossing of subpopulations of axons in the presence of repulsive cues. For example, there is strong *in vivo* evidence in chicken spinal cord that commissural neurons detect and respond to repellent midline cues before crossing and this response was unmasked by blocking axonin-1- (TAG-1 mammalian homologue) or NrCAM-mediated adhesion and growth (Stoeckli and Landmesser, 1995; Stoeckli et al., 1997).

The essential role of axon fasciculation in the correct establishment of axon tracts during development is still somewhat controversial. Nevertheless, there are examples in invertebrates in which cell ablation of a specific neuron impedes the proper axon projection of neighboring cells or makes them follow aberrant pathways (Raper et al., 1984; Bastiani et al., 1986; Gao and Macagno, 1988; Garriga et al., 1993; Wolszon et al., 1995; Gan and Macagno, 1997; Hidalgo and Brand, 1997). In the case of midline crossing, Myers and Bastiani (1993) found in grasshopper embryos that the electrical ablation of a decussating neuron from one side of the embryo prevented the crossing of the homologous neuron from the opposite side, suggesting an essential role of axon fasciculation between homologous decussating axons for midline crossing.

The importance of the interactions between axons for mediating their proper path-finding has been more difficult to demonstrate in vertebrates, but in cases where complete axon tracts have been removed, specific neighboring tracts of different neuronal types miss-projected or were not formed (Chitnis and Kuwada, 1991; Kuwada, 1992; Hevner et al., 2002; Hernandez-Montiel et al., 2003; Sagasti et al., 2005). Specifically with regard to commissure formation, contacts between contralateral commissural spinal cord axons and growth cones have been reported at the floor plate (Yaginuma et al., 1990, 1991; Petko et al., 2004). A detailed study of the paths followed by commissural axons during midline crossing at the post-optic commissure in zebrafish (Bak and Fraser, 2003) found that only the leader axon slowed down at the midline, while crossing by the followers appeared to be facilitated by fasciculation with the leader. Similarly, axon crossing of the contralateral leading axon was aided by growing along the opposite leader. Moreover, when a leader axon was ablated, the followers behaved as leaders. However, no studies in vertebrates have evaluated what would happen if all the axons from one side of the brain were impeded to cross.

Our work provides the first experimental evidence in vertebrates suggesting an important role for inter-

actions between contralateral axons in midline crossing. Using bilateral dye labeling to follow the trajectories of decussating neurons in the caudal region of the mouse embryonic hindbrain, our analysis revealed interactions between contralateral axons at the time they start to cross the midline and these interactions persist after crossing. Unilateral inhibition of midline crossing by a solid and by a diffusion-permeable mechanical barrier prevented contralateral axons from crossing, but an axon permeable barrier did not. Our experiments suggest that the direct interaction between contralateral axons is required for midline crossing. This mechanism might provide the means by which commissural axons grow through an adverse environment.

METHODS

Animals

CD-1 mouse embryos from 8.5 to 10.5 days of gestation were used (E8.5–E10.5). The day of detection of the vaginal plug was defined as day 0.5. The animals were housed and handled in compliance with regulations of the Mexican government regarding the use of laboratory animals for research purposes (NOM-062-ZOO-1999) and following “The Guide for the Care and Use of Laboratory Animals,” Institute of Laboratory Animal Resources, National Research Council, USA.

Anterograde Fluorescent Labeling

For the labeling with the lipophilic dyes DiI (DiI₁₈, D-282) and DiO (DiO₁₈, D-275, Molecular Probes, Eugene, OR), embryos were fixed overnight in 3.5% paraformaldehyde in PBS (PFA), a cut was made along the dorsal midline of the hindbrain, and the embryos were then secured with dissection needles in a silicon dish containing PBS with the ventricular surface facing up. The tips of dissection needles were coated with DiI or DiO diluted in ethanol and allowed to dry. The dye-laden needles were then inserted directly into the fixed tissue at the dorsal portion of rhombomere 6 followed by incubation at 37°C for 30 min. Afterwards, the needles were removed and embryos were maintained at 37°C overnight in PBS with several drops of 3.5% PFA. To determine the time when the first axons cross the midline, a number of mouse embryos from E8.5 to E10.5 were fixed, and decussating axons were labeled anterogradely with DiI in the left side of rhombomere 6. Double anterograde labeling was done by inserting a DiI-laden needle in the left side and a DiO-laden needle in the right side of the dorsal portion of rhombomere 6 and incubating them as described. Hindbrain explant cultures were fixed for 1 h in 3.5% PFA at room temperature, and a DiI-coated needle was inserted in the left side of the rhombomere 6 as previously described.

Hindbrain Explant Culture

Whole hindbrain and a segment of the cervical spinal cord of E9.5 and E10.5 mice were prepared in open-book configuration by removing most of the mesenchyme and opening the dorsal midline. These explants were cultured flat on 13 mm diameter/8.0 μm -pore-size polycarbonate membrane filters (110414, Whatman, Florham Park, NJ) with the neural tissue (ventricular side) facing up floating in Neurobasal medium (21103-049, GIBCO, Rockville, MD), supplemented with 5% horse serum, 2 mM L-Glutamine (GIBCO 25030-164), B-27 supplement (GIBCO 17504-044), and 10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ penicillin/streptomycin, as previously described (Echevarria et al., 2001) in an humidified incubator at 37°C with 5% CO₂ for 2.5 days. In barrier cultures a strip of aluminum foil (thickness: 2.5 μm) or polycarbonate membrane (12 μm - or 15 nm-pore-size, 1.25 μm thickness; Whatman 111116 or 110601, respectively) was inserted at the beginning of the culture in the right side of the hindbrain, lateral to the floor plate at a distance of 50–100 μm from it (to prevent floor plate damage but ensuring the blockage of the decussation of axons from neurons lateral to it), reaching from rhombomeres 4 to 8. After the incubation period, explants with and without barrier were fixed for 1 h at room temperature with 3.5% PFA and kept in PBS-0.05% sodium azide at 4°C until processed by immunohistochemistry or lipophilic dye tracing.

Whole-Mount Immunohistochemistry

To analyze axon projection from a population of calbindin-positive decussating caudal hindbrain neurons, E9.5, E10.5, and E11.5 mouse embryos were fixed overnight and hindbrain explant cultures for 1 h at RT in 3.5% PFA and subjected to immunohistochemistry. The procedure was modified from Chedotal et al. (1998) as follows. Nonspecific reactions were blocked with 2% non-fat dry milk in PBS/0.1% Triton X-100 for 2 h at RT, embryos were incubated for 48 h at 4°C in primary antibody against calbindin D-28K 1:1000 (AB1778, Chemicon, Temecula, CA) and afterwards incubated overnight at 4°C with peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgGs 1:1000 (111-036-003, Jackson, West Grove, PA). The reaction was developed with SIG-MAFAST DAB with metal enhancer (D0426, Sigma, Saint Louis, MO).

Image Acquisition and Processing

A Nikon Eclipse E600 confocal PCM-2000 or a Bio-Rad 1024 confocal scanning microscope equipped with 488 (GFP/FITC) and 543 (Rhodamine/Texas Red) lasers was used. Projections of optical section Z-series were generated with the software Simple PCI 4.06 (Compix, Imaging Systems, Cranberry Township, PA) for the images obtained with the Nikon microscope and Image J 1.34s (National Institutes of Health, Bethesda, MD) for the images obtained in the BioRad microscope. Images of double-labeled embryos were obtained independently with each laser for

the same optical section. Overlays of independent optical sections of DiI and DiO fluorescence were then constructed in Adobe Photoshop 8. Images were cropped to show specific regions and brightness and contrast were adjusted uniformly to enhance the axons when it was considered necessary. The position of the midline was obtained by overlaying the corresponding DIC and confocal images from each embryo.

Axon Quantification and Statistical Analyses

Decussating axon trajectories were primarily visualized by anterograde DiI labeling. The fluorescence intensity in different regions of the embryos and between samples reflects not only the number of axons but differences in DiI-labeling levels and image-acquisition settings. To normalize the labeling levels so that the fluorescence measured in different areas could reflect the number and distribution of axons, the axon label found in the projections of Z-series of images from each embryo were driven to threshold and transformed to binary data so that background pixels were considered as 0 and pixels on labeled axons as 1. This processing then allowed us to calculate the number of labeled pixels (axon coverage) in different regions near and across the midline and to compare them between samples as follows: A rectangle extending approximately 380 μm along the longitudinal axis of the hindbrain was drawn from the middle of the floor plate (at the position of the notochord) to the right (where the barrier was positioned) and a rectangle of the same dimensions was drawn at an equivalent position on the left side of the midline. The axon coverage was obtained for both regions from each control and barrier explants [(example in Fig. 3(G)]. All these transformations and analyses were done with the software Metamorph v4.6r10 (Universal Imaging Corporation, Downingtown, PA). Then, the ratio of the axon coverage on the contralateral versus the ipsilateral side in each embryo was determined. The arc sine of the square root of this ratio in each embryo was used to compare between control and barrier explant preparations by ANOVA (using the SAS system v6.02, SAS Institute, Cary, NC).

A more detailed comparison of the axon coverage in different medio-lateral regions of aluminum foil barrier and 15-nm semi-permeable barrier cultures versus control cultures was also done in the binary-transformed images using the software Metamorph v4.6r10. First, rectangles of 380 μm by 100 μm were drawn according to the size of the floor plate in the image field [(M in example in Fig. 4 (H)] at the dorsal portion of each explant (T, where the dye was placed), at the left (L), and at the right (R) of the floor plate. The axon coverage at the dorsal region of each explant (T) was compared between aluminum foil and 15 nm pore-size barrier cultures and their corresponding controls using the general linear model procedure of the SAS system. Means were compared using the least square means procedure with a two tailed test, with the following model: $Y = \mu + T_i + E_{ij}$, where μ is the general mean, T_i is the treatment (i is

culture with or without barrier), and E_{ij} is the experimental error. No significant differences were found between the axon coverage in barrier cultures and their controls, revealing that the barriers do not affect the efficiency of labeling [aluminum foil, control ($n = 14$): mean 0.403 ± 0.150 ; barrier ($n = 14$): mean 0.326 ± 0.094 ; 15 nm-pore membrane, control ($n = 10$): mean 0.756 ± 0.143 ; barrier ($n = 10$): mean 0.753 ± 0.129]. Therefore, the axon coverage in T was used as a reference for the total axon label (100%) in each control and barrier explant and was compared to the axon coverage in L, M, and R thus obtaining the relative axon coverage. The arc sine of the square root of the relative axon coverage at each L, M, and R was calculated and compared between control and barrier explants by ANOVA using the software SAS.

For axons labeled with the calbindin antibody, axons and/or axon fascicles present before crossing (left) and on the floor plate (midline) at different focal planes were counted directly under light microscopy, and the results obtained from cultures with and without barrier were analyzed by ANOVA using the SAS system. Means were compared with the least square means procedure using a two tailed test with the model: $Y = \mu + T_i + E_{ij}$ where μ is the general mean, T_i is the treatment (i is left or midline axon number), and E_{ij} is the experimental error.

Probes and *In Situ* Hybridization

E10.5 mouse embryos and hindbrain cultures with and without barrier were fixed and subjected to *in situ* hybridization as previously described (Varela-Echavarría et al., 1996) using probes for Netrin-1, Slit-1, and Slit-2 kindly donated by Dr. Marc Tessier-Lavigne.

RESULTS

Ventral Midline Crossing of a Population of Caudal Hindbrain Axons Starts at E10 in Mouse

To determine the timing of projection across the ventral midline of caudal hindbrain decussating neurons, unilateral and bilateral anterograde labeling was done in embryos at stages E8.5–E10.5 from the dorsal portion of rhombomere 6. The first axons reaching the floor plate were found at E9.5 [Fig. 1(A)]. By E10 some of them started to cross the midline [Fig. 1(C–H)], while at E10.5 many axons had already crossed to the contralateral side [Fig. 1(B)]. This neuron population projected straight from the dorsalmost portion of the caudal hindbrain in a circumferential direction towards the midline. After the pioneer axons started to cross to the contralateral side [Fig. 1(A)], many others followed the same pathway and formed a thick fascicle that later developed into a commissure.

Finally, some of the axons turned longitudinally in a rostral direction after crossing while others extended ahead to the contralateral dorsalmost portion of the hindbrain [Fig. 1(B)].

Double Anterograde Labeling with DiI and DiO of Decussating Caudal Hindbrain Neurons in Mouse Embryos Showed Apposition and Fasciculation Between Contralateral Axons

Axon projection to the midline was studied in E10 mouse embryos by anterograde labeling with DiI and DiO from opposite sides of the caudal hindbrain in order to analyze the earliest possible interactions between contralateral axons. Over fifty E10 mouse embryos were double-labeled, and in around 80% of them we identified very close appositions between pioneer axons and growth cones from contralateral sides of the hindbrain once they started crossing the midline [Fig. 1(C–E)]. Many of these axons also maintained a close proximity with one another while crossing [Fig. 1(E,F)] and in some cases even after crossing the midline [Fig. 1(F–H)]. These observations were consistent with the interpretation that contralateral axons interacted and fasciculated with one another as they crossed the floor plate. However, a detailed ultrastructural analysis would be necessary to unequivocally identify axon contacts. Individual optical sections of confocal Z-series were also analyzed to follow the trajectory of particular axons as they crossed the floor plate (Fig. 2). At a stage when very few axons had decussated, the trajectory of individual axons seemed to coincide with individual axons or with axon fascicles coming from the contralateral side, throughout most of their trajectory in the floor plate and even after leaving it (Fig. 2). The finding that growth cones and axons from opposite sides of the hindbrain project very close to each other in the ventral midline region suggests that a cross-midline axon interaction plays a role in facilitating their decussation.

A Unilateral Mechanical Barrier Blocks Midline Crossing of Contralateral Decussating Caudal Hindbrain Axons

To evaluate whether the interactions between contralateral decussating axons found at the ventral midline facilitated midline crossing, we disrupted the projection of decussating axons from one side of the caudal hindbrain and evaluated whether the contralateral

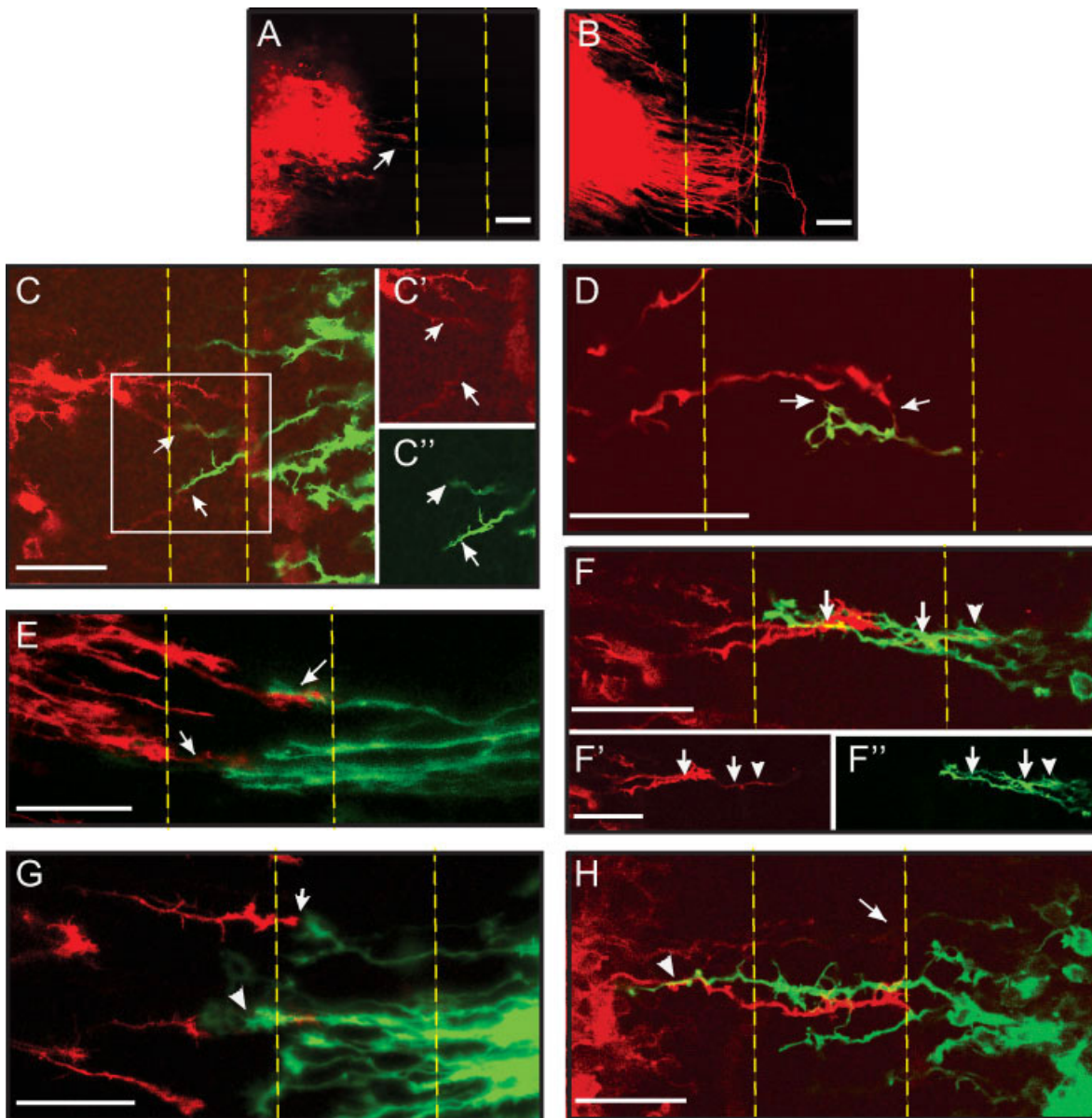


Figure 1 Populations of caudal hindbrain axons start crossing the midline at E10 in mouse and interact with their contralateral counterparts while crossing. (A, B) Projections of confocal Z series (20 optical sections taken at intervals of $2\ \mu\text{m}$ each) of mouse caudal hindbrain in open-book configuration showing decussating axons anterogradely labeled with DiI at E9.5 (A) and E10.5 (B). Arrow in A shows one of the first axons projecting to the floor plate. Dotted lines in all panels indicate the approximate boundaries of the floor plate. (C–H) Overlays in open-book configuration of images of caudal hindbrain E10 mouse embryos anterogradely labeled with DiI (red, left) and DiO (green, right) at the moment when the first decussating axons begin to cross the midline. The images in C, E, and G are projections of two adjacent Z optical sections $1.5\ \mu\text{m}$ apart and those shown in D, F, and H are single optical sections. Arrows show early close appositions between axons (C, E, F, and H) or growth cones (D, G) of contralateral axons at the midline, and arrowheads in F–H show interactions between axons once they have crossed to the contralateral side. C' and C'' as well as F' and F'' are independent images of DiI or DiO of the overlays shown in (C) and (F), respectively. Scale bar: $50\ \mu\text{m}$.

axons were still able to cross. We labeled anterogradely with DiI a population of decussating axons at the dorsal portion of rhombomere 6. As described

earlier, the first axons of this population reach the midline at E9.5 [Fig. 3(A)] while at E10.5 a large number of axons have crossed it [Fig. 3(B)]. We pre-

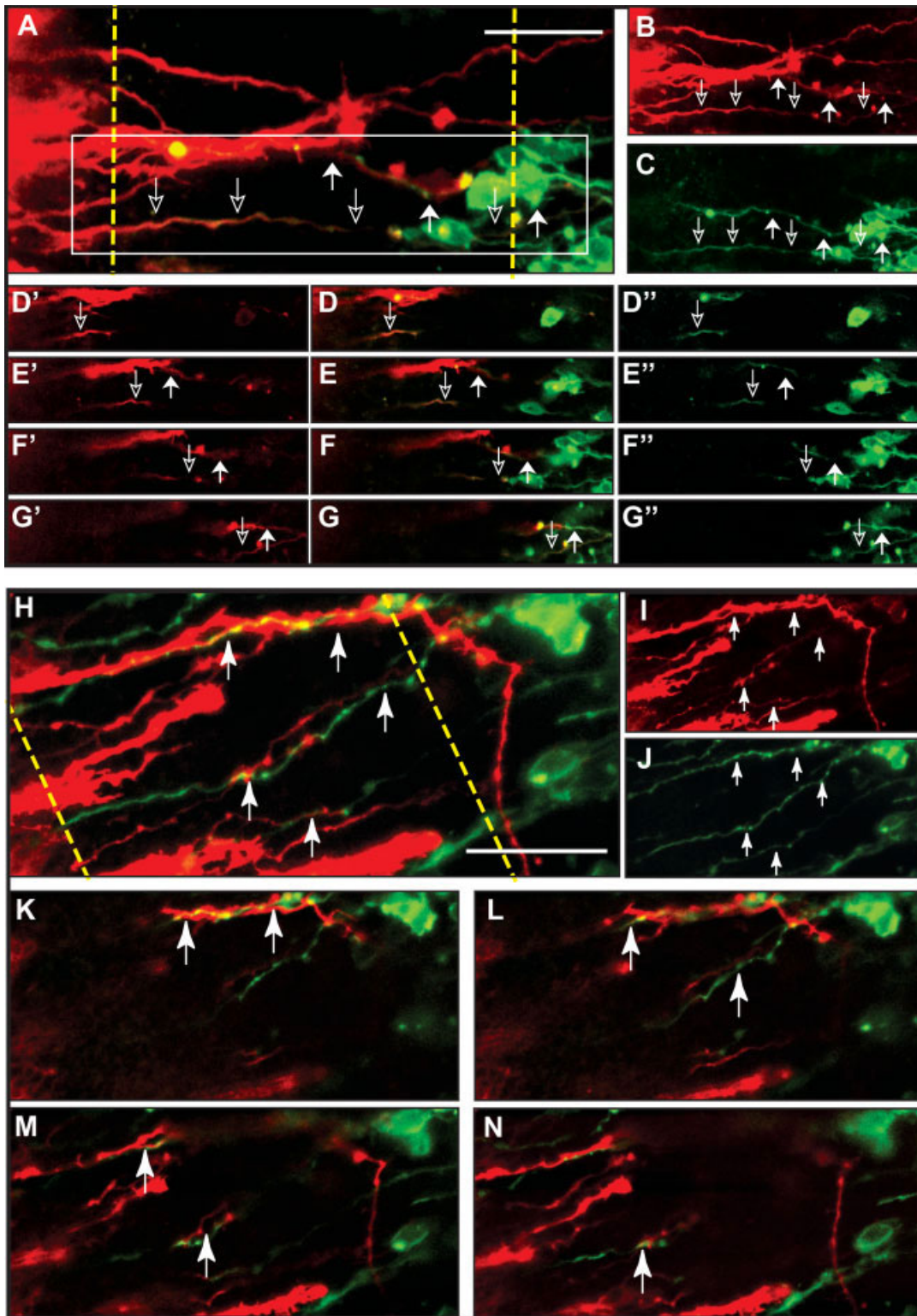


Figure 2

dicted that if a contralateral interaction at the midline were relevant for the decussation of these axons, blocking the projection from one side of the hindbrain would have an effect on the projection of decussating axons from the side opposite. To evaluate then if a unilaterally placed barrier has a contralateral effect in midline crossing of this population of axons, we developed hindbrain explant cultures of both E9.5 and E10.5 mouse embryos. After 2.5 days *in vitro* (DIV) a prominent commissure is established when hindbrains from E9.5 embryos are cultured [Fig. 3(C)] and the decussating axon growth increases in cultured E10.5 hindbrains [Fig. 3(D)]. Axon trajectories from 14 E9.5 controls were analyzed. The axons appeared fasciculated as they crossed the midline in a straight direction and in just one out of 14 experiments there were a few axons stopped at the floor plate [Fig. 3(C) and data not shown]. When an aluminum foil barrier was placed at the right side of the hindbrain at the beginning of the culture, however, a decrease in the decussation of DiI-labeled axons was seen in E9.5 explants after 2.5 DIV [Fig. 3(E)] but not in E10.5 explants [Fig. 3(F)]. This was expected because in E10.5 embryos a large number of the axons had already crossed the midline at the moment the barrier was placed [Fig. 3(B)]. In E9.5 barrier explants, different behaviors in axons contralateral to the barrier were also seen. From a total of 14 explants with barrier we observed high fasciculation of axons in seven cases, many axons turning longitudinally before or just after crossing the midline in five cases, while most of the axons were stopped at the midline in all the explants, either displaying large growth cones or forming disorganized tangles while reaching the midline [arrow in Fig. 3(E) and data not shown]. To determine whether there was a significant difference between the decussation of DiI-labeled axons crossing the midline in E9.5 hindbrain explants with and without barrier, Z-series projections of confocal

images of each embryo were transformed into binary data in order to control for fluorescence labeling intensity between experiments [see methods and Fig. 3(G) for details]. This analysis allowed us to calculate the area covered by labeled axons in different regions which we refer to as “axon coverage” with the following caveat considered. Since the number of labeled pixels may be influenced by a number of factors including axon number, axon caliber, degree of fasciculation, and degree of branching, “axon coverage” provides only an approximate measure of the total number of axons present. This, however, allowed the detection of gross effects in the decussating axon growth in the different conditions analyzed. A total of 14 controls and 14 barrier explants were considered (after discarding explants with damaged floor plates) and analyzed by ANOVA. A significant difference ($p \leq 0.001$) in the ratio of axon coverage in the right versus the left side was found in explants with barrier (mean $31.6\% \pm 12.8$) in comparison to controls without barrier (mean $64.9\% \pm 14.9$) [Fig. 3(H)], suggesting that the barrier was blocking a contralateral signal necessary for midline crossing.

A Diffusion-Permeable Barrier Also Blocks Midline Crossing of Decussating Caudal Hindbrain Axons

The observation that midline crossing was affected in decussating caudal hindbrain axons in the presence of a unilateral aluminum barrier placed on the opposite side suggested the need for a permissive contralateral signal that was blocked by the barrier. Since the aluminum strip would block all the signals coming from the contralateral side, we blocked specifically the axon projection from the contralateral side by placing unilaterally a polycarbonate filter with 15-nm pores at the beginning of the culture and compared the

Figure 2 The trajectory of the decussating caudal hindbrain axons seems to follow that of their contralateral counterparts while crossing the midline in E10.5 embryos. (A–G) show images obtained from the same specimen and (H–N) from a different specimen. (A–C, H–J) Projections of confocal Z-series of decussating hindbrain axons labeled anterogradely with DiI (red) or DiO (green) showing the overlay of both labels (A, H) as well as the trajectory of the axons labeled either with DiI (B, I) or DiO (C, J) during midline crossing in open-book preparations. (A–C) and (H–J) are projections of 8, and 7 optical sections taken at intervals of 1 μm , respectively. The dotted lines in (A) and (H) indicates the approximate boundaries of the floor plate and the rectangle in (A) corresponds to the region of the image shown in two-color overlays of selected individual optical sections in (D–G) (D'–G', DiI label; D''–G'', DiO label). The arrows in (A) and (H) indicate different points on the trajectory of axons where DiI label coincides with DiO label. The same points are indicated by the same type of arrow on the optical sections shown in (D–G) and in (K–N). Scale bar: 25 μm .

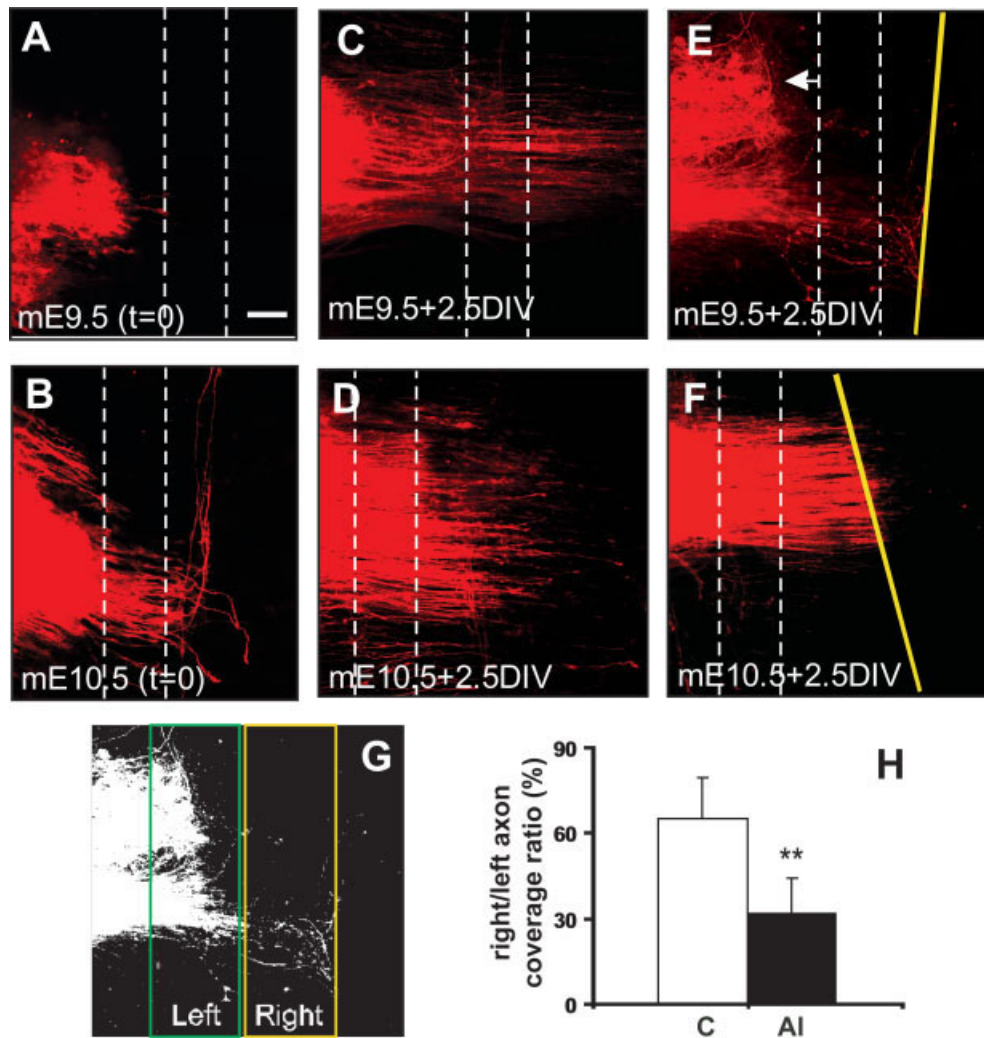


Figure 3 A unilaterally placed mechanical barrier blocks midline crossing of a contralateral DiI-labeled population of decussating caudal hindbrain axons. Anterograde labeling with DiI at the dorsal (left) portion of the caudal hindbrain of E9.5 (A) and E10.5 (B) mouse embryos show the axon projection of a group of decussating hindbrain neurons at these developmental stages [images in A and B correspond to those shown in Fig.1(A,B)] and in E9.5 (C) or E10.5 (D) mouse hindbrain explants after 2.5 days *in vitro* (DIV). (E) and (F) show, respectively, E9.5 and E10.5 mouse hindbrain explants cultured 2.5 DIV with unilateral mechanical barriers (indicated by the yellow lines) followed by DiI labeling on the left side. Images are projections of confocal Z-series in open-book configuration. The dotted lines mark the approximate boundaries of the floor plate. (G) Example of the method used to compare the axon coverage before and after the midline in explants with and without barrier, showing the binary transformation of the projection of the Z-series of a barrier explant and the regions at the left (green rectangle) and at the right (yellow rectangle) where the area covered by labeled pixels was calculated. (H) Ratio of right/left axon coverage without (control) and with barrier in E9.5 mouse embryo hindbrain explants after 2.5DIV expressed in percentage relative to left axon coverage. Bars show the mean and SD of 14 control and 14 barrier experimental units. Data analyzed by ANOVA, $**p \leq 0.001$ (see Methods for details of statistical analyses). Scale bar: 50 μm .

axon crossing to that obtained with explants without barrier or with a unilateral polycarbonate filter with 12- μm pores. From measurements of growth cones and filopodia, we expected that axons could cross

only the 12- μm -pore barrier, while the 15-nm-pore barrier would allow only the diffusion of small molecules (Bouquet et al., 2004; Kohno et al., 2005). This was confirmed, as application of DiI on the right side

of the membrane barriers revealed an abundant axon projection through the 12- μm -pore barrier in all the six explants tested [Fig. 4(B)] similar to control cultures [Fig. 4(A)]. In contrast, only a few thin projections could be detected in 5 out of 10 explants tested with the 15-nm-pore membrane [Fig. 4(C)]. After 2.5 DIV the decussating axons originating contralateral to the barriers were anterogradely labeled with DiI, as described for the cultures with aluminum barriers. Axon projection and midline crossing were ample in both, controls without barrier [Fig. 4(D)] and 12- μm -pore barrier explants [Fig. 4(E)], but in 15-nm barrier explants, a decrease in midline axon crossing was observed [Fig. 4(F)]. The axon coverage present before the midline (left) and after crossing it (right) was determined [see methods and Fig. 3(G)] for the control, 12- μm , and 15-nm barrier explants. Again we discarded those that were unhealthy or damaged, and a total of 10 embryos per experimental procedure were analyzed. The ratio of axon coverage on the right side with respect to that of the left was also obtained and analyzed by ANOVA. A significant decrease in midline axon crossing ($p \leq 0.001$) was found in cultures with the 15-nm-pore barrier (mean $38.3\% \pm 23.1$) in comparison with a 12- μm -pore barrier (mean $73.2\% \pm 13.1$) and without barrier explants (mean $64.2\% \pm 11.8$) [Fig. 4(G)]. In this case however, axon growth was detected at the midline in all the explants with the 15-nm-pore barrier even though the majority of them failed to reach the contralateral side.

To carry out a more detailed comparison of the behavior of the axons in the presence of a contralateral aluminum foil barrier versus a semi-permeable barrier, the axon coverage was determined in the dorsalmost region of each explant, and it was used as a reference of the total amount (T, hundred percent) of labeled axons in each explant [relative axon coverage, more details in Methods and Fig. 4(H)]. Then, the relative axon coverage just before the floor plate (L, left), on the floor plate (M, midline), and just after crossing (R, right) was obtained and compared between the different kinds of barrier and their corresponding controls. Compared to the axon growth just before the floor plate, significantly less axon growth reached the floor plate and crossed to the contralateral side in controls as well as in the presence of the contralateral barriers. This result is not surprising, as the axons do not all cross at the same time [white bars in Fig. 4(I,J)]. Nevertheless, even when there was no difference in the axon coverage in the dorsalmost region of the explant between controls and barrier cultures (see Methods), a significant difference was found between controls and explants with the alumi-

num foil barrier in the relative axon coverage just before the midline (Left, controls: mean $84\% \pm 12.4$; barriers: mean $59.3\% \pm 24.4$, $p \leq 0.01$), at the midline (controls: mean $60.9\% \pm 19.6$; barriers: mean $27.1\% \pm 21.1$, $p \leq 0.001$) and after crossing (Right, controls: mean $42\% \pm 21.4$; barriers: mean $6.4\% \pm 6.6$; $p \leq 0.001$) [Fig. 4(I)]. In the presence of a contralateral 15-nm-pore barrier, however, a significant difference was only found after crossing [Right, controls: mean $35.2\% \pm 11.4$; barriers: mean $13.6\% \pm 18.3$, $p \leq 0.001$; Fig. 4(J)]. In summary, the solid barrier had a more dramatic effect on midline crossing of the contralateral axons than the 15-nm-pore barrier. This observation indicates that a diffusible guidance signal may pass through the 15-nm-pore polycarbonate filter but that this signal was not, by itself, sufficient to allow the axons to cross and reach all the way to the contralateral side to the extent observed in control cultures. Taken as a whole, the perturbations in axon crossing observed with both the aluminum and 15-nm-pore polycarbonate barriers strongly support the hypothesis that interactions between decussating axons from opposite sides of the hindbrain aid midline crossing.

Unilaterally Blocking Decussating Calbindin-Positive Axon Projections Also Blocks Decussation of Their Contralateral Counterparts and Does Not Affect the Expression of Midline Guidance Cues

Next, we wanted to analyze if the presence of a unilaterally placed aluminum foil barrier affected the decussation of a specific population of commissural axons, as observed with the DiI-labeled axons described above. Using immunohistochemistry against calbindin (CB) in the mouse embryo, we detected both cell bodies and axons of a population of decussating caudal hindbrain neurons in the dorsal region of rhombomeres 6 and 7, which are part of the medullary reticular formation (Jacobowitz and Abbott, 1998). At E9.5 when the first DiI-labeled axons start crossing the midline of the caudal hindbrain, there were no CB-positive cells or axons [Fig. 5(A)]. The first CB-positive axons crossing the midline were detected at E10.5 [Fig. 5(B)], and these axons formed a complete commissure by E11.5 [Fig. 5(C)].

For *in vitro* studies, E9.5 mice were used to ensure that no axons had crossed the midline at the time the hindbrain was dissected and cultured [Fig. 5(A)]. After 2.5 DIV a large number of CB axons in the caudal hindbrain have crossed the ventral midline [Fig.

5(D)]. When a strip of aluminum foil was placed at the right side of the caudal hindbrain lateral to the floor plate at the beginning of the culture, we observed that a large number of CB axons from the contralateral side of the barrier were unable to grow onto and through the floor plate [Fig. 5(E)]. A total of 17 control and 17 barrier explants were analyzed, and only those were considered in which the barrier blocked the CB projections lateral to it. This result is

consistent with the DiI-labeling studies. If, on the other hand, the barrier was placed in a more lateral position to the floor plate so that not all of the CB decussating neurons were blocked, then the contralateral axons crossed the midline and the commissure was formed (data not shown). In addition, in both the lateral and contralateral sides of the barrier it was possible to see cell bodies and aberrantly projecting axons, indicating that the lack of contralateral axon

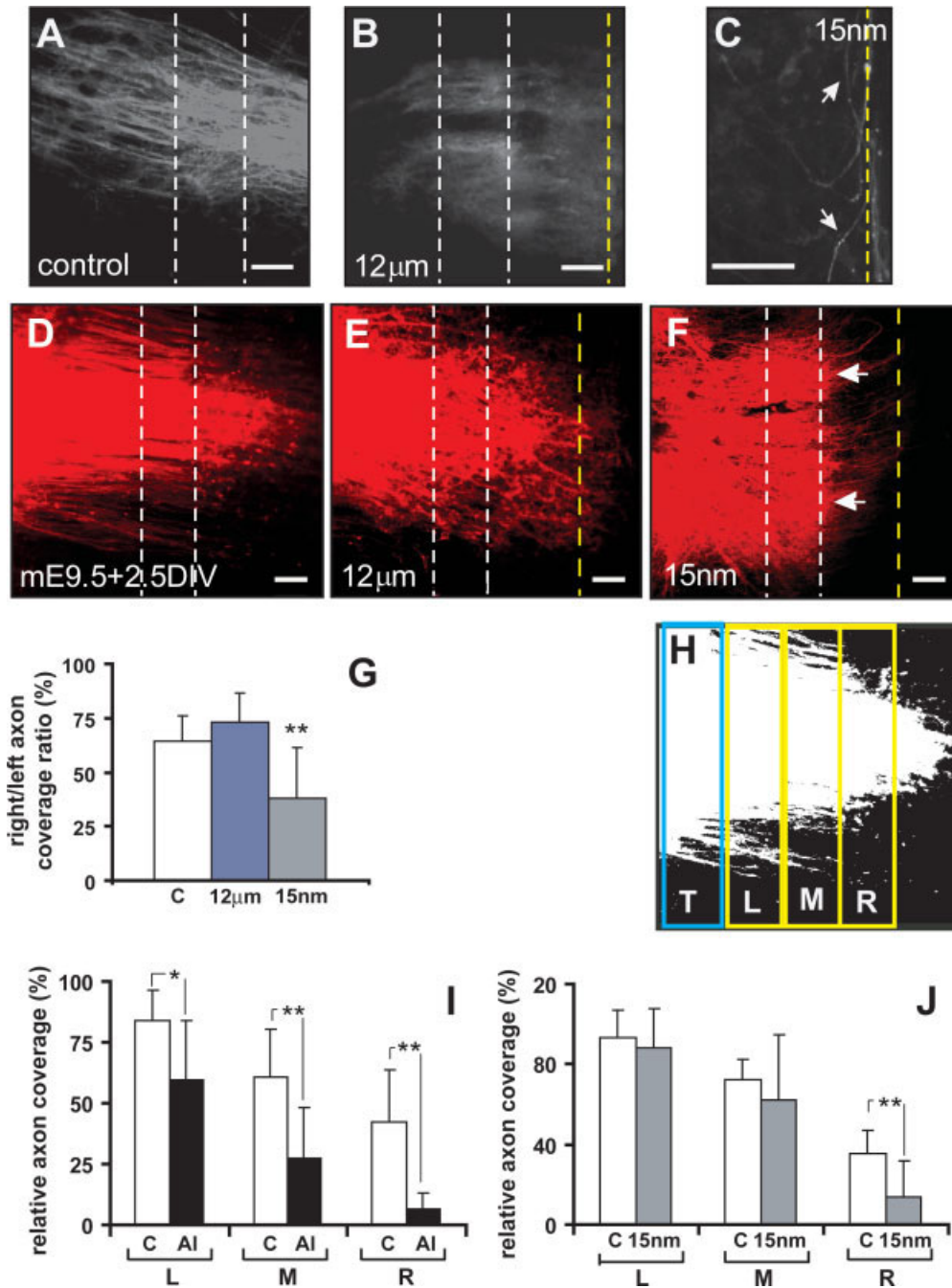


Figure 4

midline crossing was not caused by a toxic effect of aluminum in the hindbrain explant. To analyze if there was a significant difference in the number of axons crossing the midline in controls and barrier cultures, the CB axons and axon fascicles present before (at the left) and on the midline in the whole commissure for each control and barrier explant were counted in a light microscope, and the data was analyzed by ANOVA. The number of axons present at the left in a total of 17 barrier explants (mean 64.3 ± 18.5) was significantly greater than the number present at the midline (mean 29.6 ± 17.6 ; $p \leq 0.001$) [Fig. 5(F)]. This difference was not observed in the 17 control cultures analyzed. There were also significantly more axons at the midline in control (mean 70.4 ± 15.4 ; $p \leq 0.001$) than in barrier explants. In summary, the presence of a unilateral aluminum foil barrier that prevented the decussation of CB axons originating lateral to it, also affected the decussation of the CB axons originating from the contralateral side, corroborating the results described above employing DiI for anterograde labeling. Moreover, the fact that CB somata and axons were detected lateral to the barrier indicates that the aluminum strip does not have a toxic effect on neurons and does not inhibit axon growth.

Finally, in order to evaluate whether differences in the number of contralateral decussating axons crossing the midline in barrier cultures was a result of a gross disruption in the expression of putative midline guidance cues in the cultured hindbrains, the expres-

sion of the molecules Netrin-1, Slit-1, and Slit-2 was determined by *in situ* hybridization in explants with and without an aluminum barrier. The expression and distribution of the mRNA of all these molecules in hindbrain explants after 2.5 DIV [Fig. 6(D–F)] was comparable to that observed in E10.5 mice [Fig. 6(A–C)] and was unaffected by the presence of a barrier [Fig. 6(G–I)].

DISCUSSION

Analysis of the axon projections of decussating neurons at the caudal hindbrain revealed the close apposition of growth cones and axons of decussating neurons from opposite sides of the brain. Moreover, blocking the extension of decussating axons from one side of the developing mouse caudal hindbrain led to significant reductions in midline crossing of contralateral axons from the opposite side of the brain. Other experiments revealed that decussating axons could grow on the floor plate in the absence of contralateral axons when the diffusion of small molecules from the contralateral side was allowed, but most could not exit the midline. The expression of midline cues was conserved in the presence of the barrier indicating that the observed decrease in midline crossing did not arise as a consequence of alteration in the general midline properties. These results strongly suggested a two-step mechanism for contra-

Figure 4 A unilateral, small-molecule-permeable barrier also blocks midline crossing of a population of DiI-labeled decussating caudal hindbrain neurons. (A–F) Axon projection of decussating DiI-labeled neurons in E9.5 mouse hindbrain explants after 2.5 DIV without barrier (A, D) and with a unilateral barrier with pores of 12 μm (B, E) or 15 nm (C, F), labeled with DiI either at the same side as the barrier (right, A–C) or at the side contralateral to it (left, D–F). Images are projections of confocal Z-series in open book configuration. The white dotted lines mark the approximate borders of the floor plate and the dotted yellow line the position of the porous barriers. Arrows in (C) indicate scanty thin fibers projecting across the 15-nm pores, while arrows in (F) indicate bundles of axons stopped at the midline, forming disorganized tangles. (G) Right/left axon coverage ratio [as in Fig. 3(H)] in E9.5 mouse embryo hindbrain explants without barrier (control, C), with a 12- μm -pore or with a 15-nm-pore barrier after 2.5DIV obtained with the procedure exemplified in Figure 3(G). Bars show the mean of the axon coverage ratio where the left axon coverage is 100% and SD of 10 control and 10 barrier experimental units. Data analyzed by ANOVA, $**p \leq 0.001$ (see Methods for statistical analyses). (H) Example of the method used to compare the axon coverage at different medio-lateral positions in explants with and without barrier. The image shows the binary transformation of the Z-series projection of a control explant and the region where the 100% axon coverage reference was determined (T, blue rectangle) (see Methods for description) as well as at the different lateral to medial regions where axon coverage was also calculated (yellow rectangles; L, left; M, midline; and R, right). (I, J) Relative axon coverage of control and aluminum barrier explants in L, M, and R regions (I) as well as in control and 15 nm barrier explants (J). Explant set in (I) was the same as that used in Figure 3(H). Bars show the mean of the relative axon coverage in each region per explant and SD of 14 control and 14 aluminum barrier experiments for (I) as well as 10 control and 10 semi-permeable barrier experiments for (J). Data analyzed by ANOVA, $*p \leq 0.01$ and $**p \leq 0.001$ (see Methods for statistical analyses). Scale bar: 50 μm .

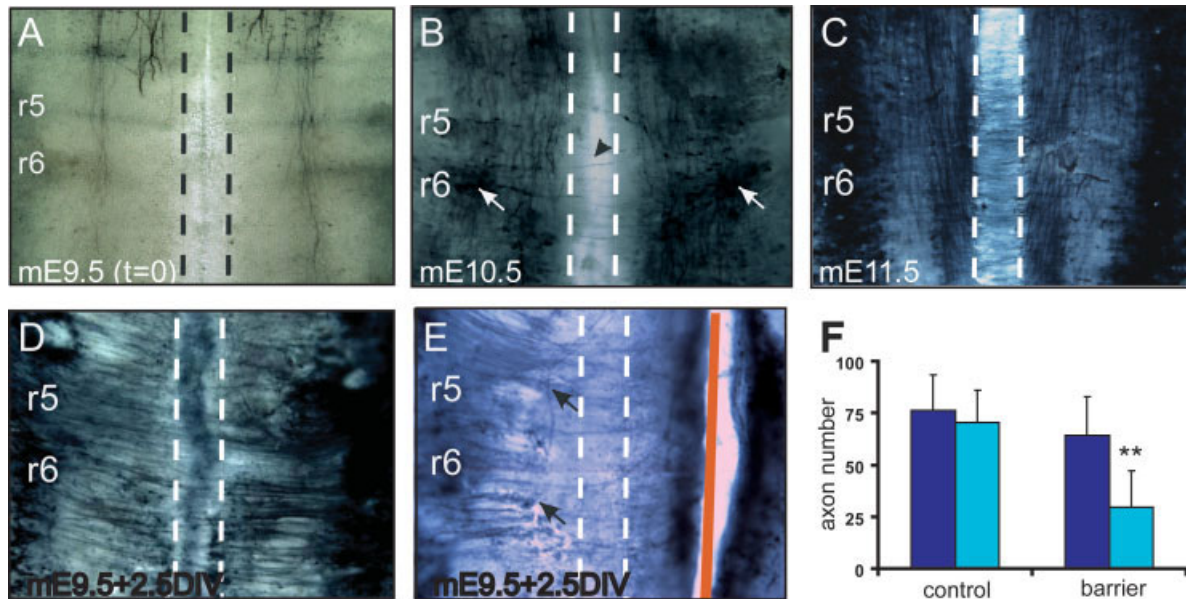


Figure 5 A unilaterally placed mechanical barrier blocks both lateral and contralateral decussating axon projection of a calbindin (CB)-positive subgroup of decussating caudal hindbrain neurons. (A–C) Whole mount CB immunohistochemistry of E9.5 (A), E10.5 (B), and E11.5 (C) mouse hindbrains in open-book configuration. White arrows in (B) show the localization of the CB-positive decussating neurons in the dorsal portion of the caudal hindbrain while the black arrowhead shows the first axons crossing the midline. (D–E) Whole mount CB immunohistochemistry of E9.5 mouse hindbrain explants after 2.5 DIV without barrier (D) or with a unilaterally placed aluminum foil barrier indicated by the red line (E). r, rhombomere. The dotted lines indicate the approximate boundaries of the floor plate. Arrows in (E) show axons projecting aberrantly or stopped before crossing the midline. (F) Average number of axons and axonal fascicles contralateral to the barrier reaching the floor plate border (dark blue) or extending into the midline (light blue) in control and barrier cultures. Bars show the mean of the axon number per explant and SD of 17 control and 17 barrier experimental units. Data analyzed by ANOVA, $*p \leq 0.001$. Scale bar: 50 μm .

lateral midline crossing: (1) decussating axons enter the floor plate in response to soluble factors that allow them to overcome midline inhibitory signals followed by (2) an important role of reciprocal interactions between contralateral decussating axons for completing the crossing of the midline and exiting the floor plate (see later). We are suggesting, for the first time in vertebrates, a novel mechanism by which interactions between opposed commissural axons can facilitate crossing to the contralateral side.

Hindbrain Decussating Axons Grow Apposed to Their Contralateral Counterparts while Crossing the Midline

By unilateral anterograde labeling with the lipophilic dye DiI at different mouse developmental stages, we determined that the first axons of a population of neurons at the dorsal portion of the caudal hindbrain start crossing the midline at E10. Then, by double antero-

grade labeling with DiI and DiO at E10 we detected the earliest interactions between pioneer axons. We found very close appositions between decussating axons originating from opposite sides of the hindbrain while they were crossing the midline, most of them at the floor plate. The earlier interactions seemed to occur between long thin pioneer contralateral axons [Fig. 1(C)], and many growth cones coming from each side of the hindbrain were found very close to each other [Fig. 1(D–G)]. Interactions between axons were observed once the first of them started to cross the midline [Fig. 1(C–F)], and axons persistently grew in close apposition to one another throughout their trajectory over the floor plate (Fig. 2). In some cases, growth cones were also seen interacting with their contralateral counterparts even after they had crossed the midline [Fig. 1(F–H)], as was found for POC axons of zebrafish (Bak and Fraser, 2003). These observations support the idea that the role of these interactions may be to help the axons exit the floor plate. Time-lapse images of live

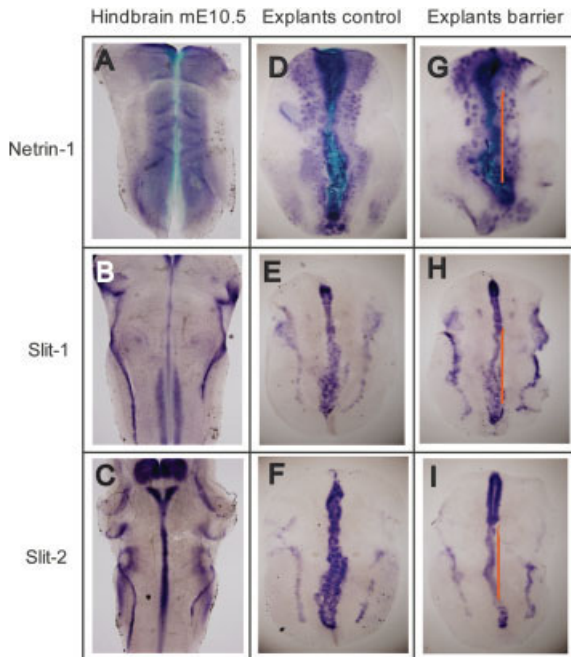


Figure 6 The expression of midline guidance cues at the hindbrain is conserved after 2.5 DIV with and without barrier. Netrin-1 (A, D, G), Slit-1 (B, E, H), and Slit-2 (C, F, I) mRNA expression in E10.5 mouse embryos (A–C) is comparable to that found in E9.5 mouse hindbrain explants after 2.5 DIV without barrier (D–F), and it is also conserved after 2.5 DIV in the presence of a unilateral aluminum foil barrier (G–I). A solid red line indicates the position of the barrier in (G–I).

embryos would allow the dynamics of these interactions to be analyzed in detail. Similar growth cone and axon-growth cone interactions in the midline were reported in chick embryo (Yaginuma et al., 1990, 1991) and adult rat spinal cord (Petko et al., 2004). By labeling with two different lipophilic dyes, however, we could identify very close interactions between axons coming from opposite sides of the hindbrain during and after midline crossing. At a time when only a few axons are traversing the midline, the frequent detection of interactions suggests a mechanism that favors axon fasciculation over isolated axon growth.

Axonal Interactions Between Contralateral Neurons at the Midline as a Mechanism to Exit the Floor Plate and Consolidate the Decussation

A unilateral mechanical barrier blocked the decussation of at least two different populations of caudal hindbrain neurons from the opposite side of the

brain. Most of the contralateral axons in explants with the barrier were in fact stopped short of reaching the midline [Figs. 3(E) and 5(E)]. A number of aberrant projections were also observed, mainly axons turning longitudinally upon reaching the midline. The formation of thick fascicles and the presence of large growth cones were also observed [Figs. 3(E), 5(E) and data not shown]. When a detailed analysis of axon coverage for each medial-lateral region was done in cultures with a solid barrier, it was found that a significant percentage of axons stopped before crossing the midline while the number reaching the midline was reduced by 70% and after crossing the midline by more than 90%, in comparison with 40% and 60%, respectively, in control cultures [Fig. 4(I)]. To detect possible alterations in the general properties of the ventral hindbrain region due to the presence of a solid barrier, we analyzed the expression of Netrin-1, Slit-1, and Slit-2, known to have attractant or repellent properties on growing axons (Rothberg et al., 1990; Serafini et al., 1994; Mitchell et al., 1996; Long et al., 2004) (Fig. 6). Since at least at the mRNA level, expression of these molecules was conserved in control and barrier cultures, this suggested that the barrier was not affecting the general properties of the floor plate. Furthermore, the behavior of axons in cultures with aluminum barrier suggested that they were responding to a strong repellent midline cue that would normally be overcome by the action of a permissive signal from the contralateral side, but due to the barrier this signal did not reach the midline.

A semi-permeable barrier that blocked lateral axon projections (membranes with 15-nm pores) also blocked the projection of contralateral axons and caused aberrant fasciculation and most growth cones to stop at the midline [Fig. 4(F)]. In this case, however, axon growth was detected in the floor plate in most cultures, and there was not a significant difference in the amount of axon growth into the midline between semi-permeable barrier and control explants [Fig. 4(J)]. This suggests that additional contralateral diffusible signals may help or consolidate midline crossing. As the hindbrain is a symmetrical system, however, the question remains of how a growth cone would respond to a diffusible signal from the contralateral side but not to the same signal in the ipsilateral side. We speculate that symmetrical dorsal-ventral gradients of a diffusible molecule arising from the dorsal aspect of the basal plate or from the alar plate on both sides of the hindbrain could overlap at the floor plate. In this region, the molecule would be above a concentration threshold needed to influence the properties of floor plate environment and local growth cone behavior. Properties of the putative dif-

fusible molecule may include its ability to modulate a growth cone's response to inhibitory guidance cues, as has been reported for the chemokine SDF-1 (Chalasanani et al., 2003, 2007). These speculations are consistent with our experimental manipulations. In the presence of a solid barrier on one side of the hindbrain, the concentration of the diffusible signal would fall below the threshold required to block the repellent response, and axons would fail to enter the floor plate [Fig. 3(E)]. On the other hand, a semi-permeable barrier placed on one side of the hindbrain would not prevent the diffusible molecule from reaching its normal concentration at the midline, allowing axons to grow into the floor plate [Fig. 4(F)].

Nevertheless, even when the axons appeared to overcome the repellent signal and reached the midline in the presence of a semi-permeable barrier, their ability to continue their projection to the contralateral side in the absence of their contralateral partners was impaired. In this case it has to be considered that the presence of strong attractive signals like Netrin-1 and Shh (Serafini et al., 1996; Charron et al., 2003) at the midline could block axons from leaving this region unless a new repellent signal were activated. In the case of spinal cord commissural axons, it has been reported that certain receptors for specific guidance cues are present on the axon surface only after crossing the midline, a process that can be involved in the activation of the response to certain midline repellent cues as well as in the rostral turning of the axons once they have crossed (Dodd et al., 1988; Imondi et al., 2000; Zou et al., 2000). Alternatively, we favor the hypothesis that contralateral axons growing into the floor plate could act as a "permissive" substrate for axon growth across the midline onto the contralateral side.

Differential behavior of leader versus follower axons as reported for POC axons in zebrafish (Bak and Fraser, 2003) may also take place in our culture system. Indeed, when we applied the solid barrier to explants in which a large number of axons had already crossed the midline (E10.5) we were unable to block the projection of additional axons that noticeably thickened the commissure [compare Figs. 3(B,F)]. This suggests that the interaction between contralateral axons that aid midline crossing may play a more relevant role during the decussation of leader axons or that it is exclusive to early crossing neural groups.

In summary, our results show that unilaterally blocking the axon projection of hindbrain commissural neurons decreases the growth of contralateral axons that cross the midline and grow forward to the contralateral side. The midline constitutes a crossroad

where growth cones are exposed to multiple attractive and repellent signals. Axon fasciculation between decussating axons is proposed here as a mechanism that facilitates axon growth onto and across the midline in the presence of those signals. There are a number of examples in development where axon fasciculation was proposed as a mechanism for axons to grow on a more permissive environment and thus avoid nearby repellent cues (Meima et al., 1997; Ringstedt et al., 2000; Yu et al., 2000; Cloutier et al., 2002). In reference to midline crossing, an interaction between contralateral homologous decussating neurons has been proposed to aid midline crossing in invertebrates (Myers and Bastiani, 1993).

The identity of the molecules involved in the contralateral midline axon interactions suggested by our studies is not yet known. However, we have found by immunofluorescence in E10.5 mouse caudal hindbrain slices that some of the receptors for midline guidance cues including DCC (Netrin receptor), Robo-1 and Robo-2 (Slit receptors), as well as the CAMs TAG-1, and NrCAM, are expressed by decussating axons while they are crossing the midline (data not shown). Future studies should aim to identify the candidate guidance cues and receptors involved in this process and to test the relevance of contralateral interactions among the numerous decussating populations of neurons so far identified.

We thank Elke Stein and Martín García-Castro for supplying resources and space in their laboratories to do some of the experiments. Special thanks to Ofelia Mora-Izaguirre (UNAM, México) for doing the statistical analyses. We also thank Dorothy Pless for editing the manuscript style. We finally thank Martín García-Servín, Pilar Galarza, Leopoldo Santos, Elsa N. Hernández, and Leonor Casanova (Instituto de Neurobiología, UNAM) as well as Joseph Wolensky (Yale University) for their technical support. T. S.-M. was supported by a fellowship from CONACYT.

REFERENCES

- Bak M, Fraser SE. 2003. Axon fasciculation and differences in midline kinetics between pioneer and follower axons within commissural fascicles. *Development* 130:4999–5008.
- Bastiani MJ, du Lac S, Goodman CS. 1986. Guidance of neuronal growth cones in the grasshopper embryo. I. Recognition of a specific axonal pathway by the pCC neuron. *J Neurosci* 6:3518–3531.
- Bouquet C, Soares S, von Boxberg Y, Ravaille-Veron M, Propst F, Nothias F. 2004. Microtubule-associated protein 1B controls directionality of growth cone migration and axonal branching in regeneration of adult dorsal root ganglia neurons. *J Neurosci* 24:7204–7213.

- Chalasanani SH, Sabelko KA, Sunshine MJ, Littman DR, Raper JA. 2003. A chemokine, SDF-1, reduces the effectiveness of multiple axonal repellents and is required for normal axon pathfinding. *J Neurosci* 23:1360–1371.
- Chalasanani SH, Sabol A, Xu H, Gyda MA, Rasband K, Granato M, Chien CB, Raper JA. 2007. Stromal cell-derived factor-1 antagonizes slit/robo signaling in vivo. *J Neurosci* 27:973–980.
- Charron F, Stein E, Jeong J, McMahon AP, Tessier-Lavigne M. 2003. The morphogen sonic hedgehog is an axonal chemoattractant that collaborates with netrin-1 in midline axon guidance. *Cell* 113:11–23.
- Chedotal A, Del Rio JA, Ruiz M, He Z, Borrell V, de Castro F, Ezan F, Goodman CS, Tessier-Lavigne M, Sotelo C, Soriano E. 1998. Semaphorins III and IV repel hippocampal axons via two distinct receptors. *Development* 125:4313–4323.
- Chitnis AB, Kuwada JY. 1991. Elimination of a brain tract increases errors in pathfinding by follower growth cones in the zebrafish embryo. *Neuron* 7:277–285.
- Cloutier JF, Giger RJ, Koentges G, Dulac C, Kolodkin AL, Ginty DD. 2002. Neuropilin-2 mediates axonal fasciculation, zonal segregation, but not axonal convergence, of primary accessory olfactory neurons. *Neuron* 33:877–892.
- Dodd J, Morton SB, Karagogeos D, Yamamoto M, Jessell TM. 1988. Spatial regulation of axonal glycoprotein expression on subsets of embryonic spinal neurons. *Neuron* 1:105–116.
- Echevarria D, Vieira C, Martinez S. 2001. Mammalian neural tube grafting experiments: An in vitro system for mouse experimental embryology. *Int J Dev Biol* 45:895–902.
- Gan WB, Macagno ER. 1997. Competition among the axonal projections of an identified neuron contributes to the retraction of some of those projections. *J Neurosci* 17:4293–4301.
- Gao WQ, Macagno ER. 1988. Axon extension and retraction by leech neurons: Severing early projections to peripheral targets prevents normal retraction of other projections. *Neuron* 1:269–277.
- Garbe DS, Bashaw GJ. 2004. Axon guidance at the midline: From mutants to mechanisms. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 39:319–341.
- Garriga G, Desai C, Horvitz HR. 1993. Cell interactions control the direction of outgrowth, branching and fasciculation of the HSN axons of *Caenorhabditis elegans*. *Development* 117:1071–1087.
- Hernandez-Montiel HL, Melendez-Herrera E, Cepeda-Nieto AC, Mejia-Viggiano C, Larriva-Sahd J, Guthrie S, Varela-Echavarría A. 2003. Diffusible signals and fasciculated growth in reticulospinal axon pathfinding in the hindbrain. *Dev Biol* 255:99–112.
- Hevner RF, Miyashita-Lin E, Rubenstein JL. 2002. Cortical and thalamic axon pathfinding defects in *Tbr1*, *Gbx2*, and *Pax6* mutant mice: Evidence that cortical and thalamic axons interact and guide each other. *J Comp Neurol* 447:8–17.
- Hidalgo A, Brand AH. 1997. Targeted neuronal ablation: The role of pioneer neurons in guidance and fasciculation in the CNS of *Drosophila*. *Development* 124:3253–3262.
- Imondi R, Kaprielian Z. 2001. Commissural axon pathfinding on the contralateral side of the floor plate: A role for B-class ephrins in specifying the dorsoventral position of longitudinally projecting commissural axons. *Development* 128:4859–4871.
- Imondi R, Wideman C, Kaprielian Z. 2000. Complementary expression of transmembrane ephrins and their receptors in the mouse spinal cord: A possible role in constraining the orientation of longitudinally projecting axons. *Development* 127:1397–1410.
- Jacobowitz DM, Abbott LC. 1998. Chemoarchitectonic Atlas of the Developing Brain. USA: CRC Press.
- Kaprielian Z, Runko E, Imondi R. 2001. Axon guidance at the midline choice point. *Dev Dyn* 221:154–181.
- Kidd T, Russell C, Goodman CS, Tear G. 1998. Dosage-sensitive and complementary functions of roundabout and commissureless control axon crossing of the CNS midline. *Neuron* 20:25–33.
- Kohno K, Kawakami T, Hiruma H. 2005. Effects of soluble laminin on organelle transport and neurite growth in cultured mouse dorsal root ganglion neurons: Difference between primary neurites and branches. *J Cell Physiol* 205:253–261.
- Kuwada JY. 1992. Growth cone guidance in the zebrafish central nervous system. *Curr Opin Neurobiol* 2:31–35.
- Long H, Sabatier C, Ma L, Plump A, Yuan W, Ornitz DM, Tamada A, Murakami F, Goodman CS, Tessier-Lavigne M. 2004. Conserved roles for Slit and Robo proteins in midline commissural axon guidance. *Neuron* 42:213–223.
- Meima L, Kljavin IJ, Moran P, Shih A, Winslow JW, Caras IW. 1997. AL-1-induced growth cone collapse of rat cortical neurons is correlated with REK7 expression and rearrangement of the actin cytoskeleton. *Eur J Neurosci* 9:177–188.
- Mitchell KJ, Doyle JL, Serafini T, Kennedy TE, Tessier-Lavigne M, Goodman CS, Dickson BJ. 1996. Genetic analysis of Netrin genes in *Drosophila*: Netrins guide CNS commissural axons and peripheral motor axons. *Neuron* 17:203–215.
- Myers PZ, Bastiani MJ. 1993. Cell-cell interactions during the migration of an identified commissural growth cone in the embryonic grasshopper. *J Neurosci* 13:115–126.
- Petko M, Veress G, Vereb G, Storm-Mathisen J, Antal M. 2004. Commissural propriospinal connections between the lateral aspects of laminae III–IV in the lumbar spinal cord of rats. *J Comp Neurol* 480:364–377.
- Raper JA, Bastiani MJ, Goodman CS. 1984. Pathfinding by neuronal growth cones in grasshopper embryos. IV. The effects of ablating the A and P axons upon the behavior of the G growth cone. *J Neurosci* 4:2329–2345.
- Ringstedt T, Braisted JE, Brose K, Kidd T, Goodman C, Tessier-Lavigne M, O’Leary DD. 2000. Slit inhibition of retinal axon growth and its role in retinal axon pathfinding and innervation patterns in the diencephalon. *J Neurosci* 20:4983–4991.
- Rothberg JM, Jacobs JR, Goodman CS, Artavanis-Tsakonas S. 1990. Slit: An extracellular protein necessary for development of midline glia and commissural axon path-

- ways contains both EGF and LRR domains. *Genes Dev* 4:2169–2187.
- Sabatier C, Plump AS, Le M, Brose K, Tamada A, Murakami F, Lee EY, Tessier-Lavigne M. 2004. The divergent Robo family protein rig-1/Robo3 is a negative regulator of slit responsiveness required for midline crossing by commissural axons. *Cell* 117:157–169.
- Sagasti A, Guido MR, Raible DW, Schier AF. 2005. Repulsive interactions shape the morphologies and functional arrangement of zebrafish peripheral sensory arbors. *Curr Biol* 15:804–814.
- Serafini T, Colamarino SA, Leonardo ED, Wang H, Bedington R, Skarnes WC, Tessier-Lavigne M. 1996. Netrin-1 is required for commissural axon guidance in the developing vertebrate nervous system. *Cell* 87:1001–1014.
- Serafini T, Kennedy TE, Galko MJ, Mirzayan C, Jessell TM, Tessier-Lavigne M. 1994. The netrins define a family of axon outgrowth-promoting proteins homologous to *C. elegans* UNC-6. *Cell* 78:409–424.
- Stein E, Tessier-Lavigne M. 2001. Hierarchical organization of guidance receptors: Silencing of netrin attraction by slit through a Robo/DCC receptor complex. *Science* 291:1928–1938.
- Stoeckli ET, Landmesser LT. 1995. Axonin-1, Nr-CAM, and Ng-CAM play different roles in the *in vivo* guidance of chick commissural neurons. *Neuron* 14:1165–1179.
- Stoeckli ET, Sonderegger P, Pollerberg GE, Landmesser LT. 1997. Interference with axonin-1 and NrCAM interactions unmasks a floor-plate activity inhibitory for commissural axons. *Neuron* 18:209–221.
- Varela-Echavarría A, Pfaff SL, Guthrie S. 1996. Differential expression of LIM homeobox genes among motor neuron subpopulations in the developing chick brain stem. *Mol Cell Neurosci* 8:242–257.
- Wolszon LR, Passani MB, Macagno ER. 1995. Interactions during a critical period inhibit bilateral projections in embryonic neurons. *J Neurosci* 15:1506–1515.
- Yaginuma H, Homma S, Kunzi R, Oppenheim RW. 1991. Pathfinding by growth cones of commissural interneurons in the chick embryo spinal cord: a light and electron microscopic study. *J Comp Neurol* 304:78–102.
- Yaginuma H, Shiga T, Homma S, Ishihara R, Oppenheim RW. 1990. Identification of early developing axon projections from spinal interneurons in the chick embryo with a neuron specific beta-tubulin antibody: Evidence for a new 'pioneer' pathway in the spinal cord. *Development* 108:705–716.
- Yu HH, Huang AS, Kolodkin AL. 2000. Semaphorin-1a acts in concert with the cell adhesion molecules fasciclin II and connectin to regulate axon fasciculation in *Drosophila*. *Genetics* 156:723–731.
- Zou Y, Stoeckli E, Chen H, Tessier-Lavigne M. 2000. Squeezing axons out of the gray matter: a role for slit and semaphorin proteins from midline and ventral spinal cord. *Cell* 102:363–375.