

03040

5

i

**CONTROL DEL CRECIMIENTO AXONAL LONGITUDINAL EN EL SISTEMA  
NERVIOSO CENTRAL DE VERTEBRADOS**

Hebert Luis Hernández Montiel



294398

Centro de Neurobiología

Universidad Nacional Autónoma de México

Tesis presentada como requisito para obtener el grado de  
Maestro en Ciencias (Neurobiología)

Campus Juriquilla, Qro. Noviembre del 2000



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

Centro de Neurobiología

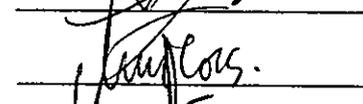
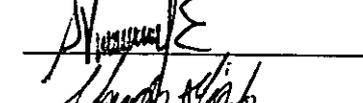
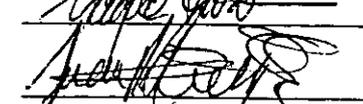
Universidad Nacional Autónoma de México

Los miembros del Comité de Tesis certificamos que la tesis elaborada por Hebert Luis Hernández Montiel

Titulada: Control del Crecimiento Axonal Longitudinal en el Sistema Nervioso Central de Vertebrados

y presentada como uno de los requisitos para obtener el grado de Maestría en Ciencias (Neurobiología) cumple con los criterios de originalidad y calidad requeridos por la División de Estudios de Posgrado de la Universidad Autónoma de México.

Firma

Presidente	<u>Dra. <u>Sofía Y. Díaz Miranda</u></u>	
Secretario	<u>Dr. <u>Luis Fernando Covarrubias Robles</u></u>	
Vocal	<u>Dr. <u>Alfredo Varela Echavarría</u></u>	
Primer Suplente	<u>Dra. <u>María Magdalena Giordano Noyola</u></u>	
Segundo Suplente	<u>Dr. <u>Juan Rafael Riesgo Escovar</u></u>	

Aprobado por el Comité Académico

  
\_\_\_\_\_

## RESUMEN

**CONTROL DEL CRECIMIENTO AXONAL LONGITUDINAL EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL DE VERTEBRADOS**

El presente trabajo se centra en el estudio de los mecanismos que controlan la navegación axonal longitudinal en el rombencéfalo en desarrollo. Este tipo de proyección axonal incluye a las neuronas reticuloespinales que inicialmente proyectan hacia la placa del piso para después hacerlo en sentido caudal hacia la médula espinal en el Fascículo Longitudinal Medio ipsilateral o contralateral. La hipótesis del presente trabajo es que el crecimiento axonal en dirección caudal es consecuencia de repulsión por factores secretados en la parte anterior del tubo neural y/o de atracción por señales derivadas del rombencéfalo caudal o de la médula espinal. Con el fin de evaluar tal hipótesis se desarrolló un sistema de cultivo en el que los explantes de rombencéfalo rostral de embriones de rata fueron cultivados en geles de colágena adyacentes a explantes de diferentes regiones del tubo neural. Este sistema nos permitió evaluar el efecto de estas regiones sobre el crecimiento de neuritas en los polos caudal y rostral de los explantes. Nuestros resultados mostraron que el istmo inhibe el crecimiento neurítico caudal en un 80% mientras que el crecimiento rostral no se afecta. Este efecto es específico del istmo ya que el rombencéfalo caudal o el neuroepitelio cervical no ejercen dicha acción inhibitoria. Para confirmar *in vivo* que las neuronas reticuloespinales cuya proyección es en dirección caudal fueron afectadas, se marcaron retrógradamente con trazadores fluorescentes antes de su cultivo en colágena. El istmo también inhibió el crecimiento de las neuritas marcadas en aproximadamente 80% comparado con los cultivos control ó con otras zonas del neuroepitelio. Estos resultados sugieren que el istmo es una fuente de señales quimiorrepelentes para axones de proyección caudal en el rombencéfalo en desarrollo.

## SUMMARY

In the present work, we set out to study the mechanisms that control longitudinal axon pathfinding in the developing hindbrain. This type of axonal projection includes that of reticulospinal neurons which initially grow to the floor plate and then caudally toward the spinal cord in the ipsilateral or contralateral Medial Longitudinal Fasciculus. Our initial hypothesis was that axonal growth in a caudal direction is the consequence of repulsion by secreted factors in the anterior neural tube and/or attraction by signals derived from the caudal hindbrain or spinal cord. To test these possibilities we developed a culture system in which rat embryo explants of rostral hindbrain were cultured in collagen gels adjacent to explants from different regions of the neural tube. This system allowed us to assess the effect of these regions on neurite outgrowth caudally and rostrally. Our results demonstrate that the isthmus inhibits caudal neurite outgrowth by 80% whereas rostral neurite outgrowth is unaffected. This effect is specific to the isthmus since caudal hindbrain or cervical neuroepithelium did not exert such inhibitory action. To confirm that caudal neurons were affected, reticulospinal neurons were labeled retrogradely with fluorescent tracers prior to placing the explants in culture. The growth of the labeled neurites was inhibited by the isthmus by approximately 80% compared to that seen in control cultures or in cultures with other regions of the neural tube. These results suggest that the isthmus is a source of chemorepulsive signals for caudally-projecting axons from the rostral hindbrain.

## AGRADECIMIENTOS

Para mi esposa Sarina, mis hijos Hebert Luis y Mauricio por su comprensión, apoyo y amor incondicional durante todo este tiempo.

Al Dr. Alfredo Varela Echavarría por su orientación y preocupación no sólo en el trabajo de investigación sino también en mi formación integral como investigador.

A mis padres y hermanos por todo su apoyo moral y monetario durante toda mi formación académica.

A Ana Cecilia Cepeda N. que durante el inicio de los experimentos fue una ayuda crucial para poder orientarme y dominar técnicas que me permitieron desarrollar mi trabajo de investigación.

A la M. C. Ma del Carmen Mejía Viggiano por su ayuda en el apoyo técnico.

A la Dra Magdalena Giordano N. y el Dr. Jorge A. Larriva S., integrantes de mi comité tutorial, por sus valiosas aportaciones para el desarrollo de mi trabajo de investigación.

A Gerardo Rafael Favila Humara y Leopoldo González Santos de la Unidad de Análisis de Imágenes por adiestrarnos y permitirnos usar el microscopio confocal.

A la Dra. Ma. Del Carmen Clapp J. por habernos facilitado el uso del microscopio de fluorescencia.

A la Dra. Sofia Díaz M., el Dr. Juan Riesgo E. y el Dr. Luis Fernando Covarrubias, integrantes de mi jurado para examen de grado, por haber detallado mi tesis para darle una mejor calidad y entendimiento.

Al M.V.Z. J. Martín García S. y demás personal del Bioterio los cuales nos facilitaron los animales de estudio.

A la beca otorgada por el CONACYT durante el tiempo que duró mi Maestría en Ciencias.

Al CONCYTEQ por la beca otorgada durante el desarrollo de mi Posgrado.

También a todos aquellos que escapan de mi memoria pero que de alguna forma contribuyeron a la feliz conclusión de mi trabajo, GRACIAS.

La tesis fue dirigida por el Dr. Alfredo Varela Echavarría y se realizó en el Departamento de Neurobiología del Desarrollo del Centro de Neurobiología, Campus UNAM-UAQ-Juriquilla.

Este trabajo fue apoyado por:

Beca de Maestría CONACYT No.130752.

Beca de CONCYTEQ No. ACA98/103.

Proyecto CONACYT 31882-N

Proyecto Human Frontier Science Program Grant RG145/98

Proyecto Wellcome Trust International Research Development Fellowship 055194/Z/98.

## ÍNDICE

Resumen en español.....	iii
Resumen en inglés.....	iv
INTRODUCCIÓN.....	1
ANTECEDENTES.....	2
I. Mecanismos Generales de Crecimiento Axonal.....	2
II. Familias de Moléculas que Guían el Crecimiento Axonal.....	4
A. Semaforinas.....	4
B. Proteínas Slit.....	7
C. Netrinas.....	8
D. Efrinas.....	10
E. Neurotrofinas y otros factores de crecimiento.....	11
F. ECM y otras proteínas de membrana.....	12
III. Combinación de Sistemas Moleculares que Guían el Crecimiento Axonal.....	13
IV. Proyección Axonal Longitudinal.....	15
IV. Proyección Longitudinal de los Axones Rombencefálicos.....	16
VI. Control Molecular de la Proyección Axonal Longitudinal.....	17
HIPÓTESIS.....	19
OBJETIVOS.....	19
ANIMALES, MATERIAL Y MÉTODOS.....	20
I. Animales.....	20
II. Material.....	21
III. Métodos.....	22
A. Sistema de Cultivo para el Crecimiento de Axones Reticuloespinales.....	22
B. Marcaje Retrógrado de Axones Reticuloespinales.....	23
C. Identificación del Tejido Fuente de Moléculas Quimiotrópicas para Axones Reticuloespinales.....	24

<b>RESULTADOS.....</b>	<b>25</b>
<b>I. Las Neuronas de Proyección Caudal Mantienen su Polaridad <i>In Vitro</i>.....</b>	<b>25</b>
<b>II. El Istmo Inhibe el Crecimiento de Neuritas con Proyección Caudal <i>In Vitro</i>.....</b>	<b>26</b>
<b>III. El Istmo Produce una Inhibición Específica sobre Neuronas de Proyección Caudal.....</b>	<b>27</b>
<b>IV. La inhibición Causada por el Istmo no Depende de la Placa del Piso.....</b>	<b>30</b>
<b>V. La Actividad Inhibitoria del Istmo es Específica para Axones de Proyección Caudal.....</b>	<b>31</b>
<b>VI. El Neuroepitelio Cervical no Incrementa el Crecimiento Caudal de Rombómera 3.....</b>	<b>32</b>
<b>VII. Efecto Específico del Istmo en la Inhibición del Crecimiento sobre Rombómera 3.....</b>	<b>33</b>
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>35</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>40</b>
<b>REFERENCIAS.....</b>	<b>41</b>
<b>LISTA DE TABLAS.....</b>	<b>50</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>50</b>
<b>APÉNDICES.....</b>	<b>51</b>

# CONTROL DEL CRECIMIENTO AXONAL LONGITUDINAL EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL DE VERTEBRADOS

## INTRODUCCIÓN

El funcionamiento del Sistema Nervioso Central (SNC) en los vertebrados depende de las conexiones neurales complejas que en su mayoría se establecen durante el desarrollo embrionario. Durante los estadios tempranos del desarrollo del tubo neural el neuroepitelio está formado por una capa delgada de células por lo que se puede decir que el crecimiento axonal ocurre solamente en dos dimensiones. De este modo el crecimiento axonal en estos estadios caería dentro de dos modalidades principales: a) crecimiento circunferencial que sigue rutas perpendiculares al eje longitudinal del tubo neural y b) crecimiento a lo largo de rutas longitudinales. La combinación de estos dos tipos de crecimiento da lugar a los patrones relativamente sencillos de proyección axonal observados en estas etapas del desarrollo neural (Varela-Echavarría y Guthrie, 1997). Estudios llevados a cabo en diferentes laboratorios han demostrado que el crecimiento axonal estereotípico está controlado por moléculas guía involucradas en dos tipos generales de señales de corto y largo alcance: a) Permisivas ó inhibitorias en las que participan proteínas de membrana y proteínas de la matriz extracelular y b) mediadas por moléculas difusibles con propiedades de repulsión ó atracción para los axones (Figura 1) (Guthrie y Pini, 1995). Entre las primeras se puede citar a moléculas de adhesión celular, efrinas, semaforinas transmembranales, proteínas slit y proteínas de la matriz extracelular (ECM, por sus siglas en inglés) y entre las de largo alcance a semaforinas secretadas y netrinas (Tessier-Lavigne y Goodman, 1996; Zinn y Sun, 1999). La evidencia experimental existente sugiere que las señales de largo alcance controlan la dirección del crecimiento axonal. Las señales de corto alcance, por su parte, están involucradas en la formación de las rutas seguidas por los axones en crecimiento (Barinaga, 1995; Varela-Echavarría y Guthrie, 1997). Si las señales presentes en el sustrato son permisivas, permitirán el crecimiento axonal; si las

señales son repelentes, serán un medio hostil que impedirá la proyección axonal en esa ruta (Tessier-Lavigne y Goodman, 1996).

El estudio de estos sistemas de navegación axonal ha permitido la identificación de moléculas guía que controlan el crecimiento axonal en el eje circunferencial del tubo neural. Sin embargo, a la fecha no se conocen moléculas implicadas en la navegación axonal sobre el eje longitudinal.

Este estudio se centra en encontrar zonas del neuroepitelio en desarrollo que controlen el crecimiento axonal longitudinal. Para esto se realizaron cocultivos en geles de colágena de explantes de rombencéfalo rostral, que contiene neuronas reticuloespinales de proyección caudal, junto con otras zonas del neuroepitelio. Encontramos que el istmo, región comprendida entre el mesencéfalo y el rombencéfalo, es capaz de inhibir específicamente a neuronas de proyección caudal contenidas en el explante rombencefálico. Estos hallazgos nos permiten plantear que el istmo funciona como una zona organizadora del crecimiento axonal sobre el eje longitudinal del tubo neural.

## **ANTECEDENTES**

### **I. Mecanismos Generales de Crecimiento Axonal**

Durante el desarrollo del SNC, las neuronas envían proyecciones axonales que nacen directamente del soma o cuerpo celular. En el extremo distal de cada axón se encuentra el cono de crecimiento que es la estructura capaz de detectar las señales guía que le permiten encontrar su blanco específico (Kolodkin, 1996). El estudio del control del crecimiento axonal ha permitido la identificación de mecanismos generales por los que éste ocurre. Por ejemplo, estructuras localizadas a lo largo de las rutas de crecimiento axonal son utilizadas por los axones como blancos intermedios, es decir, el crecimiento axonal se hace por segmentos. El axón recorre cierta distancia hasta una estructura vecina, después continúa hacia otra estructura más cercana a su destino final, y así sucesivamente hasta llegar a éste. En la médula espinal de vertebrados, por ejemplo, los axones comisurales proyectan desde el aspecto dorsal del tubo neural hasta un blanco intermedio localizado en la línea media ventral, la placa del piso, antes de proyectar a través de éste y virar rostralmente (Bernhardt, Nguyen y Kuwada, 1992; Shirasaki, Katsumata y Murakami, 1998; Yaginuma, Shiga y Oppenheim, 1993). En una población de neuronas cuyos axones proyectan de modo no sincronizado, los axones pioneros pueden proveer

señales son repelentes, serán un medio hostil que impedirá la proyección axonal en esa ruta (Tessier-Lavigne y Goodman, 1996).

El estudio de estos sistemas de navegación axonal ha permitido la identificación de moléculas guía que controlan el crecimiento axonal en el eje circunferencial del tubo neural. Sin embargo, a la fecha no se conocen moléculas implicadas en la navegación axonal sobre el eje longitudinal.

Este estudio se centra en encontrar zonas del neuroepitelio en desarrollo que controlen el crecimiento axonal longitudinal. Para esto se realizaron cocultivos en geles de colágena de explantes de rombencéfalo rostral, que contiene neuronas reticuloespinales de proyección caudal, junto con otras zonas del neuroepitelio. Encontramos que el istmo, región comprendida entre el mesencéfalo y el rombencéfalo, es capaz de inhibir específicamente a neuronas de proyección caudal contenidas en el explante rombencefálico. Estos hallazgos nos permiten plantear que el istmo funciona como una zona organizadora del crecimiento axonal sobre el eje longitudinal del tubo neural.

## **ANTECEDENTES**

### **I. Mecanismos Generales de Crecimiento Axonal**

Durante el desarrollo del SNC, las neuronas envían proyecciones axonales que nacen directamente del soma o cuerpo celular. En el extremo distal de cada axón se encuentra el cono de crecimiento que es la estructura capaz de detectar las señales guía que le permiten encontrar su blanco específico (Kolodkin, 1996). El estudio del control del crecimiento axonal ha permitido la identificación de mecanismos generales por los que éste ocurre. Por ejemplo, estructuras localizadas a lo largo de las rutas de crecimiento axonal son utilizadas por los axones como blancos intermedios, es decir, el crecimiento axonal se hace por segmentos. El axón recorre cierta distancia hasta una estructura vecina, después continúa hacia otra estructura más cercana a su destino final, y así sucesivamente hasta llegar a éste. En la médula espinal de vertebrados, por ejemplo, los axones comisurales proyectan desde el aspecto dorsal del tubo neural hasta un blanco intermedio localizado en la línea media ventral, la placa del piso, antes de proyectar a través de éste y virar rostralmente (Bernhardt, Nguyen y Kuwada, 1992; Shirasaki, Katsumata y Murakami, 1998; Yaginuma, Shiga y Oppenheim, 1993). En una población de neuronas cuyos axones proyectan de modo no sincronizado, los axones pioneros pueden proveer

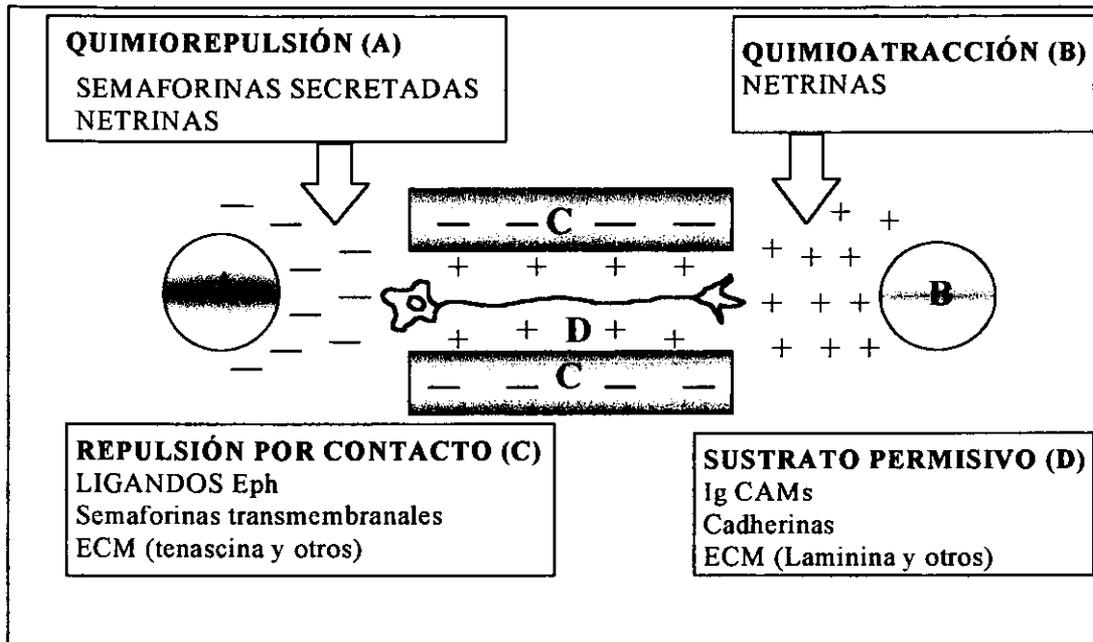
un substrato para la fasciculación y crecimiento de axones de proyección tardía (Holley y Silver, 1987). El resultado de esto es que los últimos podrían no requerir del sistema guía empleado por los axones pioneros (Tessier-Lavigne y Goodman, 1996). Los axones pueden también interactuar con sus blancos aún antes de que éstos se encuentren en su ubicación final (Tannahill, Cook y Keynes, 1997). Un ejemplo de ello es la interacción de los axones motores del nervio abductor con músculos extraoculares antes de que éstos migren a la cápsula del ojo en el embrión de pollo (Wahl, Noden y Baker, 1994). Otra manera de formar conexiones estereotípicas es por migración del soma neural que puede seguir al axón en crecimiento o migrar en una dirección distinta. Ejemplo de esto se da en la migración contralateral de una población de neuronas vestibuloacústicas en el rombencéfalo en desarrollo. Éstas traslocan sus somas contralateralmente después de que sus axones han proyectado hacia la periferia por un punto de salida ipsilateral formando una comisura (Varela-Echavarría y Guthrie, 1997).

SEÑALES GUÍA	RECEPTORES DE LA MEMBRANA AXONAL
Sema 3A, 3C	Neuropilin-1
Sema 3C, 3F	Neuropilin-2
Netrina-1	DCC, UNC-5, <i>Frazzled</i>
Efrinas A y B	Eph A y B
Slit	Robo
Nr-CAM	Axonin-1

**Tabla 1. Señales involucradas en el crecimiento axonal.** Se muestran algunas de las familias que regulan la navegación axonal durante el desarrollo embrionario. La columna izquierda muestra moléculas que se encuentran en el microambiente, es decir membranas celulares y espacio extracelular. La columna del lado derecho corresponde a los receptores de estas moléculas ubicados en la membrana del axón en crecimiento.

## II. Familias de Moléculas que Guían el Crecimiento Axonal

El estudio de los mecanismos que guían el crecimiento axonal durante el desarrollo embrionario ha permitido la identificación de familias de proteínas filogenéticamente conservadas en vertebrados e invertebrados que participan en ese proceso. En los siguientes párrafos se describen algunas de estas familias.



**Figura 1. Mecanismos implicados en la navegación axonal.** La figura resume las señales de corto (C y D) y largo alcance (A y B) que guían a los axones hasta encontrar sus blancos. La neurona de la figura responde a las señales que se encuentran en el medio. Tanto A como B son señales quimiodifusibles que forman un gradiente de expresión el cual es detectado por el cono de crecimiento. El axón crece alejándose de la señal quimiorepelente producida por A y orienta su crecimiento respondiendo a la señal quimiatrayente de B. La señal C es de corto alcance e inhibitoria para el axón en crecimiento y la señal D constituye una ruta permisiva para el crecimiento axonal.

**A. Semaforinas.** La mayoría de los miembros de esta familia de proteínas tienen efectos sobre los axones de poblaciones neuronales específicas durante su desarrollo (Tabla 1) (Adams, Betz y Püschel, 1996). En el humano se han identificado más de veinte semaforinas distintas (Kolodkin y Ginty, 1997). Éstas pueden ser secretadas o transmembrales y poseen un dominio extracelular característico, el dominio sema, de aproximadamente 500 aminoácidos (Dodd y Schuchardt, 1995). Las que son secretadas contienen un dominio



Clase	Nombre actual	Nombre previo
	Invertebrados	
I	Sema-1a	G-sema I, D-sema I, T-sema-I, Ce-sema I
	Sema-1b	Sema 1b
II	Sema-2a	D-sema II, Ce-SemaII, gSema II
	Roedores y otros vertebrados	
III	Sema3A/SEMA3A	C-colapsina-1 (Coll-1),H-Sema III, M-SemD, R-Sema III, Sema-Z1a
	Sema3B/SEMA3B	M-SemA, H-SemA, H-Sema V
	Sema3C/SEMA3C	M-SemE, C-Coll-3, H-Sema E
	Sema3D/SEMA3D	C-Coll-2, Sema-Z2
	Sema3E/SEMA3E	C-Coll-5, M-Sema H
	Sema3F/SEMA3F	H-Sema IV, M-Sema IV, H-SEMA3F
IV	Sema4A/SEMA4A	M-SemB
	Sema4B/SEMA4B	M-SemC
	Sema4C/SEMA4C	M-Sema F
	Sema4D/SEMA4D	CD100, M-Sema G, C-Coll-4
	Sema4E/SEMA4E	Sema-Z7
	Sema4F/SEMA4F	M-Sema W, R-Sema W, H-Sema W
	Sema4G/SEMA4G	
V	Sema5A/SEMA5A	M-SemF
	Sema5B/SEMA5B	M-SemG
VI	Sema6A/SEMA6A	M-Sema Via
	Sema6B/SEMA6B	M-Sema VIb, R-Sema Z
	Sema6C/SEMA6C	M-Sema Y, R-Sema Y
VII	Sema7A/SEMA7A	H-Sema K1, H-Sema L, M-Sema L, M-Sema K1
	Viral	
Vi	SEMAVA	Vaccinia sema, Variola sema
	SEMAVB	AHV sema

**Tabla 2. Clases de semaforinas.** Nomenclatura actual de las semaforinas. La columna de la izquierda muestra las clases de semaforinas. La columna central muestra a las semaforinas con su nombre actual y la columna del lado derecho presenta a las semaforinas con el nombre original.

Las semaforinas se expresan en una amplia variedad de tejidos neurales y no neurales (Behar, Golden, Mashimo, Schoen y Fishman, 1996; Eckhardt et al. 1997; Kikuchi et al. 1999). La semaforina 3A actúa como quimiorrepelente para neuronas motoras y algunas clases de neuronas sensoriales, y es producida en la parte ventral del tubo neural en desarrollo (Dodd y Schuchardt, 1995). Se sabe además que en la periferia ésta repele el crecimiento de axones simpáticos (Messersmith et al. 1995; revisado en Varela-Echavarría y Guthrie, 1997). En axones corticales, la semaforina 3C produce quimioatracción mientras que la semaforina 3A inhibe la formación de ramas neuríticas (Bagnard, Lohrum, Uziel, Püschel y Bolz, 1998). La semaforina 1a, identificada en saltamontes y en la mosca de la fruta, es transmembranal y regula el crecimiento de axones

sensoriales y la ramificación de las terminales nerviosas en la yema de la extremidad (Catalano, Messersmith, Goodman, Shatz y Chédotal, 1998; Tessier-Lavigne y Goodman, 1996). La semaforina 2a, identificada en la mosca de la fruta inhibe la formación de sinapsis en poblaciones de axones motores (Marx, 1995). Se ha encontrado que durante la activación de la semaforina 3A y la 4D es indispensable la formación de homodímeros mediante enlaces disulfuro (Klostermann, Lohrum, Adams y Püschel, 1998).

Se han descrito dos receptores para los diferentes grupos de semaforinas. Neuropilina-1 es el receptor para los grupos de semaforinas 3A, 3C y 3F (Kolodkin y Ginty, 1997; Shimizu, Murakami, Suto y Fujisawa, 2000) y Neuropilina-2 es el receptor para las semaforinas 3C y 3F (Giger et al., 1998). La respuesta mediada por la unión de la semaforina 3F con neuropilina-2 es de repulsión (Chen, Chédotal, He, Goodman y Tessier-Lavigne, 1997). La semaforina 3C también produce atracción de axones corticales de rata *in vitro* y se ha sugerido a neuropilina-2 como un componente esencial para mediar esta respuesta. Este hallazgo muestra que las semaforinas pueden también exhibir una función quimiotrópica dual (Bagnard et al., 1998).

Otro grupo de receptores que interactúa con las semaforinas son las plexinas. Estas son proteínas transmembranales con dominios extracelulares ricos en cisteína y dominios semaforina. El dominio citoplasmático de las plexinas posee actividad cinasa de tirosina. Estos receptores se unen a múltiples semaforinas y solos o en asociación con neuropilinas controlan la repulsión celular (Eckhardt et al. 1997; Xu et al. 1998). Las plexinas se han clasificado en cuatro grupos: A, B, C y D (Klostermann et al., 1998). Se han encontrado varias asociaciones entre las plexinas y distintas clases de semaforinas. Por ejemplo: las semaforinas de la clase tres no se unen directamente a las plexinas, pero éstas se asocian con neuropilinas como coreceptores para estas semaforinas (Takahashi et al. 1999; Tamagnone et al. 1999).

**B. Proteínas Slit.** Los miembros de esta familia han sido descritos en vertebrados, en *Drosophila* y en *C. elegans* y son proteínas secretadas que se expresan en la glia de la línea media ventral. En vertebrados se expresan también fuera de la línea media. La Slit2 humana es una proteína secretada que contiene 4 dominios ricos en leucina repetidos, seguido por 6 dominios EGF, un dominio ALPS (Agrin-Laminin-Perlecan-Slit), otros 3 dominios EGF y una región rica en cisteína carboxilterminal. En *Drosophila* y *C. elegans*, existe un solo gene que codifica para esta proteína mientras que en la rata y el humano, hay tres genes. La proteína Slit

se fija a la placa del piso mediante laminina y parte de ella se procesa proteolíticamente, por lo que se piensa que algunos fragmentos de Slit puedan difundir a una distancia mayor que la proteína completa. Esta proteína se ha implicado en múltiples sistemas guía en la migración neural. Se ha observado que puede mediar quimiorrepulsión en axones motores *in vitro* y que estimula la elongación axonal y la formación de ramificaciones en axones sensoriales de pequeño calibre (Brose et al. 1999; Wang et al. 1999). Esta proteína provoca también repulsión de axones del hipocampo, colapsando sus conos de crecimiento (Ba-Charvet et al. 1999; Zinn y Sun, 1999). Slit2 también repele neuronas corticales y precursores de interneuronas del bulbo olfatorio *in vitro* (Hu, 1999). En *Drosophila* se encontró que Slit actúa como quimiorrepelente de largo alcance controlando la migración del mesodermo y de precursores musculares que se alejan de la línea media (Battye, Stevens y Jacobs, 1999; Vactor y Flanagan, 1999). En *Drosophila*, esta proteína es requerida para el cruce de la línea media por los axones comisurales. En los mutantes Slit, éstos entran a la línea media pero nunca la abandonan (Kidd, Bland y Goodman, 1999).

Recientemente se encontró que la proteína Roundabout (Robo) es el receptor para la proteína Slit. En los embriones de *Drosophila*, la proteína *Robo* se encuentra a mayores concentraciones en axones que no cruzan la línea media, mientras que en los que sí lo hacen, los niveles son bajos antes de cruzar y altos después de hacerlo (Kidd et al., 1999). De acuerdo al modelo actual, la interacción repelente mediada por *Robo* y Slit impide que los axones ipsilaterales crucen la línea media. Del mismo modo, el aumento de *Robo* en los axones comisurales después de proyectar contralateralmente impide que estos crucen nuevamente al lado ipsilateral.

En *Drosophila*, el gene *commisureless (Comm)* codifica una proteína que también es necesaria para que los axones crucen la línea media. Mutaciones en este gene producen un fenotipo en el que los axones comisurales no la cruzan. Los conos de crecimiento se orientan inicialmente hacia la línea media, pero al llegar a su cercanía ascienden ipsilateralmente (Tear et al. 1996). Con mutantes dobles de *Comm* y *Robo*, se pudo determinar que *Comm* es esencial para que los axones crucen la línea media, ya que causa degradación ó disminución de la expresión de *Robo* en los axones comisurales (Zinn y Sun, 1999).

**C. Netrinas.** Los miembros de esta familia son moléculas guía relacionadas a la proteína de la matriz extracelular laminina. Proteínas homólogas han sido descritas en nemátodos, insectos y

vertebrados (Ren, Kim, Fox y Hedgecock, 1999). En el tubo neural de embriones de vertebrados, la netrina-1 se expresa en la placa del piso y atrae axones comisurales al tiempo que repele poblaciones de axones motores (Shirasaki, Mirzayan, Tessier-Lavigne y Murakami, 1996). La netrina-2 también contribuye a la atracción de axones comisurales (Kennedy, Serafini, de la Torre y Tessier-Lavigne, 1994). Las netrinas también tienen influencia sobre el crecimiento de los núcleos motores craneales y sus efectos difieren de los causados por las semaforinas (Varela-Echavarría, Tucker, Püschel y Guthrie, 1997). La reducción de la expresión de netrina-1 en homocigotos de un alelo hipomórfico de netrina en ratones, produjo fallas en el crecimiento de axones comisurales y hasta en la formación del cuerpo calloso y de la comisura anterior. En el nemátodo *Caenorhabditis elegans* se ha encontrado que la netrina UNC-6 de expresión ventral es necesaria tanto para proyecciones ventrales por atracción como para proyecciones dorsales por repulsión (Guthrie, 1997; Ishii, Wadsworth, Stern, Culotti y Hedgecock, 1992).

UNC-40 se identificó en nemátodos como el receptor que media la quimioatracción por netrina y UNC-5 como el que media quimiorrepulsión por la misma proteína (Hong et al. 1999; Chan et al. 1996)). Los miembros de la superfamilia de las inmunoglobulinas DCC (deleted in colorectal cancer) y neogenina son homólogas a UNC-40 en vertebrados (Guthrie, 1997). En 1996, se encontró un receptor homólogo para UNC-5 en humanos que se denominó UNC-5H pero su función, así como la de DCC y neogenina no se ha dilucidado por completo (Keino-Masu et al. 1996; Varela-Echavarría y Guthrie, 1997).

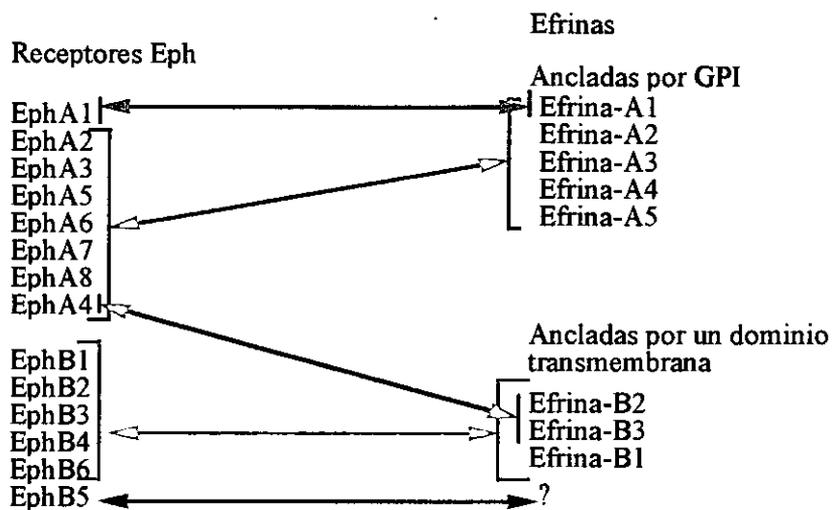
*Frazzled*, descrito en *Drosophila*, homólogo de DCC y neogenina, se requiere para que los axones comisurales crucen la línea media (Kolodziej et al. 1996). Ésta es una molécula producida por la glia que se encuentra anclada a lo largo de la placa del piso y media atracción por netrina-1. En vertebrados este receptor se ha encontrado expresado en axones retinales y en sus blancos, por lo que podría ser requerido para provocar atracción en el desarrollo de estas fibras (Gong, Rangarajan, Seeger y Gaul, 1999).

Estudios hechos en *Xenopus* revelaron un nivel de complejidad mayor en el funcionamiento de la netrina-1. Cuando ésta se une al receptor DCC en axones espinales, la respuesta es de atracción; no así, cuando se coexpresó el receptor UNC-5 al microinyectar al ARNm correspondiente en blastómeras de *Xenopus*, ésta respuesta fue cambiada a repulsión, misma que puede ser bloqueada con un anticuerpo específico contra DCC. Estos datos sugieren que la respuesta de repulsión requiere de la asociación de estos dos receptores (Hong et al. 1999). En la retina de

*Xenopus* en desarrollo, los axones retinales son atraídos hacia el disco óptico por netrina-1. Cuando se agrega al medio laminina soluble, esta respuesta se cambia por la de repulsión. En estos experimentos se encontró que la netrina media su señal mediante el aumento de los niveles intracelulares de AMPc, sin embargo cuando se encuentra laminina en el medio, estos niveles decrecen, inhibiendo la respuesta (Höpker, Shewan, Tessier-Lavigne, Poo y Holt, 1999).

Recientemente se ha obtenido evidencia que sugiere que en determinados receptores los dominios extracelulares determinan el reconocimiento específico del ligando y que el dominio citoplásmico determina la especificidad de la respuesta. Por ejemplo, en embriones de *Drosophila* la interacción de netrina-1 con su receptor *frazzled*, media respuestas de atracción axonal y la interacción de la proteína *Slit* con su receptor *Robo*, controla respuestas de repulsión. Cuando netrina-1 se asocia con una quimera que contiene el dominio extracelular de *Frazzled* y un dominio citoplásmico de *Robo* (Fra-Robo), la respuesta es de repulsión. Con una quimera de configuración opuesta, esto es, el dominio extracelular *Robo* y el intracelular *Frazzled* (Robo-fra), la respuesta es de atracción (Bashaw y Goodman, 1999). Por otra parte, la netrina-1 media respuestas de atracción por su interacción con DCC y repulsión por su interacción con UNC-5. La unión de netrina al receptor quimera DCC-UNC-5 genera una respuesta de repulsión (Hong et al. 1999). La importancia de estos hallazgos radica en que sugieren que todos los axones en crecimiento poseen la maquinaria citoplásmica apropiada para responder tanto a señales inhibitorias como atrayentes y que los receptores de las moléculas guía son modulares, esto es, que su dominio extracelular confiere especificidad del ligando y que el dominio citoplásmico determina la respuesta intracelular efectora (Seeger y Beattie, 1999).

**D. Efrinas.** Otro grupo de proteínas que tienen influencia sobre el crecimiento axonal embrionario es el de las efrinas, cuyos receptores son miembros de la superfamilia de receptores cinasa de tirosina que incluye a los receptores para FGF (Fibroblast Growth Factor) y receptores Trk para las neurotrofinas (Tessier-Lavigne, 1995; Varela-Echavarría y Guthrie, 1997). Diversos estudios han mostrado que los miembros de esta familia son repelentes dependientes de contacto. Los receptores de efrinas tienen un dominio extracelular para unión al ligando con un dominio de inmunoglobulina, una región rica en cisteína, dos dominios de fibronectina tipo III, un dominio transmembranal y un dominio intracelular con actividad de cinasa de tirosina (Dennis y Wilkinson, 1999).



**Figura 3. Efrinas y receptores Eph.** La figura muestra a los receptores del lado izquierdo y a sus ligandos del lado derecho. Las flechas muestran la afinidad de unión de los receptores con los ligandos.

Las efrinas se clasifican en los grupos A y B de acuerdo a la forma en que se anclan a la membrana celular. Las efrinas del grupo A se encuentran ancladas mediante glicosilfosfatidilinositol (GPI) y las del grupo B por medio de un dominio transmembranal. Los receptores para las efrinas se identifican mediante Eph y también se agrupan en A y B, dependiendo a la efrina con que se liga (Figura 3) (O'Leary y Wilkinson, 1999).

En neuronas corticales la efrina A5 parece estar involucrada en el control de la fasciculación y las efrinas A2 y A5 a su vez en el establecimiento de mapas topográficos retinales en el tectum (Hornberger et al. 1999; Monschau et al., 1997). El receptor Eph A5 se encuentra involucrado en la proyección axonal del hipocampo al septum. Los receptores Eph A3 y A4 así como ligandos de efrinas A, han sido involucrados en la proyección de subpoblaciones motoras hacia sus blancos (Küry, Gale, Connor, Pasquale y Guthrie, 2000).

**E. Neurotrofinas y otros factores de crecimiento.** Los factores neurotróficos ó neurotrofinas son importantes reguladores del desarrollo y mantenimiento del SNC. Estos factores se secretan en pequeñas cantidades en los blancos hacia los cuales llegan los axones en desarrollo donde promueven la sobrevivencia neural (Herzog y Bartheld, 1998; Nishi, 1994). A las neurotrofinas se les puede también implicar como factores quimiotrópicos (McFarlane, McNeill y Holt, 1995). Por ejemplo, se ha encontrado que los factores neurotróficos NT-3 y BDNF atraen el desarrollo

de axones trigeminales *in vitro*, dándoles al menos en los estadios iniciales del desarrollo, una información direccional (O'Connor y Tessier-Lavigne, 1999).

El factor BMP-7 (Bone Morphogenetic Protein), molécula que pertenece a la familia de las TGF- $\beta$ , se expresa en la placa del techo del tubo neural. Se ha mostrado que BMP-7 funciona como una molécula quimiodifusible que media repulsión en el inicio de la proyección ventral de axones comisurales hacia la placa del piso (Augsburger, Schuchardt, Hoskins, Dodd y Butler, 1999).

En el ratón, la neurexina se expresa en neuronas por lo que se implica en señales de terminación del crecimiento axonal (Littleton, Bhat y Bellen, 1997).

**F. ECM y otras proteínas de membrana.** Otras moléculas que tienen influencia sobre el crecimiento axonal son las proteínas de la matriz extracelular y moléculas de adhesión celular (CAMs) (Danielain y McMahon, 1996; Simon, Guthrie y Lumsden, 1994). Entre las moléculas de la ECM se encuentran laminina, tenascina, colágena, trombospondina, fibronectina, vitronectina y una amplia variedad de proteoglicanos que pueden promover o inhibir el crecimiento axonal *in vitro* (Gumbiner, 1996; Martin y Kandel, 1996). Los receptores para ECM son predominantemente integrinas, miembros de la familia de Ig y proteoglicanos (Tessier-Lavigne y Goodman, 1996; Varela-Echavarría y Guthrie, 1997).

Las CAMs tienen un papel importante entre las señales moleculares que guían a los axones en crecimiento formando rutas de crecimiento permisivas e inhibitorias (Chiba y Keshishian, 1996; Chothia, 1997; Gumbiner, 1996). Las N-caderinas en ratón y en pollo expresadas en neuronas se relacionan con fasciculación axonal y con señales de terminación del crecimiento axonal (Shapiro y Colman, 1998; Tamura, Shan, Hendrickson, Colman y Shapiro, 1998). La tenascina-C es un derivado glial que se encuentra anclado a la ECM. Esta molécula repele la adhesión y el crecimiento neurítico de neuronas del cerebelo y del hipocampo de ratón (Götz et al. 1996). Otro miembro del grupo de las CAMs, FasII produce fasciculación axonal en *Drosophila* (Lin y Goodman, 1994; Tessier-Lavigne y Goodman, 1996).

La F-espondina, proteína secretada relacionada a la proteína de la ECM trombospondina, ha sido implicada en el cruce de la línea media por los axones comisurales (Burstyn-Cohen et al. 1999).

En estudios encaminados a dilucidar los mecanismos que controlan el cruce axonal de la línea media en embriones de pollo, se descubrió que miembros de la superfamilia Ig, axonin-1, Ng-CAM y Nr-CAM, promueven el cruce de los axones comisurales (Stoeckli y Landmesser, 1995). En el pollo, el ácido polisialílico (PSA), que es un carbohidrato que está unido covalentemente a NCAM, se encuentra implicado en la proyección de axones motores hacia los primordios de las extremidades (Brusés y Rutishauser, 1998; Tessier-Lavigne y Goodman, 1996).

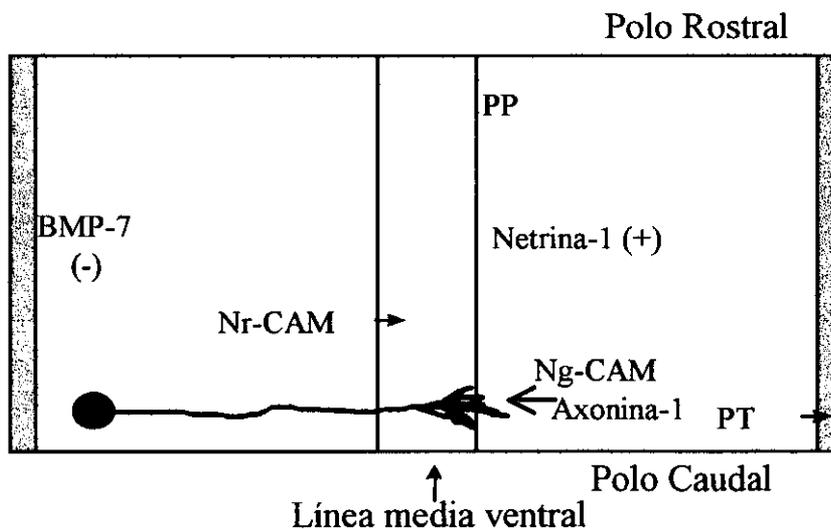
Otro grupo de moléculas asociadas en el control del crecimiento axonal es el IgLON, incluye a miembros de IgSF neurotractina, LAMP (Limbic Associated Membrane Protein), OBCAM (Opioid Binding Cell Adhesion Molecule), CEPU-1, GP55 y Neurotrimina. La neurotractina se encuentra en subpoblaciones de axones longitudinales y comisurales en el SNC de pollo. Promueve el crecimiento de neuronas telencefálicas e interactúa con CEPU-1 y LAMP. Esta proteína se ha detectado sólo en tejidos neurales embrionarios como la retina, telencéfalo, tectum, cerebelo y diencéfalo (Marg et al. 1999). La proteína LAMP se expresa en las columnas lateral y ventral del tubo neural así como en la placa del piso y se le ha implicado en la interacción específica de las células durante la histogénesis (Brümmendorf y Treubert, 1997; Zhukareva, Chernevskaya, Pimenta y Nowycky, 1997). GP55 inhibe el crecimiento neurítico y la adhesión a sustratos por las neuronas telencefálicas y del DRG (ganglio de la raíz dorsal). La actividad es específica para células neurales ya que no produce el mismo efecto en células no neurales (Clarke y Moss, 1997; Wilson, Kim, Marshall-Clarke y Moss, 1996). CEPU-1 es una glicoproteína con tres dominios Ig que se expresa en dendritas, soma y axón de células de Purkinje en el cerebelo en desarrollo (Spaltmann y Brümmendorf, 1996). La neurotrimina promueve el crecimiento de neuronas del DRG mediante interacciones heterofílicas (Gil, Zanazzi, Struyk y Salzer, 1998; Struyk, Canoll, Rosen, D'Eustachio y Salzer, 1995).

### III. Combinación de Sistemas Moleculares que Guían el Crecimiento Axonal

Los resultados provenientes de los estudios de todos estos tipos de moléculas sugieren que el control molecular del crecimiento axonal durante el desarrollo se encuentra mediado por varias señales cuya acción coordinada en espacio y tiempo permiten a los axones alcanzar a sus células blanco. Por ejemplo, Sema 3A participa en la proyección de las células cerebelares de Purkinje, de la neocorteza, talamocorticales y de los nervios craneales. Sin embargo, en animales *Knock-*

out para la Semaforina 3A, todas estas vías se desarrollan de forma normal, por lo que se supone que esta semaforina es sólo uno de los componentes del sistema global que controla la navegación axonal de estas neuronas (Catalano et al., 1998).

Las neuronas comisurales presentan un patrón de proyección que se inicia desde el aspecto dorsal del tubo neural. Inicialmente proyectan en sentido ventral para alcanzar y cruzar la placa del piso y una vez cruzada ésta, ascienden contralateralmente de forma paralela a la línea media ventral hacia la porción rostral del tubo neural. Actualmente se conoce que son varias las familias de moléculas que se encuentran implicadas tan sólo en la proyección inicial y el cruce de la línea media (Figura 4). En vertebrados, el factor BMP-7, expresado en la placa del techo causa quimiorepulsión en los axones comisurales y provoca que éstos proyecten ventralmente hacia la placa del piso (Augsburger et al. 1999). A su vez, la netrina-1 que se expresa en la placa del piso es una señal quimioatrayente para estos axones. NrCAM se expresa en la placa del piso y también es requerido para el cruce de la línea media por los mismos axones y realiza su actividad uniéndose a axonina-1 expresada en los axones (Stoeckli y Landmesser, 1995).



**Figura 4. Moléculas guía involucradas en el cruce de la línea media por los axones comisurales en *Drosophila*.** La figura muestra un explante de neuroepitelio cortado por la línea media dorsal o placa del techo y montado en plano. El borde superior de la figura corresponde al polo rostral del explante y el borde inferior al caudal. La línea en azul corresponde a la placa del piso (PP) y la verde a la placa del techo (PT). En cada figura se ejemplifican las interacciones que tiene cada axón comisural en crecimiento para poder cruzar la línea media.

#### IV. Proyección Axonal Longitudinal

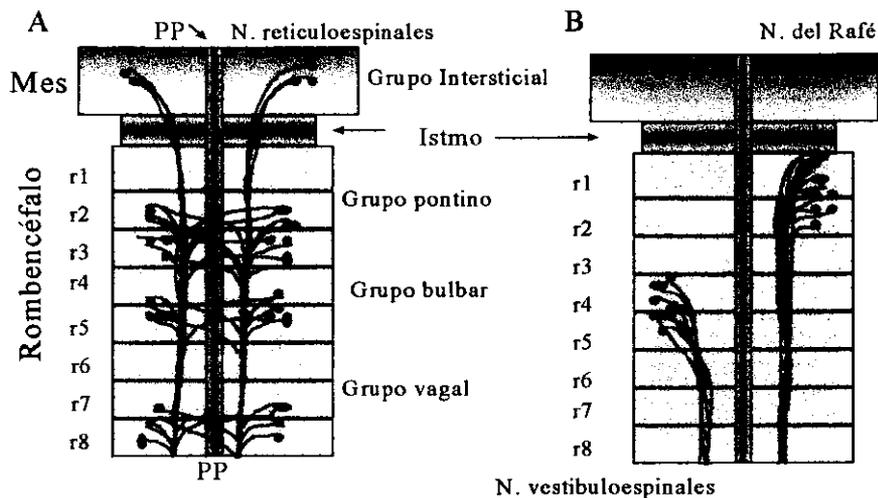
El estudio de la proyección axonal circunferencial en embriones en desarrollo ha permitido la identificación de señales de corto y largo alcance que participan en ese proceso. En cambio, los sistemas de control de la proyección longitudinal han sido menos estudiados. La evidencia experimental, sin embargo, sugiere la existencia de sistemas que guían activamente a los axones a lo largo del eje longitudinal. Los mutantes *vab-8* del nemátodo *Caenorhabditis elegans*, exhiben alteraciones que afectan a la mayoría de las proyecciones axonales posteriores sin afectar de modo notable las proyecciones anteriores y circunferenciales (Wightman et al. 1996; Wolf, Hung, Wightman, Way y Garriga, 1998). La señal que los atrae a la línea media es la netrina-1, sin embargo no se sabe qué señal provoca su crecimiento longitudinal (Kennedy et al., 1994). Con el propósito de estudiar el control de este crecimiento en vertebrados se hizo una rotación de 180° a un segmento del tubo neural torácico en embriones de pollo. Los resultados mostraron que los axones comisurales que inicialmente proyectaban longitudinalmente en dirección rostral, cambiaban el sentido de su crecimiento para seguir la dirección rostral del tejido hospedero a pesar de haber sido invertidos. Este comportamiento se observó sólo cuando el segmento invertido se transplantaba de tal modo que se mantuviera la continuidad rostral con el tubo neural del embrión receptor (Yaginuma y Oppenheim, 1991). Esto sugiere que los axones comisurales responden a señales quimiodifusibles provenientes de niveles más rostrales del tubo neural.

En otros estudios se ha encontrado que los patrones de crecimiento longitudinal no se ven afectados por alteraciones de las señales emanadas de estructuras que controlan el crecimiento circunferencial. La mutación *Cyclops* en el pez *zebra* se caracteriza por la ausencia de la placa del piso y por ende de las señales guía para la proyección circunferencial producidas por éste. En los mutantes *Cyclops* la proyección longitudinal descendente de las neuronas reticuloespinales presentaba redecusaciones en la línea media (Hatta, 1992). Estos resultados muestran que la mutación causó una alteración específica de la migración circunferencial de neuronas que antes de descender debían proyectar hacia la placa del piso, sin embargo la migración longitudinal descendente siguió su comportamiento normal.

## V. Proyección Longitudinal de los Axones Rombencefálicos

Un ejemplo de neuronas cuyos axones proyectan a lo largo del eje longitudinal lo constituyen las neuronas reticuloespinales rombencefálicas que proyectan hacia la placa del piso y después viran en dirección caudal, siguiendo una ruta descendente en la médula espinal al unirse al Fascículo Longitudinal Medio (FLM) ipsilateral ó contralateral (Glover y Pettursdottir, 1991; Jones, Paré y Beaudet, 1986). Las neuronas reticuloespinales son las que pueden ser identificadas más tempranamente en el rombencéfalo en desarrollo (Auclair, Marchand y Glover, 1999). En estos estadios se pueden distinguir varios grupos de estas neuronas: un grupo intersticial a nivel de mesencéfalo, un grupo pontino y dos grupos más situados a nivel bulbar. La proyección inicial de estos grupos es ventral, una parte de la población cruza la línea media y desciende en forma contralateral a la médula espinal. El grupo que no cruza la línea media desciende de forma ipsilateral (Lakke y Marani, 1991). Estudios hechos en embriones de pollo mostraron que los grupos bulbares de neuronas reticuloespinales son los primeros en alcanzar al FLM en el transcurso del día 3 de desarrollo. En los siguientes dos días se adicionan otras poblaciones neurales. Los núcleos pontinos reticuloespinales proyectan en sentido longitudinal descendente siguiendo el mismo patrón de cruce de la línea media mostrado por los primeros.

Otras neuronas que presentan una proyección axonal longitudinal y caudal son las neuronas del tracto rafe-espinal, las cuales proyectan de los núcleos caudales del rafe en sentido caudal hacia varias regiones de la médula espinal. El grupo vestibuloespinal comienza su proyección después de los reticuloespinales, nace del núcleo vestibular y alcanza varios blancos ubicados principalmente en la médula espinal cervical (Figura 5) (Glover, 1993; Lakke y Marani, 1991).



**Figura 5. Grupos de neuronas reticuloespinales, vestibuloespinales y del raquí en embriones de rata.** Las figuras son una representación de un montaje plano de neuroepitelio de rata. En ellas se muestran el mesencéfalo (Mes), el istmo y el rombencéfalo, este último compuesto por ocho rombómeros (r). Sobre la línea media de cada figura se encuentra en un tono más oscuro la placa del piso (PP). La figura A muestra la proyección de los diferentes grupos reticuloespinales. B la ubicación de los axones vestibuloespinales (izquierda) y la proyección de los núcleos caudales del raquí (derecha). En las figuras no se muestra a neuronas de proyección rostral entre las que se incluyen a las neuronas comisurales.

## VI. Control Molecular de la Proyección Axonal Longitudinal

A pesar de que no existe a la fecha información sobre la naturaleza de las señales moleculares que controlan el crecimiento axonal longitudinal, es posible hacer predicciones con base en el estudio de otros sistemas, ya que su funcionamiento podría estar regido de manera similar. Las señales de corto alcance son probablemente requeridas para establecer las rutas principales de navegación axonal longitudinal y las señales difusibles de largo alcance probablemente determinan la dirección del crecimiento dentro de estas rutas (Varela-Echavarría, 1997). Los axones de proyección contralateral que crecen inicialmente hacia la placa del piso posiblemente lo hacen en respuesta a quimioatrayentes derivados de ésta como es la netrina-1 (Tamada, Shirasaki y Murakami, 1995). La hipótesis propuesta es que la proyección caudal subsecuente de ambos tipos de axones, ipsilaterales y contralaterales es el resultado de la acción de moléculas repelentes producidas en la parte anterior del tubo neural en desarrollo y/o de señales atrayentes derivadas de la parte caudal del mismo. Probablemente este sistema guía también es capaz de

dirigir el crecimiento axonal de otros tipos de neuronas con proyección a lo largo de rutas longitudinales.

Una fuente potencial de señales quimiorrepelentes para axones de proyección longitudinal es el istmo, el cual se sabe que tiene el papel de organizador de regionalización y diferenciación a nivel de mesencéfalo y rombencéfalo (Guthrie, 1995; Liu, Losos, Joyner, 1999). El istmo como principal organizador del desarrollo istmocerebelar y del mesencéfalo, inicia la cascada de señalización mediante la expresión de FGF-8 (Lee, Fritzsche y McMahon, 1997; Martínez, Crossley, Cobos, Rubenstein y Martin, 1999). Otros genes implicados en estas señales de diferenciación son En1, En2, Wnt-1, Pax5 y Otx2 (Danielain y McMahon, 1996; Liu, Losos y Joyner, 1999; Ristoratore, et al., 1999).

Con base en lo anterior, el propósito de este estudio fue la identificación de fuentes de señales que afectan el crecimiento de las neuronas rombencefálicas de proyección longitudinal y caudal como un paso hacia el esclarecimiento del sistema que controla la proyección axonal longitudinal en el SNC en desarrollo.

## **HIPÓTESIS**

El crecimiento caudal de los axones reticuloespinales rombencefálicos es el resultado de la acción de moléculas repelentes producidas por la parte anterior del tubo neural y/o de señales atrayentes derivadas de la parte caudal del mismo.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo General:**

Identificar regiones del neuroepitelio que controlen la dirección del crecimiento axonal a lo largo de rutas longitudinales durante el desarrollo del SNC.

### **Objetivos particulares:**

1. Desarrollar un sistema de cultivo para el crecimiento de axones reticuloespinales *in vitro*.
2. Efectuar el marcaje retrógrado de neuronas reticuloespinales con marcadores fluorescentes.
3. Identificar el tejido fuente de las moléculas que controlan la proyección caudal de los axones reticuloespinales.

## HIPÓTESIS

El crecimiento caudal de los axones reticuloespinales rombencefálicos es el resultado de la acción de moléculas repelentes producidas por la parte anterior del tubo neural y/o de señales atrayentes derivadas de la parte caudal del mismo.

## OBJETIVOS

### Objetivo General:

Identificar regiones del neuroepitelio que controlen la dirección del crecimiento axonal a lo largo de rutas longitudinales durante el desarrollo del SNC.

### Objetivos particulares:

1. Desarrollar un sistema de cultivo para el crecimiento de axones reticuloespinales *in vitro*.
2. Efectuar el marcaje retrógrado de neuronas reticuloespinales con marcadores fluorescentes.
3. Identificar el tejido fuente de las moléculas que controlan la proyección caudal de los axones reticuloespinales.

## ANIMALES, MATERIAL Y MÉTODOS

Para poder llevar a cabo los objetivos citados se desarrolló la técnica de cultivo en geles de colágena para explantes de rombencéfalo (rombómeras 2 y 3) de embriones de rata. Después de cultivar los explantes durante dos días se llevó a cabo el conteo de neuritas a través de la cámara lúcida ó con microscopía de fluorescencia para los explantes marcados con trazadores fluorescentes. A continuación se presentan el material y los métodos utilizados para el desarrollo de los experimentos. Todos los resultados obtenidos fueron evaluados con la prueba estadística paramétrica de *t* de student ( $p < 0.05$ ).

Para cada grupo experimental se desarrollaron controles y otros diseños para poder sustentar una hipótesis nula. Debido a la variabilidad en el número de neuritas que crecieron hacia el gel de colágena no permitió la comparación entre los grupos que no correspondían al mismo día de experimentación. A continuación se enumeran los diseños realizados para valorar el efecto del istmo sobre el borde caudal de rombómera 3 y los controles negativos:

- Rombómera 3 cocultivado junto con el istmo (R3+I).
- Control de rombómera 3.
- Rombómera 3 más neuroepitelio cervical (R3+NEC).
- Rombómera 3 más rombómera 8.

Los siguientes diseños experimentales corresponden a valorar si el efecto observado por el istmo es específico para el borde caudal de rombómera 3:

- Rombómera 2 más istmo (R2+I).
- Control de rombómera 2.

El siguientes diseño se realizó para mostrar que el efecto inhibitorio causado por el istmo no era debido a la presencia de la placa del piso, la cual es responsable de la secreción de netrina-1.

- Rombómera 3 más Istmo sin placa del piso [R3+I(-fp)].
- Control de rombómera 3.

### I. Animales

Se utilizaron hembras gestantes de la cepa Wistar con 14.5 días de gestación dado que en este estadio los axones reticuloespinales son de los primeros en proyectar dentro del FLM (Glover, 1993; Auclair et al., 1999). La preñez en la rata se identifica por la presencia del tapón vaginal y

se consideró como 12 horas de gestación. Las ratas fueron sacrificadas mediante dislocación cervical e inmediatamente después se realizó una incisión abdominal para extraer todos los embriones y ponerlos en solución Ringer fría. De cada embrión se extraen los explantes de neuroepitelio y se conservan en Ringer frío.

## II. Material

Medio Opti-Mix.

Optimem 70%, Nutrimix F-12 23.5%, Suero fetal bovino 4.7% y Penicilina/Estreptomicina 1:100 0.5%.

Fijador.

Paraformaldehído al 3.5% en PBS/pH 7.4.

Solución salina Ringer pH 7.2.

Se hace con una concentración 0.1232 M de NaCl, 0.0015 M de CaCl<sub>2</sub>-2H<sub>2</sub>O, 0.0049 M de KCl.

Solución PBS pH 7.3.

Concentración 0.0014 M de NaCl, 0.0026 M de KCl, 0.0042 M de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> y 0.0014 M de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.

Marcador lipofílico DiI (Dialquilcarbocianina).

Se utilizó a una concentración del 10%, diluido en dimetilsulfóxido (Lipophilic Tracers, 1996).

DABCO/ glicerol 0.21 M.

800ul de DABCO/H<sub>2</sub>O desionizada más Tris 1M/pH 8 y se diluye al 10% en glicerol.

Colágena.

Para la extracción de colágena de rata se utilizaron colas congeladas a -20° C. Se descongelaron a temperatura ambiente. Después de esto se esterilizaron en alcohol al 70% por 10 minutos y se le practicó una extracción mecánica de las fibras de colágena. Esto se logró exprimiendo las colas de rata con unas pinzas hasta obtener el material gelatinoso que constituye la colágena. Las fibras obtenidas se aislaron de los demás tejidos y se colocaron en una caja de petri estéril con etanol al 70% por 15 minutos. Después se recolectaron en un tubo tratando de quitarles el etanol usado, añadiendo ácido acético al 0.1% y con agitación lenta por un día completo las fibras de colágena se disolvieron. Al día siguiente se diluyeron un poco con H<sub>2</sub>O desionizada (aproximadamente 300 ml) y centrifugó por 30 minutos a 12000 rpm. Por último se recolectó el

sobrenadante y almacenó a 4°C. A este extracto crudo de colágena se le adicionaron otros componentes para formar la mezcla del gel de colágena utilizado en los cultivos.

La mezcla del gel de colágena se preparó con 300 microlitros de D-MEM, 100 microlitros de colágena, 10 microlitros de NaCl 1.537 M y 10 microlitros de Bicarbonato de sodio al 7.5%. La mezcla se mantuvo en hielo hasta el momento de ser usada.

### III. Métodos

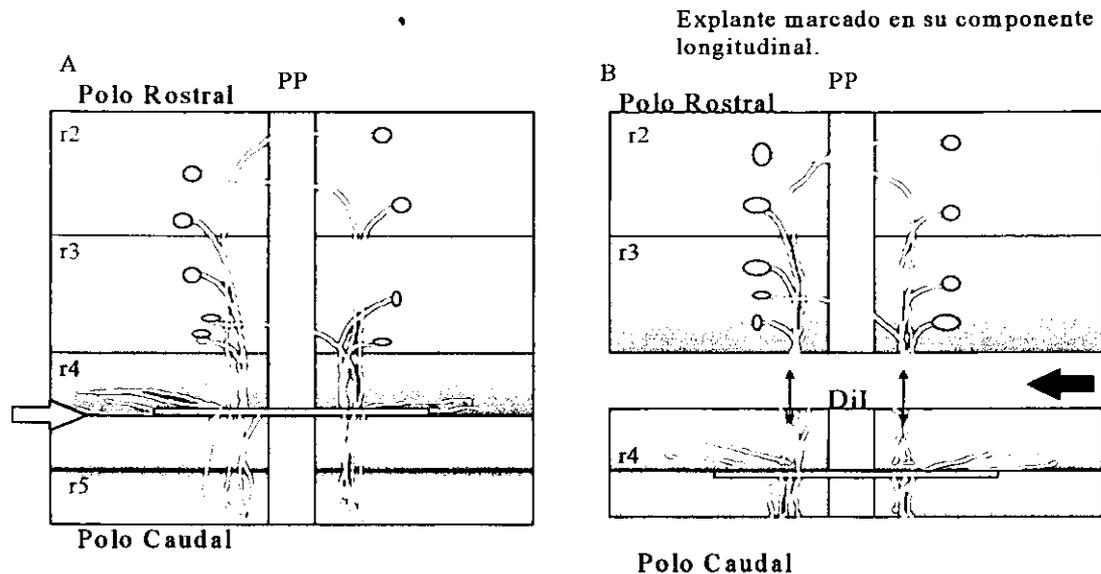
**A. Sistema de cultivo para el crecimiento de axones reticuloespinales.** El desarrollo de un método adecuado de cultivo fue de vital importancia ya que nos permitió evaluar la actividad quimiotrópica de los explantes utilizados. En este trabajo se utilizaron cultivos en geles de colágena. Ésta es una matriz semisólida que proporciona un sustrato permisivo para el crecimiento axonal y la formación de gradientes de moléculas difusibles con propiedades quimiotrópicas (Guthrie y Lumsden, 1994) para los propósitos descritos en la sección 3. Como fuente de neuronas con proyección caudal se utilizaron explantes de rombómeras 2 y 3 (r2 y r3). Este explante de rombencéfalo rostral muestra dos polos, uno rostral que corresponde al borde de rombómera 2 y otro caudal que es el borde de rombómera 3. La suposición inicial fue que el crecimiento neurítico que se observa en el borde de rombómera 3 corresponde a los axones reticuloespinales de proyección caudal *in vivo*. Una vez obtenidos los explantes de rombómeras 2 y 3 conteniendo los axones reticuloespinales se montaron en un gel de colágena y se mantuvieron en cultivo por 48 horas. En un ensayo típico en las cajas de cultivo de cuatro pozos se ponen 30 microlitros del gel, esparciéndose hasta formar un disco de aproximadamente 6 milímetros de diámetro y se deja solidificar el gel por 15 minutos dentro de la incubadora. Al término de este tiempo las cajas se encuentran listas para montar el cultivo, para ello los explantes ya recortados que se encuentran en la solución Ringer se toman con una micropipeta, se colocan sobre el gel de colágena y se extrae el exceso de líquido. Posteriormente se colocan 30 microlitros de la mezcla de colágena sobre los explantes y se esparce de forma uniforme sobre la superficie del gel que se colocó al inicio cubriendo por completo los explantes. Por último se mantienen otros 15 minutos en la incubadora para permitir la solidificación de este último gel. Transcurrido ese tiempo se colocan 700 microlitros de medio de cultivo Opti-Mix y se incuban por 48 horas a 37° centígrados en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%. Al terminar este lapso, los cultivos son fijados con paraformaldehído al 3.5% dentro de las mismas cajas de

cultivo de 4 pozos. El crecimiento de neuritas es evaluado utilizando una cámara lúcida y contando todas las neuritas que proyectan al gel de colágena. En el caso del cultivo de explantes con neuronas marcadas con DiI, el conteo de neuritas se hace con la ayuda de microscopía de fluorescencia ó confocal.

En algunos diseños se utilizaron explantes de istmo sin placa del piso, para estos casos se hicieron cortes con agujas de tungsteno en la cara ventral del istmo a cada lado de la placa del piso y así poder separarla del resto del explante. El istmo sin la placa del piso fue puesto en cocultivos con explantes de rombencéfalo.

**B. Marcaje retrógrado de axones reticuloespinales.** Para encontrar una región del neuroepitelio que estuviera involucrada en el control del crecimiento de los axones reticuloespinales en sentido caudal se utilizaron explantes de rombómeras 2 y 3 que contienen estas neuronas. El poder marcar selectivamente a este grupo de axones permite además evaluar su crecimiento cuando son cocultivados con otras regiones del sistema nervioso central y determinar si en los explantes se mantiene la misma polaridad de crecimiento caudal observada *in vivo*. Una vez obtenidos los embriones, cada uno de ellos es fijado a una superficie de silicón mediante agujas, con la parte ventral hacia arriba y cubiertos con solución Ringer. A continuación se hace un corte a nivel de la orofaringe del embrión y se sigue disectando hasta exponer la cara ventral del tubo neural a nivel de rombómera 4. Se hace un corte transversal a este nivel en la región de la línea media ventral del tubo neural, abarcando el FLM de ambos lados. Se aplican 1.5 microlitros del marcador lipofílico DiI procurando que la superficie del corte entre en contacto con el marcador. El marcador se difunde en la membrana celular de somas y axones lo que permite su marcaje de forma pasiva. Inmediatamente después del marcaje se incuban los embriones por 2 horas a 37° centígrados para permitir el marcaje de axones y neuronas reticuloespinales. Después de concluido este tiempo se disecta en sentido rostral y caudal del embrión hasta extraer el rombencéfalo. Con agujas de tungsteno se cortan las rombómeras 2 y 3 y se excluye el sitio donde se realizó el marcaje. Con esto nos aseguramos de que los axones y cuerpos neuronales que queden marcados en este explante hayan sido sólo aquellos que posean un componente longitudinal por medio del cual viajó el marcador (Figura 6). Los explantes son mantenidos en solución Ringer fría hasta ser montados en laminillas para su visualización en microscopía de fluorescencia ó en un gel de colágena para continuar la estrategia de cultivo. En caso de seguir con el cultivo, al término del mismo los explantes se fijan

con paraformaldehído y se guardan por espacio de una semana en la oscuridad. Posteriormente los explantes son montados en laminillas y recubiertos con solución de DABCO/glicerol.



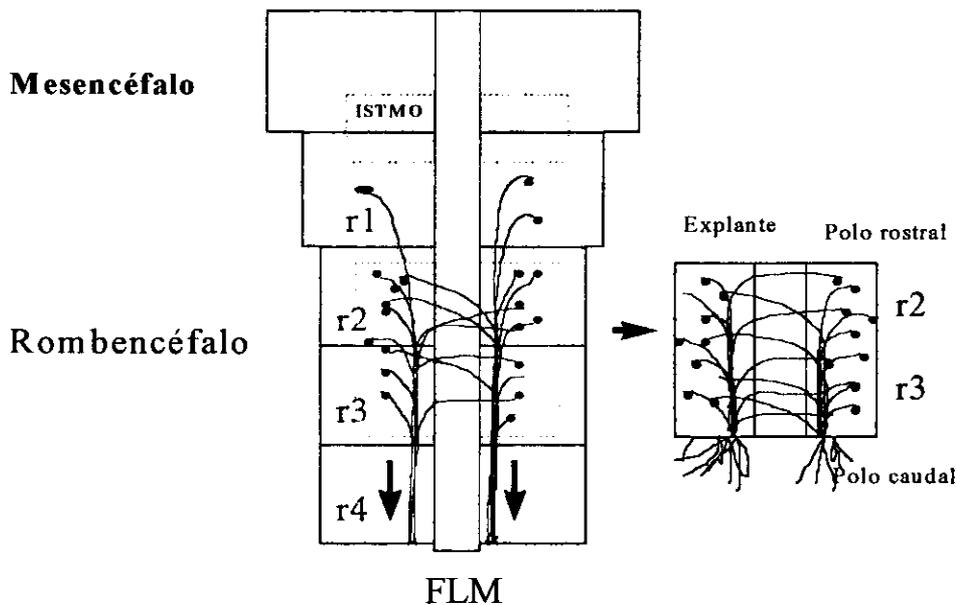
**Figura 6. Esquema que muestra el marcaje específico de axones con un componente longitudinal.** A. El marcador lipofílico DiI se aplica mediante una micropipeta en el sitio de incisión transversal (flecha blanca) y se mantiene por dos horas en incubación permitiendo el transporte del marcador por los axones. B. Dos horas después se hace un corte con aguja de tungsteno separando la mitad de r4 del resto del explante (flecha negra). De este modo se conservan solamente las neuronas marcadas con DiI a través del componente longitudinal de sus axones.

**C. Identificación del tejido fuente de moléculas quimiotrópicas para axones reticuloespinales.** Se hicieron cocultivos en geles de colágena de explantes de rombencéfalo rostral (rombómeras 2 y 3) conteniendo axones reticuloespinales junto a explantes de otras partes del tubo neural. De este modo se evaluó el efecto de distintas partes del tubo neural sobre el crecimiento del borde caudal de rombómera 3. En caso de que el explante produjera moléculas quimiorepelentes, éstas se difundirían por el gel creando un gradiente de concentración que inhibiría o desviaría el crecimiento caudal de los axones reticuloespinales; si se produjesen moléculas quimioatrayentes, el crecimiento se vería favorecido. Se utilizaron explantes de regiones que flanquean al rombencéfalo en su parte anterior o regiones caudales al mismo. La región del itsmo, localizado en el margen anterior del rombencéfalo es un candidato como fuente de moléculas quimiorepelentes para axones reticuloespinales. Tomando en cuenta que el FLM llega hasta niveles cervicales en el SNC adulto, regiones localizadas en la médula espinal también podrían secretar moléculas difusibles quimioatrayentes que induzcan el crecimiento caudal de los axones.

## RESULTADOS

### I. Las Neuronas de Proyección Caudal Mantienen su Polaridad *In Vitro*

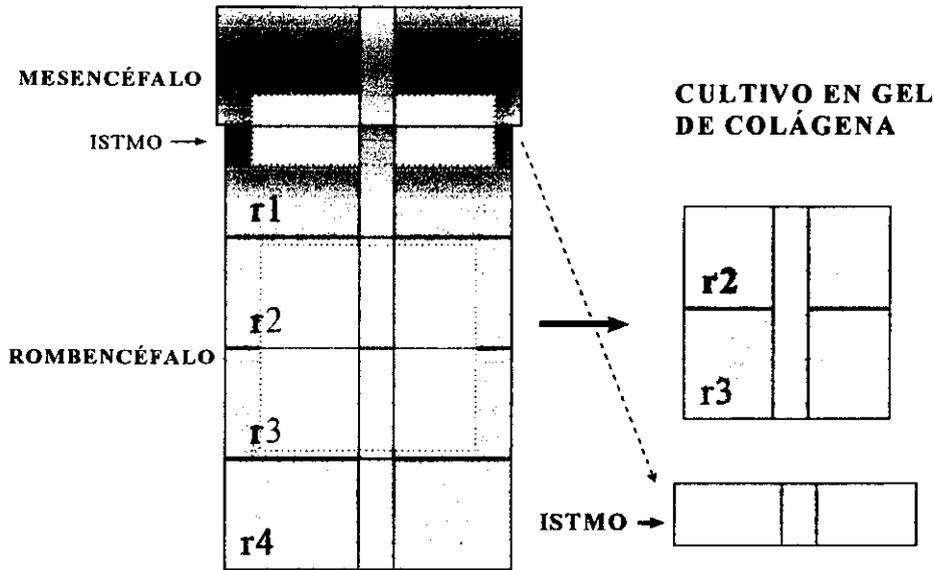
Como fuente de neuronas con proyección caudal se utilizaron explantes de rombómeras 2 y 3 (r2 y r3). Este explante de rombencéfalo rostral muestra dos polos, uno rostral que corresponde al borde de rombómera 2 y otro caudal que es el borde de rombómera 3. La suposición inicial fue que el crecimiento neurítico que se observa en el borde de rombómera 3 corresponde a los axones reticuloespinales de proyección caudal *in vivo* (Figura 7).



**Figura 7. Explante de rombencéfalo con neuronas reticuloespinales.** Esta figura muestra la situación topográfica del explante de r2 y r3 en el tallo cerebral. Se muestra además la presencia de neuronas reticuloespinales proyectando a partir de la r1 sobre el FLM, algunas de estas neuronas proyectan sus axones contralateralmente atravesando la placa del piso para unirse al FLM contralateral. Del lado derecho se ejemplifica el explante obtenido de r2 y r3 conteniendo neuronas reticuloespinales que después se cultivarán.

Se realizó marcaje retrógrado con DiI con el propósito de identificar con certeza los axones reticuloespinales y así poder observar su crecimiento en gels de colágena. Se examinó el crecimiento neurítico por medio de microscopía de fluorescencia y confocal. Se encontró que los axones marcados en su componente longitudinal con DiI crecían hacia la colágena del margen

caudal del explante. Con esto se confirmó que los explantes mantienen la polaridad de crecimiento axonal observada *in vivo* (Figura 11A).



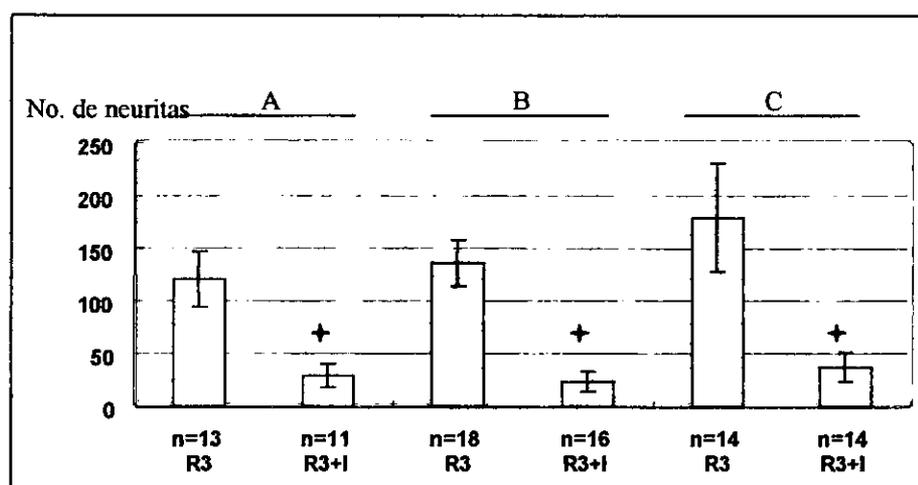
**Figura 8. Cocultiva de un explante de rombencéfalo con un explante de istmo.** Se toma el explante de tejido istmico y se monta junto al borde caudal de r3 en geles de colágena y se cultiva por dos días. Al término del cultivo se evalúa el crecimiento del borde de r3.

## II. El Istmo Inhibe el Crecimiento de Neuritas con Proyección Caudal *In Vitro*

En ensayos de cocultivos se probaron estructuras encontradas tanto en la parte rostral al explante de rombómeras 2 y 3 como aquellas encontradas caudalmente. Se esperaba que los explantes rostrales fueran repelentes del crecimiento neurítico del borde caudal de r3 y que los explantes de regiones caudales lo favorecieran. Se probaron las regiones del istmo, rombómeras 7 y 8 y neuroepitelio cervical. Para evaluar el efecto del istmo sobre estas neuritas los explantes fueron cultivados de tal modo que el borde caudal del explante quedara junto al borde de un explante istmico.

La predicción derivada de nuestra hipótesis es que si el istmo produce una molécula quimiodifusible que repele el crecimiento de axones que proyectan caudalmente *in vivo*, esto se manifestaría *in vitro* como una inhibición del crecimiento (Figura 8). En nuestros ensayos en geles de colágena, el istmo inhibió el crecimiento de axones de proyección caudal. Los

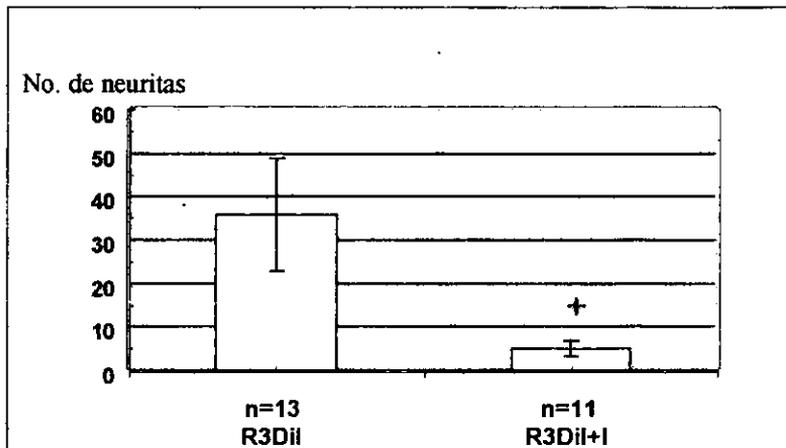
resultados mostraron que cuando el borde caudal de rombómera 3 es cultivado junto con el istmo, el número de neuritas totales producidas a los dos días es de 75 a 83% menos que el obtenido con explantes control [ $t_{0.05}(22) = 11.151$   $p < 0.05$ ;  $t_{0.05}(32) = 19.325$   $p < 0.05$ ;  $t_{0.05}(26) = 10.062$   $p < 0.05$ ] (Figura 9). Estos resultados sugieren que el istmo produce una molécula difusible que modula el crecimiento de axones de proyección caudal.



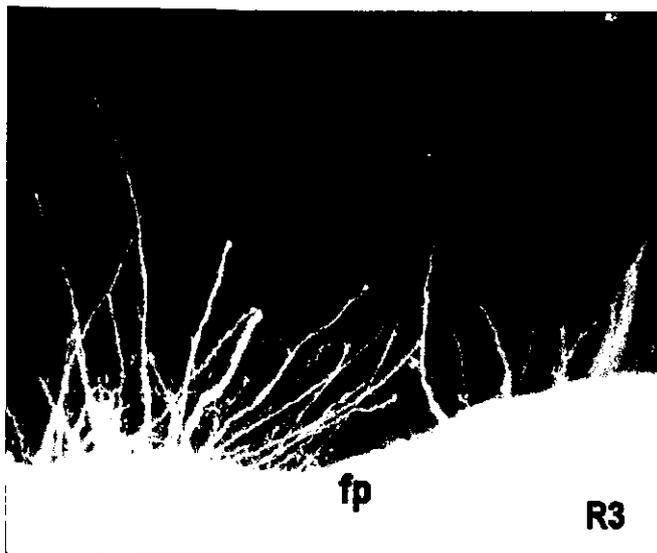
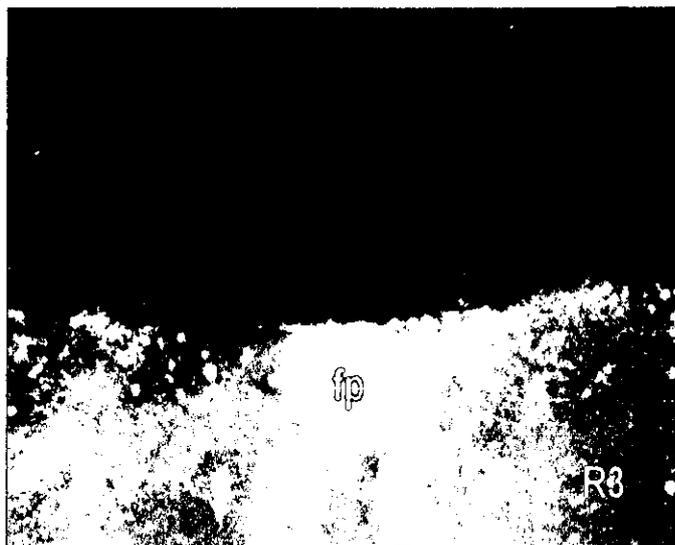
**Figura 9. Efecto inhibitorio del istmo sobre el borde caudal de rombómera 3.** La gráfica muestra los resultados de los tres experimentos (A, B y C) cocultivando el istmo adyacente al borde caudal de r3. La barra de la izquierda para cada experimento corresponde a los cultivos control (R3) y la barra de la derecha a los cocultivos con istmo (R3+I). En todos los experimentos se observó una inhibición significativa de alrededor del 75% (Apéndice I). + Significativamente diferentes del control  $p < 0.05$ . n= número de cultivos por grupo.

### III. El Istmo Produce una Inhibición Específica sobre Neuronas de Proyección Caudal

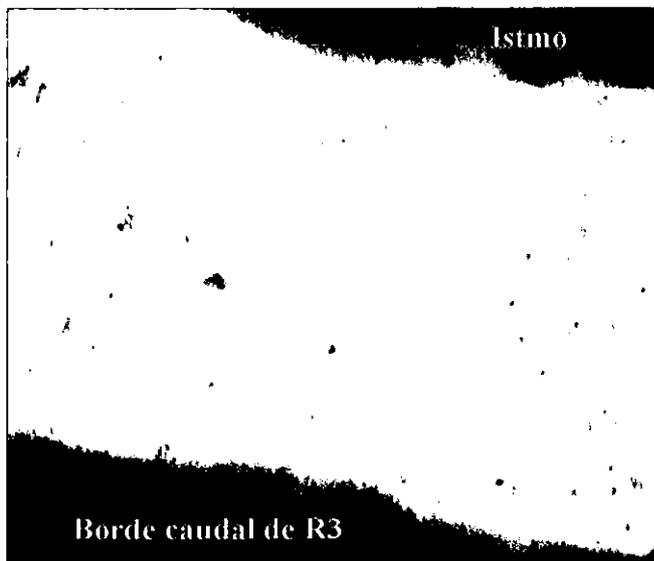
Con el propósito de evaluar la conducta en el crecimiento de neuronas con un componente axonal longitudinal y caudal se marcaron explantes de rombencéfalo rostral con DiI y se cocultivaron junto con el istmo. Al término del período de cultivo el crecimiento neurítico fue evaluado por medio de microscopía de fluorescencia y confocal. El conteo del número de neuritas de cocultivos y controles reveló que la inhibición causada por el istmo en axones marcados con DiI fue de 85% ( $t(22) = 60.0238$   $p < 0.05$ ) (Figura 10). Estos resultados mostraron que cuando se marcaron selectivamente neuronas con un componente de crecimiento longitudinal y caudal, el istmo inhibió de forma comparable a los no marcados (Figuras 11 y 12).



**Figura 10. Efecto inhibitorio del istmo en el crecimiento de axones de proyección caudal marcado con DiI.** Esta figura muestra los resultados de cocultivos de istmo con el borde caudal de explantes de rombencéfalo rostral. El marcador utilizado permite localizar aquellas neuronas que poseen un componente longitudinal en su proyección axonal y así, evaluar su crecimiento cuando se exponen al efecto inhibitorio del istmo. En este experimento se observó una disminución del crecimiento del 85% (Apéndice II). + Significativamente diferente del control  $p < 0.05$ . R3DiI: número de neuritas en el borde caudal de rombómera 3 marcado con DiI. R3DiI+I: número de neuritas en el borde caudal de rombómera 3 marcado con DiI cocultivado con istmo.

**A****B**

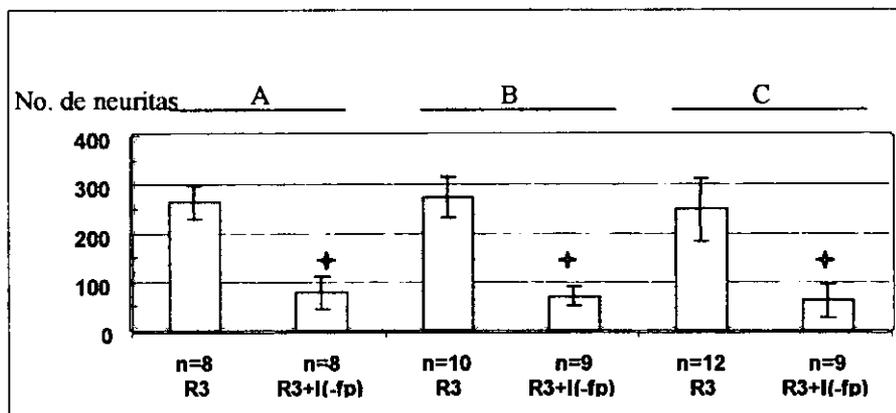
**Figura 11. Micrografía en microscopio confocal.** La fotografía A muestra el borde caudal de un explante de rombencéfalo rostral marcado con DiI y cultivado en un gel de colágena. La fotografía B muestra el borde caudal de un explante de rombencéfalo caudal cocultivo con el istmo en un gel de colágena. Obsérvese la inhibición en el crecimiento de neuritas causada por el istmo.

**A****B**

**Figura 12. Micrografía de cultivos de explantes de rombencéfalo rostral.** La fotografía A muestra un explante de rombencéfalo rostral en cultivo en gel de colágena y se muestran neuritas creciendo hacia el gel. La fotografía B muestra un cocultivo de explante de rombencéfalo rostral junto con el istmo. Se aprecia la inhibición en el número de neuritas que crecen hacia el gel en presencia del istmo.

#### IV. La Inhibición Causada por el Istmo no Depende de la Placa del Piso

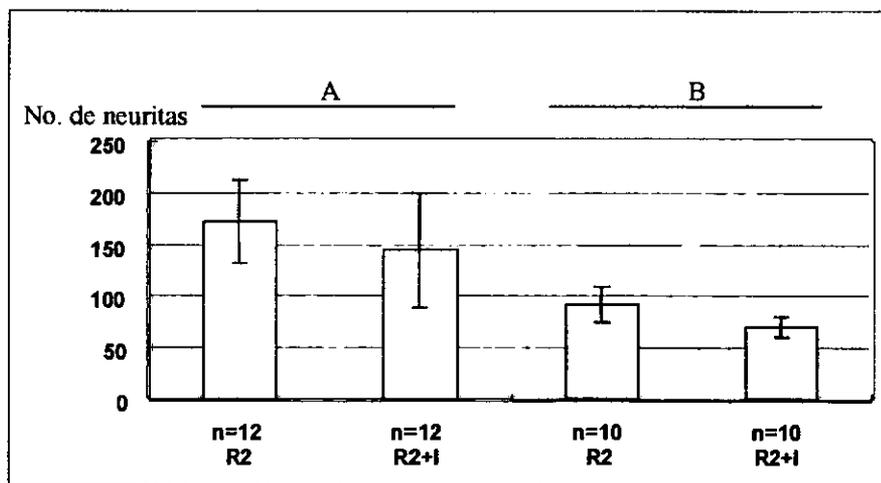
Debido a que la placa del piso que se encuentra presente en el istmo produce netrina-1 y dado que ésta es una molécula quimiotrópica para axones de varios tipos neuronales, en uno de nuestros experimentos se eliminó del explante ístmico para determinar si ésta era responsable de la inhibición observada. La predicción fue que el crecimiento seguiría siendo inhibido, debido a que la netrina-1 se expresa en la placa del piso a todo lo largo del eje longitudinal del tubo neural haciendo poco probable que ésta sea la señal responsable del crecimiento longitudinal. Los resultados de los cocultivos del borde caudal de rombómera 3 junto al istmo carente de la placa del piso, mostraron una reducción en el crecimiento comparable a la producida por el istmo con placa del piso [ $t_{0.05}(14) = 11.1139$   $p < 0.05$ ;  $t_{0.05}(17) = 13.3814$   $p < 0.05$ ;  $t_{0.05}(19) = 7.8704$   $p < 0.05$ ] (Figura 13). Estos resultados muestran que la placa del piso no influye en la inhibición del crecimiento de los axones en la parte caudal de rombómera 3 y que esta inhibición se debe a la presencia de otras moléculas diferentes a netrina-1.



**Figura 13.** La acción inhibitoria del istmo no depende de la placa del piso. Esta figura muestra los resultados de cultivos control de r2-r3 (R3) y cocultivos con istmo sin PP [R3+I (-fp)]. Las letras A, B y C corresponden a tres experimentos separados. En cada grupo, la barra del lado izquierdo corresponde al crecimiento del borde de R3 en los controles y la del lado derecho a los experimentales. En los cocultivos se observó una disminución del crecimiento entre el 70 al 75% en comparación con los cultivos control (Apéndice III). + Significativamente diferente del control  $p < 0.05$ .

## V. La Actividad Inhibitoria del Istmo es Específica para Axones de Proyección Caudal

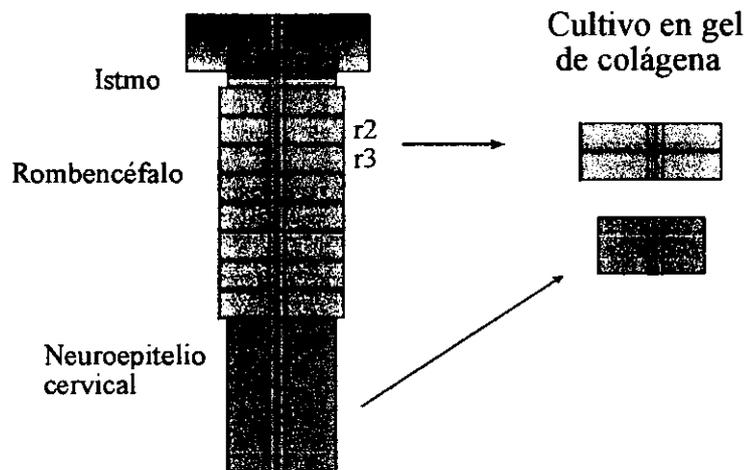
Para evaluar la especificidad de la inhibición del istmo sobre axones de proyección caudal, se realizaron cocultivos en los que el istmo se cultivó adyacente al borde rostral de rombómera 2. En este experimento se esperaba que el istmo no tendría el mismo efecto inhibitorio sobre los axones que crecen en dirección rostral. En los resultados de estos experimentos se observó que el istmo causó una inhibición de un 15 a un 23% en comparación con los controles (Figura 14). Esta inhibición puede deberse a que a nivel del corte rostral del explante se encuentren neuronas reticuloespinales que en el cultivo crecen hacia la matriz de colágena y en este experimento se inhibió su crecimiento por la presencia del istmo. Otra posibilidad es que las neuritas inhibidas sean motoras y que la inhibición se deba a la netrina-1 presente en la placa del piso del istmo. Por otro lado, no se encontró que el istmo tuviera influencia quimioatrayente en las neuritas de proyección rostral. Es posible que esta función se encuentre en alguna región más rostral al istmo. De cualquier modo, la inhibición del crecimiento en el margen de r2 es no significativa y mucho menor que la inhibición de las neuritas del margen caudal de rombómera 3. Esto sugiere que la inhibición es específica para axones que crecen en sentido longitudinal y caudal.



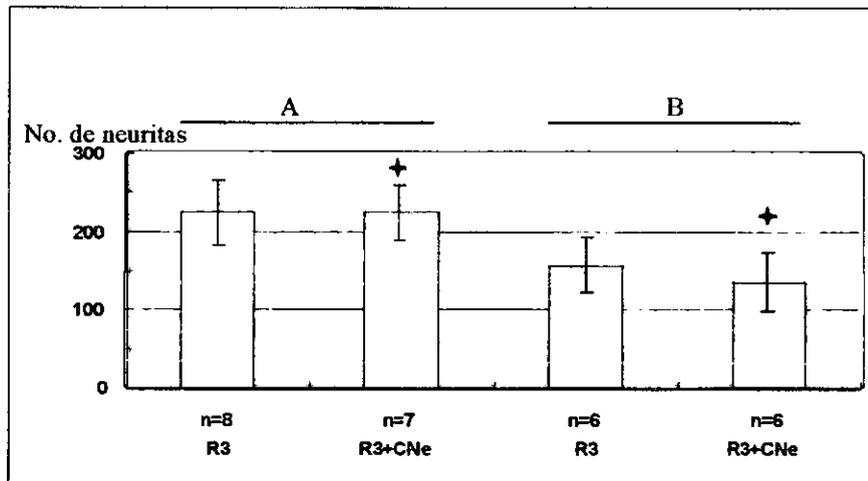
**Figura 14.** El efecto inhibitorio del istmo es específico para axones que proyectan caudalmente. Esta figura muestra los resultados de cocultivos de istmo más el brode rostral de rombómera 2. Las letras A y B corresponden dos experimentos independientes. Para cada grupo, la barra del lado izquierdo corresponde a los cultivos controles (R2) y la del lado derecho a los experimentales (R2+I). Se encontró una inhibición causada por el istmo entre el 15 al 23% (Apéndice IV).

## VI. El Neuroepitelio Cervical no Incrementa el Crecimiento Caudal de r3

Para determinar si la actividad inhibitoria secretada por el istmo sobre el borde caudal de r3 era específica de esta región, utilizamos explantes provenientes del neuroepitelio cervical en los cocultivos. De esta región del neuroepitelio no se esperaba una actividad inhibitoria puesto que se localiza caudal al rombencéfalo y normalmente permite el crecimiento de axones que proyectan hasta diversos niveles en la médula espinal (Figura 15). Estos experimentos no mostraron reducción en el crecimiento del borde de r3 por el neuroepitelio cervical (Figura 16). Estos datos muestran que la actividad inhibitoria del istmo es específica y su efecto no es compartido con otras regiones. Sin embargo, el neuroepitelio cervical puede servir como ruta permisiva para el crecimiento de axones en su descenso hacia niveles más caudales en la médula espinal ó como un atrayente para otros axones de proyección caudal.



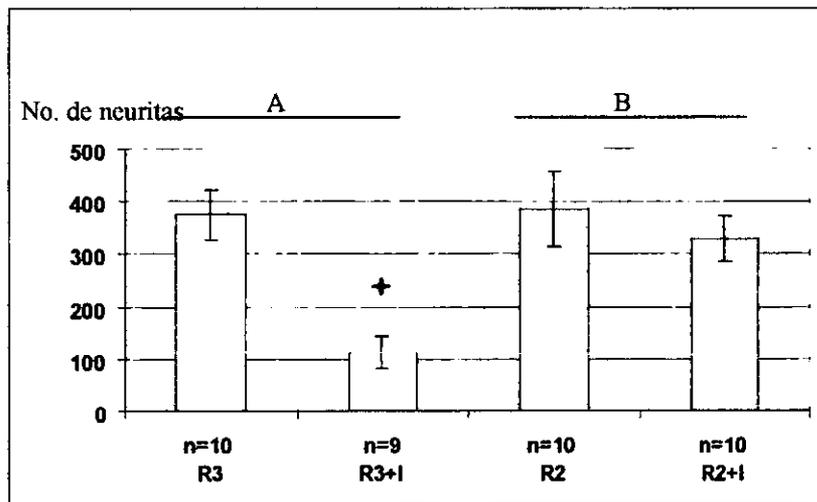
**Figura 15. Cocultivo de r3 más neuroepitelio cervical.** La figura muestra el cocultivo de rombencéfalo rostral más neuroepitelio cervical.



**Figura 16.** El neuroepitelio cervical no atrae el crecimiento caudal de rombómera 3. Resultados de los cocultivos del borde caudal de rombómera 3 (R3) con neuroepitelio cervical (CNe). El par de barras del lado izquierdo (azul) corresponden a un grupo experimental y el otro par (rojo) a otro grupo. Los resultados no mostraron inhibición ni aumento del neuroepitelio cervical sobre el explante de rombocéfalo (Apéndice V).

## VII. Efecto Específico del Istmo en la Inhibición del Crecimiento sobre Rombómera 3

En los experimentos previos, el cultivo de explantes de r2-r3 con explantes de istmo en sus márgenes rostrales ó caudales se llevó a cabo en experimentos separados. Para confirmar los resultados obtenidos en esos experimentos y reducir la variabilidad experimental se repitieron esos cultivos con sus respectivos controles en un solo experimento. Los resultados obtenidos fueron similares a los ya descritos para cada diseño: el istmo causó una inhibición del 70% cuando se cocultivó junto a r3 [ $t$  0.05 (17) 14.1261  $p < 0.05$ ] y una inhibición del 16% cuando se hizo junto a r2 (Figura 17).



**Figura 17. Efecto inhibitorio del istmo en el crecimiento de neuritas.** Resultados de cocultivos de istmo más rombómera 2 y 3. Para confirmar los resultados obtenidos en los experimentos anteriores se evaluaron los diferentes modelos en el mismo experimento. Las letras A y B corresponden a los experimentos. El grupo A es un diseño experimental de rombómera 3 más istmo (R3+I) y el B, de rombómera 2 más istmo (R2+I); cada uno con sus respectivos controles. El cocultivo del istmo con rombómera 3, mostró una inhibición del 70%. + Diferente del control,  $p < 0.05$ . En el cocultivo de istmo más rombómera 2, la inhibición fue del 16 % (Apéndice VI). Este diseño disminuye el número de variables presentes y demuestra la inhibición específica sobre el borde caudal del explante de rombencéfalo.

## DISCUSIÓN

El Sistema Nervioso Central posee circuitos neurales interconectados de forma muy compleja que se forman en las etapas tempranas del desarrollo (Daston y Koester, 1996). Estos circuitos neurales se crean a partir de la proyección dinámica de axones en crecimiento desde su sitio de origen hasta alcanzar a sus blancos. La proyección axonal compleja se controla por sistemas moleculares de navegación que a través de señales de corto y largo alcance guían activamente al cono de crecimiento. Estas señales determinan la ruta que el axón sigue hasta su destino final (Varela-Echavarría y Guthrie, 1997; Tessier-Lavigne y Goodman, 1996). De estos sistemas se conocen varios que guían el crecimiento circunferencial, sin embargo, las señales moleculares implicadas en la navegación axonal a lo largo de rutas longitudinales en el SNC no han sido esclarecidas. En esa dirección, nuestros resultados sugieren que las proyecciones longitudinales descendentes en el rombencéfalo son influenciadas por moléculas repelentes secretadas por el istmo, haciendo que sus axones crezcan alejándose de éste. Aunque nuestros resultados no lo indican así, también es posible que señales atrayentes caudales participen en este proceso.

Con el propósito de identificar componentes del sistema guía de proyección longitudinal, utilizamos como modelo experimental explantes de la región rostral del rombencéfalo. Estos explantes contienen poblaciones de axones reticuloespinales que proyectan sus axones en dirección caudal. La proyección de estos axones se inicia alrededor del doceavo día de gestación en el embrión de rata (Auclair et al., 1995). Para evaluar el posible papel de estructuras ubicadas rostralmente a la región donde se obtuvo el explante en el sistema guía de navegación axonal longitudinal, se hicieron cocultivos en geles de colágena de estas regiones junto con el borde caudal del rombencéfalo rostral. Este gel proporciona un sustrato permisivo para el crecimiento axonal y permite la formación de gradientes de moléculas difusibles con propiedades quimiotrópicas (Guthrie y Lumsden, 1994). De esta forma, se evaluó la influencia que ejercían regiones del neuroepitelio, como el istmo, sobre el crecimiento de neuritas en el borde caudal de rombómera 3 cuando eran cultivados adyacentes a éste. Al término de cada cultivo se contabilizó el número de neuritas que habían crecido hacia el gel de colágena en presencia del explante en estudio, comparándolo con los controles. Los experimentos nos permitieron observar que el istmo provoca una disminución significativa del crecimiento de neuritas que corresponden a axones de proyección caudal *in vivo* y no de aquellos de proyección rostral. Estos resultados

sugieren que el istmo está involucrado en el control de las proyecciones descendentes de la región rostral del rombencéfalo. Los diseños experimentales nos permitirán valorar qué efecto tienen otras zonas sobre la navegación axonal en el eje longitudinal del tubo neural. Por ejemplo queda pendiente la valoración más extensa de alguna zona del neuroepitelio cervical que pudiera atraer el crecimiento del borde caudal del explante de rombómera 3. Además averiguar si las inhibiciones parciales que causa el istmo sobre el borde de rombómera 2 corresponden a la presencia de la placa del piso, donde se produce netrina-1 ó si es una respuesta específica a alguna molécula no identificada presente en esta zona. Desarrollar experimentos que analicen la supervivencia neuronal cuando se cultivan junto al istmo para descartar una inducción de muerte neuronal más que una inhibición del crecimiento.

**El istmo como organizador del crecimiento axonal.** Resultados obtenidos de los experimentos realizados en embriones de pollo con neuronas comisurales espinales por Yaginuma y Oppenheim (1991) también mostraron la influencia ejercida por señales difusibles de origen rostral. Estas neuronas proyectan sus axones desde el aspecto dorsal de la médula espinal hacia la placa del piso, atravesándola para después proyectar en sentido rostral. En estos experimentos se hizo una inversión rostrocaudal del tubo neural a nivel de las tres últimas somitas en estadios 14 y 15 de desarrollo. El segmento de tubo neural fue invertido en 180°, transplantado en su región de origen y mantenido por uno o dos días en incubación. Al término de este período se observó que las neuronas invertidas contenidas en la región transplantada proyectaban hacia el polo rostral del hospedero, cambiando el sentido de su proyección original. Con esto se encontró que existe una señal difusible en la región rostral que dirige al transplante el sentido del crecimiento en dirección ascendente. Estos hallazgos, aunados a los resultados de nuestros experimentos ponen de manifiesto la dominancia de señales rostrales en la organización de la navegación axonal longitudinal. Sin embargo resulta poco probable que la molécula producida por el istmo que inhibe las proyecciones caudales del rombencéfalo rostral sea la misma que atrae a las proyecciones ascendentes de los axones comisurales. Esto es debido a que la distancia entre las neuronas comisurales espinales y el istmo es muy grande en comparación con el radio de difusión teórico esperado para una molécula quimiotrópica derivada del istmo. En otros estudios se ha demostrado que la región del istmo juega un papel determinante como un organizador en la determinación de la identidad regional (Danielain y Mc Mahon, 1996; Lee et al., 1997). Los genes *FGF-8*, *Wnt1*, *Otx2*, *En1* y *En2* involucrados en dichos procesos podrían al

mismo tiempo iniciar una cascada de eventos que culminarían en la activación de los sistemas de control molecular para la navegación longitudinal (Daston y Koester, 1996; Krumlauf et al., 1993). Así, el istmo podría actuar no sólo como un organizador de la identidad regional sino también como un organizador del crecimiento axonal por medio de la secreción de moléculas quimiotrópicas para axones en crecimiento.

**Probables moléculas señalizadoras.** Entre las moléculas expresadas en esta región que podrían estar involucradas en ese proceso se puede citar a la netrina 1, netrina 2, semaforina 3A, semaforina 3F, FGF-8 y a miembros de la familia de efrinas. Las netrinas se expresan en la parte ventral del tubo neural pero su expresión no está confinada a la región del istmo sino que se expresa a todo lo largo del tubo neural (Kennedy et al., 1994). Además, cuando cocultivamos neuroepitelio cervical, que contiene la placa del piso y expresa netrina-1 y semaforina 3A, con el borde caudal de rombómera 3 no observamos ninguna inhibición significativa. Estos datos hacen improbable su participación en sistemas de proyección longitudinal. La semaforina 3A es también un candidato improbable ya que a pesar de que se expresa en la región del istmo su distribución no se restringe al eje céfalocaudal (Messersmith et al., 1995). Otras moléculas como las efrinas son también poco probables ya que, aunque algunas de estas moléculas presentan gradientes de expresión en la región ístmica, su función se encuentra restringida a señales por contacto. Los efectos encontrados experimentalmente en los cocultivos demuestran que la molécula expresada en el istmo es capaz de viajar en el gel, formando un gradiente de expresión sin anclarse a otras membranas celulares. Otra de las moléculas que podrían estar implicadas en esta respuesta de repulsión es el FGF-8. Éste se expresa en el istmo alrededor de los estadios de 8 a 15 somitas y aunque forma un gradiente de expresión, su radio de difusión es pequeño (Liu, Losos y Joyner, 1999; Martínez et al., 1999). Por otra parte, estudios llevados a cabo en el pez zebra con una mutación nula para *FGF-8* han demostrado que las proyecciones de los axones reticuloespinales se mantienen normales (Alex Picker, comunicación personal). Esta evidencia sugiere que el *FGF-8* no se encuentra implicado en esta función o que contribuye de forma parcial junto con otras moléculas para controlar la polaridad del crecimiento. Otra molécula probablemente implicada es la semaforina 3F. Esta molécula tiene efectos repelentes sobre axones simpáticos, hipocampales y del bulbo olfatorio y forma gradientes de concentración decreciente partiendo del istmo en sentido rostral hacia el mesencéfalo y en sentido caudal hacia

rombómera 1 (Giger et al., 2000). Existe también la posibilidad de que la molécula responsable del efecto observado no sea aún conocida.

Para evaluar el papel de Sema 3F y FGF-8 en el control del crecimiento de axones rombencefálicos de proyección caudal sería necesario llevar a cabo experimentos como los descritos en el presente trabajo usando fuentes focales de estas proteínas. Una de las alternativas es llevar a cabo los cultivos de los explantes de rombencéfalo rostral adyacentes a microesferas impregnadas con FGF-8 recombinante ó junto con agregados de células transfectadas con vectores de expresión para Semaforina 3F y FGF-8. También se podría evaluar el crecimiento axonal *in vivo* cuando se altera la expresión de algunas de las moléculas posiblemente implicadas mediante knock-outs específicos en ratones.

**Otras poblaciones neurales afectadas por el istmo.** Es posible que el istmo se encuentre controlando la proyección caudal no sólo de las neuronas reticuloespinales sino también de otras poblaciones neurales ubicadas en el rombencéfalo rostral. Un ejemplo son las neuronas de los núcleos caudales del rafe que pertenecen al sistema serotoninérgico y que se ubican en las rombómeras rostrales. Estas neuronas proyectan en sentido caudal a diferentes niveles de la médula espinal. Experimentos preliminares han mostrado que el istmo puede inhibir *in vitro* las proyecciones caudales serotoninérgicas de explantes de rombencéfalo rostral. Además si el istmo produce una molécula inhibitoria para axones de proyección caudal, es posible que también tenga un efecto similar para axones que se ubican en mesencéfalo caudal y que proyecten rostralmente. Otros resultados preliminares sugieren que el istmo puede inhibir *in vitro* proyecciones ascendentes de neuronas serotoninérgicas de explantes de mesencéfalo. El explante de rombencéfalo rostral utilizado en los experimentos contiene otras poblaciones neurales como parte de los núcleos del rafe y neuronas del núcleo *locus ceruleus* que presentan proyecciones ascendentes y es muy probable que se encuentren respondiendo de forma similar (Hynes y Rosenthal, 1999). Estas poblaciones neurales se pueden identificar *in vitro* por medio de inmunohistoquímica. La influencia del istmo como organizador del crecimiento axonal podría no solo afectar a las neuronas reticuloespinales sino también encontrarse implicado en el control del crecimiento axonal de muchas otras neuronas en todo el tallo cerebral.

**Perspectivas.** El siguiente paso será identificar qué otras neuronas responden a esta señal ístmica a nivel del tallo cerebral. Debido a su ubicación anatómica, el istmo podría actuar como un organizador del crecimiento axonal para variadas poblaciones neurales en el tallo cerebral en

desarrollo. Esto se valorará haciendo cocultivos de explantes ístmicos sin placa del piso junto con explantes de mesencéfalo y rombencéfalo. Los cultivos serán procesados mediante técnicas de inmunohistoquímica para identificar neurotransmisores de poblaciones neurales específicas que se encuentran proyectando en el tallo cerebral. Además se seguirá con la búsqueda de otras zonas organizadoras del crecimiento que junto con el istmo funcionen como sistemas de navegación axonal sobre el eje longitudinal del tubo neural.

## CONCLUSIONES

I- El istmo reduce significativamente el crecimiento en la proyección caudal de neuritas provenientes de explantes de rombencéfalo r2 y r3.

II- El epitelio cervical no presenta efecto alguno sobre el crecimiento caudal de neuronas reticuloespinales.

III- La actividad inhibitoria del istmo podría estar involucrada en la proyección caudal de axones reticuloespinales en el rombencéfalo en desarrollo.

## REFERENCIAS

- Adams R. H., Betz, H. y Püschel, A. W. (1996) A novel class of murine semaphorins with homology to thrombospondin is differentially expressed during embryogenesis. *Mech. Dev.* 57, 33-45.
- Auclair F., Marchand R. y Glover J. (1999). Regional patterning of reticulospinal and vestibulospinal neurons in the hindbrain of mouse and rat embryos. *J. Comp. Neurol.* 411, 288-300.
- Augsburger A., Schuchardt A., Hoskins S., Dodd J. y Butler S. (1999). BMPs as mediators of roof plate repulsion of commissural neurons. *Neuron* 24, 127-141.
- Ba-Charvet K., Brose K., Marillat V., Kidd T., Goodman C., Tessier-Lavigne M., Sotelo C. y Chédotal A. (1999). Slit2-mediated chemorepulsion and collapse of developing forebrain axons. *Neuron* 22, 463-473.
- Bagnard D., Lohrum M., Uziel D., Püschel A. y Bolz J. (1998). Semaphorins act as attractive and repulsive guidance signals during the development of cortical projections. *Development* 125, 5043-5053.
- Barinaga M. (1995) Receptor find work as guides. *Science* 269, 1668-1670.
- Bashaw G. y Goodman C. (1999) Chimeric axon guidance receptors: the cytoplasmic domains of slit and netrin receptors specify attraction versus repulsion. *Cell* 97, 917-926.
- Battye R., Stevens A. y Jacobs R. (1999). Axon repulsion from the midline of the *Drosophila* CNS requires Slit function. *Development* 126, 2475-2481.
- Behar O., Golden J., Mashimo H., Schoen F. y Fishman M. (1996). Semaphorin III is needed for normal patterning and growth of nerves, bones and heart. *Nature* 383, 525-528.
- Bernhardt R. R., Nguyen, N. y Kuwada, J. Y. (1992) Growth cone guidance by floor plate cells in the spinal cord of zebrafish embryos. *Neuron* 8, 869-882.
- Brose K., Bland K., Wnag K., Arnott D., Henzel W., Goodman C., Tessier-Lavigne M. y Kidd T. (1999). Slit proteins bind robo receptors and have an evolutionarily conserved role in repulsive axon guidance. *Cell* 96, 795-806.

- Brümmendorf T., Spaltmann F. y Treubert. (1997). Cloning and characterization of a neural cell recognition molecule on axons of the retinotectal system and spinal cord. *Eur. J. Neurosci.* 9, 1105-1116.
- Brusés J. y Rutishauser U. (1998). Regulation of neural cell adhesion molecule polysialylation: evidence for nontranscriptional control and sensitivity to an intracellular pool of calcium. *J. Cell Biol.* 140, 1177-1186.
- Burstyn-Cohen T., Tzarfaty V., Frumkin A. Feinstein Y, Stoeckli E. y Klar A. (1999). F-spondin is required for accurate pathfinding of commissural axons at the floor plate. *Neuron* 23, 233-246.
- Catalano S., Messersmith E., Goodman C., Shatz C. y Chédotal A. (1998). Many major CNS axon projections develop normally in the absence of semaphorin III. *Mol. Cell. Neurosci.* 11, 173-182.
- Chan S., Zheng H., Su M., Wilk R., Killeen M. Hedgecock E. y Culotti J. (1996). UNC-40, a *C. elegans* homolog of DCC (Deleted in Colorectal Cancer), is required in motile cells responding to UNC-6 netrin cues. *Cell* 87, 187-195.
- Chen H., Chédotal A., He Z., Goodman C. y Tessier-Lavigne M. (1997). Neuropilin-2, a novel member of the neuropilin family, is a high affinity receptor for the semaphorins sema E and sema IV but not sema III. *Neuron* 19, 547-559.
- Chiba A. y Keshishian H. (1996). Neuronal pathfinding and recognition: roles of cell adhesion molecules. *Dev. Biol.* 180, 424-432.
- Chothia C. (1997). The molecular structure of cell adhesion molecules. *Annu. Rev. Biochem.* 66, 823-862.
- Clarke G. y Moss D. (1997). GP55 inhibits both cell adhesion and growth of neurons, but not non-neuronal cells, via a G-protein-coupled receptor. *Eur. J. Neurosci.* 9, 334-341.
- Danielain P. S. y McMahon, A. P. (1996) *Engrailed-1* as a target of the wnt-1 signalling pathway in vertebrate midbrain development. *Nature*, 383, 332-334.
- Daston M. y Koester S. (1996). Transcriptional regulation of axon pathfinding. *Neuron* 17, 5-8.
- Dennis D. M. y Wilkinson D. G. (1999). Eph receptors and ephrins in general development. *Curr. Opin. Neurobiol.* 9: 65-73.
- Dodd J. y Schuchardt A. (1995). Axon guidance: A compelling case for repelling growth cones. *Cell* 81, 471-474.

- Eckhardt F., Behar O., Calautti E., Yonezawa K., Nishimoto I. y Fishman M. (1997). A novel transmembrane semaphorin can bind c-src. *Mol. Cell. Neurosci.* 9, 409-419.
- Giger R., Cloutier J., Sahay A., Prinjha R., Levensgood D., Moore S., Pickering S., Simmonds D., Rastan S., Walsh F., Kolodkin A., Ginty D. y Geppert M. (2000). Neuropilin-2 is required in vivo for selective axon guidance responses to secreted semaphorins. *Neuron* 25, 29-41.
- Giger R., Urquhart E., Gillespie S., Levensgood D., Ginty D. y Kolodkin A. (1998) Neuropilin-2 is a receptor for semaphorin IV: insight into the structural basis of receptor function and specificity. *Neuron* 21, 1079-1092.
- Gil O., Zanazzi G., Struyk A. y Salzer J. (1998). Neurotrimin mediates bifunctional effects on neurite outgrowth via homophilic and heterophilic interactions. *J. Neurosci.* 18, 9312-9325.
- Glover J. C. (1993). The development of brain projections to the spinal cord in the chick embryo. *Brain Res Bull* 30 (3-4), 265-271.
- Glover J. C. y Pettursdottir, G. (1991) Regional specificity of developing reticulospinal, vestibulospinal and vestibulo-ocular projections in the chicken embryo. *J. Neurobiol.* 22, 353-376.
- Gong Q., Rangarajan R., Seeger M. y Gaul U. (1999). The netrin receptor *frazzled* is required in the target for establishment of retinal projectionns in the *Drosophila* visual system. *Development* 126, 1451-1456.
- Götz B., Scholze A., Clement A., Joester A., Schütte, Wigger F., Frank R., Spiess E., Eklblom P. y Faissner A. (1996). Tenascin-C contains distinct adhesive, antiadhesive, and neurite outgrowth promoting sites for neurons. *J. Cell Biol.* 132, 681-699.
- Gumbiner B. (1996). Cell adhesion: The molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. *Cell* 84, 345-357.
- Guthrie S. (1995). The status of the neural segment. *Trends Neurosci.* 18, 74-79.
- Guthrie S. (1997). Axon guidance: Netrin receptors are revealed. *Curr. Biol.* 7 (1), 6-9.
- Guthrie, S. y Lumsden, A. (1994) Collagen gel coculture of neural tissue. *Neuroprotocols* 4, 116-120.
- Guthrie, S. y Pini, A. (1995) Chemorepulsion of developing motor axons by the floor plate. *Neuron*, 14, 1117-1130.
- Hatta, K. (1992) Role of the floor plate in axonal patterning in the zebrafish CNS. *Neuron* 9, 629-642.

- Herzog K. y Bartheld C. (1998). Contributions of the optic tectum and the retina as sources of brain-derived neurotrophic factor for retinal ganglion cells in the chick embryo. *J. Neurosci.* 18 (8), 1998.
- Holley, J. A. y Silver, J. (1987) Growth pattern of pioneering chick spinal cord axons. *Dev. Biol.* 123, 375-388.
- Hong K., Hinck L., Nishiyama M., Poo M., Tessier-Lavigne M. y 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.
- Höpker V., Shewan D., Tessier-Lavigne M., Poo M. y Holt C. (1999). Growth-cone attraction to netrin-1 is converted to repulsion by laminin-1. *Nature* 401, 69-73.
- Hornberger M., Dütting D., Ciossek T., Yamada T., Handwerker C., Lang S., Weth F., Huf J., WeBel R., Logan C., Tanaka H. y Drescher U. (1999). Modulation of EphA receptor function by coexpressed EphrinA ligands on retinal ganglion cell axons. *Neuron* 22, 731-742.
- Hu H. (1999). Chemorepulsion of neuronal migration by Slit2 in the developing mammalian forebrain. *Neuron* 23, 703-711.
- Hynes M. y Rosenthal A. (1999). Specification of dopaminergic and serotonergic neurons in the vertebrate CNS. *Current Opinion in Neurobiology* 9, 26-36.
- Irving C. y Mason I. (1999). Regeneration of isthmus tissue is the result of a specific and direct interaction between rhombomere 1 and midbrain. *Development* 126, 3981-3989.
- Ishii N., Wadsworth W., Stern B., Culotti J. y Hedgecock E. (1992). UNC-6, a laminin-related protein, guides cell and pioneer axon migrations in *C. elegans*. *Neuron* 9, 873-881.
- Jones B., Paré M. y Beaudet A. (1986) Retrograde labeling of neurons in the brain stem following injections of [3H]choline into the rat spinal cord. *Neuroscience* 18, 901-916.
- Kennedy, T. E., Serafini, T., de la Torre, J. R. y Tessier-Lavigne, M. (1994) Netrins are diffusible chemotropic factors for commissural axons in the embryonic spinal cord. *Cell* 78, 425-435.
- Keynes, R. y Cook, G. M. W. (1995) Axon guidance molecules. *Cell* 83, 161-169.
- Keyno-Masu K., Masu M., Hinck L., Leonardo E., Chan S., Culotti J. y Tessier-Lavigne M. (1996). Deleted in colorectal cancer (DCC) encodes a netrin receptor. *Cell* 87, 175-185.

- Kidd T., Bland K. y Goodman C. (1999). Slit is the midline repellent for the robo receptor in *Drosophila*. *Cell* 96, 785-794.
- Kikuchi K., Chédotal A., Hanafusa H., Ujimasa Y.; de Castro F., Goodman C. y Kimura T. (1999). Cloning and characterization of a novel class VI semaphorin, semaphorin Y. *Mol. Cell. Neurosci.* 13, 9-23.
- Klostermann A. Lohrum M., Adams R. y Püschel A. (1998) The chemorepulsive activity of the axonal guidance signal semaphorin D requires dimerization. *J. Biol. Chem.* 273, 7326-7331.
- Kolodkin, A. L. (1996) Growth cones and the cues that repel them. *Trends Neurosci.* 19, 507-513.
- Kolodkin, A. L. y Ginty, D. D. (1997) Steering clear of semaphorins: neuropilins sound the retreat. *Neuron* 19, 1159-1162.
- Kolodziej P., Timpe L., Mitchell K., Fried S., Goodman C., Jan L. y Jan Y. (1996). Frazzled encodes a *Drosophila* member of the DCC immunoglobulin subfamily and is required for CNS and motor axon guidance. *Cell* 87, 197-204.
- Krumlauf R., Marshall H., Studer M., Nonchev S., Sham M. y Lumsden A. (1993). Hox Homeobox genes and regionalisation of the nervous system. *J. Neurobiol.* 24, 1328-1340.
- Küry P., Gale N., Connor R., Pasquale E. y Guthrie S. (2000). Eph receptors and Ephrin expression in cranial motor neurons and the branchial arches of the chick embryo. *Mol. Cell. Neurosci.* 15, 123-140.
- Lakke E. y Marani E. (1991). Prenatal descent of rubrospinal fibers through the spinal cord of the rat. *J. Comp. Neurol.* 314, 67-78.
- Lee S., Fritsch D. y McMahon A. (1997). Evidence that *FGF8* signalling from the midbrain-hindbrain junction regulates growth and polarity in the developing midbrain. *Development* 124, 959-969.
- Lin D. y Goodman C. (1994). Ectopic and increased expression of fasciclin II alters motoneuron growth cone guidance. *Neuron* 13, 507-523.
- Lipophilic Tracers – DiI, DiO, DiD and DiA. (1996) *Molecular Probes* 0282.
- Littleton J., Bhat M. y Bellen H. (1997). Deciphering the function of neuroligins at cellular junctions. *J. Cell Biol.* 137, 793-796.
- Liu A., Losos K. y Joyner A. (1999). *FGF8* can activate *Gbx2* and transform regions of the rostral mouse brain into a hindbrain fate. *Development* 126, 4827-4838.

- Marg A., Sirim P., Spaltmann F., Plagge A., Kauselmann G., Buck F., Rathjen F. y Brummendorf T. (1999). Neuroattractin, a novel neurite outgrowth-promoting Ig-like protein that interacts with CEPU-1 and LAMP. *J. Cell Biol.* 145, 865-876.
- Martin K. y Kandel E. (1996). Cell adhesion molecules, CREB and the formation of new synaptic connections. *Neuron* 17(4), 567-570.
- Martínez S., Crossley P., Cobos I., Rubenstein J. y Martin G. (1999). *FGF8* induces formation of an ectopic isthmic organizer and isthmocerebellar development via a repressive effect on *Otx2* expresion. *Development* 126, 1189-1200.
- Marx, J. (1995) Helping neurons find their way. *Science* 268, 971-973.
- McFarlane S., McNeill L. y Holt C. (1995). *FGF* signaling and target recognition in the developing *xenopus* visual system. *Neuron* 15, 1017-1028.
- Messersmith, E. K., Leonardo, E. D., Shatz, C. J., Tessier-Lavigne, M., Goodman, C. S. y Kolodkin A. L. (1995) Semaphorin III can function as a selective chemorepellent to pattern sensory projections in the spinal cord. *Neuron* 14, 949-959.
- Monschau B., Kremoser C., Ohta K., Tanaka H., Kaneko T., Yamada T., Handwerker C., Hornberger M., Löschinger J., Pasquale E., Siever D., Verderame M., Müller B., Bonhoeffer F. y Drescher U. (1997). Shared and distinct functions of RAGS and ELF-1 in guiding retinal axons. *The EMBO J.* 16, 1258-1267.
- Nishi R. (1994). Neurotrophic factors: two are better than one. *Science* 265, 1052-1053.
- O'Connor R. y Tessier-Lavigne M. (1999). Identification of maxillary factor, a maxillary process-derived chemoattractant for developing trigeminal sensory axons. *Neuron* 24, 165-178.
- O'Leary D. y Wilkinson D. (1999). Eph receptors and ephrins in neural development. *Curr. Opin. Neurobiol.* 9, 65-73.
- Ren X., Kim S., Fox E. y Hedgecock E. (1999). Role of netrin UNC-6 in patterning the longitudinal nerves of *Caenorhabditis elegans*. *J. Neurobiol.* 39, 107-118.
- Ristoratore F., Carl M., Deschet K., Richard-Parpaillon L., Boujard D., Wittbrodt J., Chourrout D., Bourrat F. y Joly J. (1999). The midbrain-hindbrain boundary genetic cascade is activated ectopically in the diencephalon in response to the widespread expression of one of its components, the medaka gene *Ol-eng2*. *Development* 126, 3769-3779.

- Seeger M. y Beattie C. (1999). Attraction versus repulsion: modular receptors make the difference in axon guidance. *Cell* 97, 821-824.
- Shapiro L. y Colman D. (1998). Structural biology of cadherins in the nervous system. *Curr. Opin. Neurobiol.* 8, 593-599.
- Shimizu M., Murakami Y., Suto F. y Fujisawa H. (2000). Determination of cell adhesion sites of Neuropilin-1. *J. Cell Biol.* 148 (6), 1283-1293.
- Shirasaki, R., Katsumata, R. y Murakami, F. (1998) Change in chemoattractant responsiveness of developing axons at an intermediate target. *Science* 279, 105-107.
- Shirasaki R., Mirzayan C., Tessier-Lavigne M. y Murakami F. (1996). Guidance of circumferentially growing axons by netrin-dependent and independent floor plate chemotropism in the vertebrate brain. *Neuron* 17, 1079-1088.
- Simon, H., Guthrie, S. y Lumsden, A. (1994) Regulation of SC1/DM-GRASP during the migrations of motor neurons in the chick embryo brain stem. *J. Neurobiol.* 25, 1129-1143.
- Spaltmann F. y Brummendorf T. (1996). CEPU-1, a novel immunoglobulin superfamily molecule, is expressed by developing cerebellar Purkinje cells. *J. Neurosci.* 16, 1770-1779.
- Stoeckli, E. T. y Landmesser, L. T. (1995) Axonin-1, NrCAM y NgCAM play different roles in the *in vivo* guidance of chick commissural neurons. *Neuron* 14, 1165-1179.
- Struyk A., Canoll P., Rosen C., D'Eustachio P. y Salzer. (1995). Cloning of neurotrimin defines a new subfamily of differentially expressed neural cell adhesion molecules. *J. Neurosci.* 15, 2141-2156.
- Takahashi T., Fournier A., Nakamura F., Wang L., Murakami Y., Kalb R., Fujisawa H. y Strittmatter M. (1999). Plexin-Neuropilin-1 complexes form functional semaphorin-3A receptors. *Cell* 99, 59-69.
- Tamada, A., Shirasaki, R y Murakami, F. (1995) Floor plate chemoattracts crossed axons and chemorepels uncrossed axons in the vertebrate brain. *Neuron* 14, 1083-1093.
- Tamagnone L., Artigiani S., Chen H., He Z., Ming G., Song H., Chedotal A., Winberg M., Goodman C., Poo M., Tessier-Lavigne M. y Comoglio P. (1999). Plexins are a large family of receptors for transmembrane, secreted, and GPI-anchored semaphorins in vertebrates. *Cell* 99, 71-80.
- Tamura K., Shan W., Hendrickson W., Colman D. y Shapiro L. (1998). Structure-function analysis of cell adhesion by neural (N-) cadherin. *Neuron* 20, 1153-1163.

- Tannahill D., Cook G. y Keynes R. (1997). Axon guidance and somites. *Cell Tissue Res* 290, 275-283.
- Tear, G., Harris, R., Sutaria, S., Kilomanski, K., Goodman, C. S. y Seeger, M. A. (1996) Commissureless controls growth cone guidance across the CNS midline in *Drosophila* and encodes a novel membrane protein. *Neuron* 16, 501-514.
- Tessier-Lavigne, M. (1995) Eph receptor tyrosine kinases, axon repulsion, and the development of topographic maps. *Cell* 82, 345-348.
- Tessier-Lavigne, M. y Goodman, C. S. (1996) The molecular biology of axon guidance. *Science* 274, 1123-1133.
- Unified nomenclature for the semaphorins/collapsins. (1999). *Cell* 97, 551-552.
- Vactor D. y Flanagan J. (1999). The middle and the end: Slit brings guidance and branching together in axon pathway selection. *Neuron* 22, 649-652.
- Varela-Echavarría, A. y Guthrie, S. (1997) Molecules making waves in axon guidance. *Genes Dev.* 11, 545-557.
- Varela-Echavarría, A., Tucker, A., Püschel, A. W. y Guthrie, S. (1997) Motor axons subpopulations respond differentially to the chemorepellents netrin-1 and semaphorin-D. *Neuron*, 18, 193-207.
- Wahl, C., Noden D. y Baker R. (1994) Developmental relations between sixth nerve motor neurons and their targets in the chick embryo. *Dev. Dynam.* 201, 191-202.
- Wang K., Brose K., Arnott D., Kidd T., Goodman C., Henzel W. y Tessier-Lavigne M. (1999). Biochemical purification of a mammalian Slit protein as a positive regulator of sensory axon elongation and branching. *Cell* 96, 771-784.
- Wightman, B., Clark, S. G., Taskar, A. M., Forrester, W. C., Mariq, A. V., Bargmann, C. I. y Garriga, G. (1996) The *C. elegans* gene *vab-8* guides posteriorly directed axons outgrowth and cell migrations. *Development* 122, 671-682.
- Wilson D., Kim D., Marshall-Clarke S. y Moss D. (1996). A family of glycoproteins (GP55), which inhibit neurite outgrowth, are members of the Ig superfamily and are related to OBCAM, neurotrimin, LAMP and CEPU-1. *J. Cell Sci.* 109, 3129-3138.
- Wolf, F. W., Hung, M-S., Wightman, B., Way, J. y Garriga, G. (1998) *Vab-8* is a key regulator of posteriorly directed migrations in *C. elegans* and encodes a novel protein with kinesin motor similarity. *Neuron* 20, 655-666.

- Xu X., Sheldon N., Wu Z., Nguyen D., Homburger S., Seidel-Dugan C., Ebens A. y Luo Y. (1998). Human semaphorin K1 is glycosylphosphatidylinositol-linked and defines a new subfamily of viral-related semaphorins. *J. Biol. Chem.* 273, 428-434.
- Yaginuma, H. y Oppenheim, R. W. (1991) An experimental analysis of *in vivo* guidance cues used by axons of spinal interneurons in the chick embryo: evidence for chemotropism and related guidance mechanisms. *J. Neurosci.* 11, 2598-2613.
- Yaginuma H., Shiga T. y Oppenheim R. W. (1993). Mechanisms of axonal guidance used by interneurons in the chick embryo spinal cord. *Perspect. Dev. Neurobiol.* 1 (4), 205-215.
- Zhukareva V., Chernevskaya N., Pimenta A. y Nowycky M.(1997). Limbic system-associated membrane protein (LAMP) induces neurite outgrowth and intracellular Ca<sup>2+</sup> increase in primary fetal neurons. *Mol. Cell. Neurosci.* 10, 43-55.
- Zinn K. y Sun Q. (1999). Slit branches out: a secreted protein mediates both attractive and repulsive axon guidance. *Cell* 97, 1-4.

ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA

## LISTA DE TABLAS

	Páginas
<b>Tabla 1.</b> Señales involucradas en el crecimiento axonal.....	3
<b>Tabla 2.</b> Clases de Semaforinas.....	6

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Mecanismos implicados en la navegación axonal.....	4
<b>Figura 2.</b> Clases de Semaforinas.....	5
<b>Figura 3.</b> Efrinas y receptores Eph.....	11
<b>Figura 4.</b> Moléculas guía involucradas en el cruce de la línea media por los axones comisurales en <i>Drosophila</i> .....	14
<b>Figura 5.</b> Grupos de neuronas reticuloespinales, vestibuloespinales y del rafé en embriones de rata.....	17
<b>Figura 6.</b> Esquema que muestra el marcaje específico de axones con un componente longitudinal.....	24
<b>Figura 7.</b> Explante de rombencéfalo con neuronas reticuloespinales.....	25
<b>Figura 8.</b> Explante de rombencéfalo con explante de istmo.....	26
<b>Figura 9.</b> Efecto inhibitorio del istmo sobre el borde caudal de rombómera 3.....	27
<b>Figura 10.</b> Efecto inhibitorio del istmo en el crecimiento de axones de proyección caudal marcados con Dil.....	28
<b>Figura 11.</b> Micrografía en microscopio confocal.....	29
<b>Figura 12.</b> Micrografía de cultivos de explantes de rombencéfalo rostral.....	29
<b>Figura 13.</b> La acción inhibitoria del istmo no depende de la placa del piso.....	30
<b>Figura 14.</b> El efecto inhibitorio del istmo es específico para axones que proyectan caudalmente.....	31
<b>Figura 15.</b> Cocultivo de rombómera 3 más neuroepitelio cervical.....	32
<b>Figura 16.</b> El neuroepitelio cervical no incrementa el crecimiento caudal de rombómera 3.....	33
<b>Figura 17.</b> Efecto inhibitorio del istmo en el crecimiento de neuritas.....	34

## LISTA DE TABLAS

	Páginas
<b>Tabla 1.</b> Señales involucradas en el crecimiento axonal.....	3
<b>Tabla 2.</b> Clases de Semaforinas.....	6

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Mecanismos implicados en la navegación axonal.....	4
<b>Figura 2.</b> Clases de Semaforinas.....	5
<b>Figura 3.</b> Efrinas y receptores Eph.....	11
<b>Figura 4.</b> Moléculas guía involucradas en el cruce de la línea media por los axones comisurales en <i>Drosophila</i> .....	14
<b>Figura 5.</b> Grupos de neuronas reticuloespinales, vestibuloespinales y del rafé en embriones de rata.....	17
<b>Figura 6.</b> Esquema que muestra el marcaje específico de axones con un componente longitudinal.....	24
<b>Figura 7.</b> Explante de rombencéfalo con neuronas reticuloespinales.....	25
<b>Figura 8.</b> Explante de rombencéfalo con explante de istmo.....	26
<b>Figura 9.</b> Efecto inhibitorio del istmo sobre el borde caudal de rombómera 3.....	27
<b>Figura 10.</b> Efecto inhibitorio del istmo en el crecimiento de axones de proyección caudal marcados con DiI.....	28
<b>Figura 11.</b> Micrografía en microscopio confocal.....	29
<b>Figura 12.</b> Micrografía de cultivos de explantes de rombencéfalo rostral.....	29
<b>Figura 13.</b> La acción inhibitoria del istmo no depende de la placa del piso.....	30
<b>Figura 14.</b> El efecto inhibitorio del istmo es específico para axones que proyectan caudalmente.....	31
<b>Figura 15.</b> Cocultivo de rombómera 3 más neuroepitelio cervical.....	32
<b>Figura 16.</b> El neuroepitelio cervical no incrementa el crecimiento caudal de rombómera 3.....	33
<b>Figura 17.</b> Efecto inhibitorio del istmo en el crecimiento de neuritas.....	34

## **APÉNDICES**

## APÉNDICE I

	Cocultivos A	Controles A	Cocultivos B	Controles B	Cocultivos C	Controles C
	29	133	15	90	51	228
	20	117	18	125	39	175
	27	148	25	101	32	257
	25	149	24	124	38	276
	12	157	13	159	12	113
	16	128	22	151	35	142
	39	134	17	129	58	167
	32	133	36	118	23	131
	48	123	34	129	21	187
	32	97	19	135	47	140
	40	73	38	167	56	176
		86	39	131	26	142
		88	27	158	46	140
			24	168	42	234
			14	141		
			10	130		
				160		
				133		
<b>Media</b>	29	120	23.4	136	37.5	179
<b>D. E.</b>	10.7	26.6	9.2	21.5	13.6	50.8

\*t 0.05 (22)= 11.151

\*t 0.05 (32)= 19.325

\*t 0.05 (26)= 10.062

Inhibición del 75% y \* prueba t significativa al 0.05

D. E.= Desviación estándar

**Efecto inhibitorio del istmo sobre el borde caudal de rombómera 3.** Número de neuritas que crecen hacia el gel de colágena en el borde caudal de explantes de rombocéfalo rostral cocultivados junto con el istmo (Cocultivos). En comparación con los controles, el istmo causó una inhibición significativa en el crecimiento neurítico.

## APÉNDICE II

	Cocultivos	Controles
	6	45
	5	34
	5	14
	3	47
	5	29
	3	39
	3	24
	8	41
	8	37
	5	59
	4	43
		39
		13
<b>Media</b>	5	34.7
<b>D. E.</b>	1.7	13

\*t 0.05 (22)= 60.0238

Inhibición del 85% y \* prueba *t* significativa al 0.05

**Efecto inhibitorio del istmo en el crecimiento de axones de proyección caudal marcados con DiI.** El istmo causó una inhibición significativa del crecimiento en las neuritas marcadas con DiI en el borde caudal de rombómera 3. Se muestra el número de neuritas que crecieron hacia el gel de colágena en presencia del istmo (Cocultivos).

### APÉNDICE III

Cocultivos A	Controles A	Cocultivos B	Controles B	Cocultivos C	Controles C	
106	304	57	317	57	168	
125	320	102	306	58	171	
26	245	75	312	38	293	
51	219	82	311	47	273	
94	243	55	301	36	189	
82	267	79	201	30	283	
48	271	43	251	139	206	
85	241	84	254	99	190	
		57	248	56	234	
			226		344	
					344	
					283	
<b>Media</b>	77	236	70	272	62	248
<b>D. E.</b>	33	34	18.5	41.6	35	63.7

\*t 0.05 (14)=11.1139

\*t 0.05 (17)= 13.3814

\*t 0.05 (19)= 7.8704

Inhibición entre el 70 y 75% y \* prueba *t* significativa al 0.05.

**La acción inhibitoria del istmo no depende de la placa del piso.** Se muestra el número de neuritas que crecieron hacia el gel de colágena en presencia del istmo sin placa del piso (Cocultivos). En comparación con los controles el istmo sin placa del piso causó una inhibición significativa en el crecimiento de neuritas.

## APÉNDICE IV

	Cocultivos A	Controles A	Cocultivos B	Controles B
	185	167	82	110
	100	148	57	76
	161	142	56	92
	223	151	62	89
	148	191	70	94
	104	158	67	128
	193	129	86	68
	169	179	78	85
	76	156	69	82
	129	144	73	99
	205	262		
	40	236		
<b>Media</b>	144	171	70	107
<b>D. E.</b>	55	40	10	17

$t_{0.05(22)} = 1.3881$

$t_{0.05(18)} = 3.5386$

**El efecto inhibitorio del istmo es específico para axones que proyectan caudalmente.** Número de neuritas que crecen del borde rostral de explantes de rombencéfalo rostral en presencia del istmo (Cocultivos). En comparación con los controles, el istmo no causó una inhibición significativa en el crecimiento del borde rostral del explante rombencefálico.

## APÉNDICE V

	Cocultivos A	Controles A	Cocultivos B	Controles B
	205	181	118	114
	269	196	103	147
	229	247	94	158
	201	186	151	129
	267	280	193	206
	227	244	155	190
	171	273		
		185		
<b>Media</b>	224	224	135	157
<b>D.E</b>	35	41	37	35

$t_{0.05(13)} = 0.0048$

$t_{0.05(19)} = 1.0315$

**El neuroepitelio cervical no atrae el crecimiento caudal de rombómera 3.** Número de neuritas que crecen del borde caudal del explante de rombencéfalo rostral en presencia de neuroepitelio cervical (Cocultivos). En comparación con los controles, el neuroepitelio cervical no atrae el crecimiento de neuritas de proyección caudal.

## APÉNDICE VI

	Cocultivos A	Controles A	Cocultivos B	Controles B
	125	377	389	356
	155	306	317	425
	110	351	367	479
	98	399	306	441
	109	447	376	247
	69	433	351	425
	71	321	301	349
	109	348	271	333
	154	351	344	461
		419	264	347
<b>Media</b>	111	375	328	386
<b>D. E.</b>	30	47	94	71

\*t 0.05 (17)= 14.1261

t 0.05 (18)= 2.1762

Inhibición del 70% y \* prueba *t* significativa al 0.05

**Efecto inhibitorio del istmo en el crecimiento de neuritas.** Resultados del número de neuritas que crecen en el borde caudal (A) y el borde rostral (B) de explantes de rombencéfalo rostral cultivados junto con el istmo (Cocultivos). El istmo causó una inhibición significativa del crecimiento neurítico sólo en el borde caudal de los explantes rombencefálicos.