

03040

B



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA MAESTRÍA EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)

PROYECCIÓN AXONAL EN EL PROSENCÉFALO DE LA RATA EN DESARROLLO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)

PRESENTA

ITZEL RICAÑO CORNEJO

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

DIRECTOR DE TESIS: DR. ALFREDO VARELA ECHAVARRÍA

JURIQUILLA, QRO., MEX. 2002



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

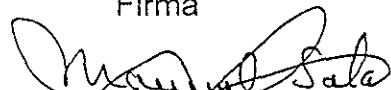
El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición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

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

Los miembros del Comité de Tesis certificamos que la tesis elaborada por la alumna **Itzel Ricaño Cornejo** titulada: "Proyección axonal en el prosencéfalo de la rata en desarrollo" y presentada como uno de los requisitos para obtener el grado del programa de Maestría en Ciencias (Neurobiología), cumple con los criterios de originalidad y calidad requeridos por la División de Estudios de Posgrado de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Firma

Presidente Dr. Manuel Salas Alvarado



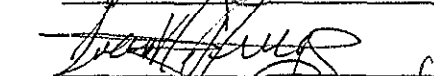
Secretario Dr. Enrique Salas Vidal



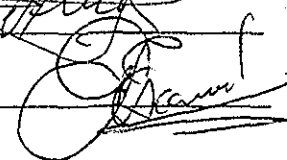
Vocal Dr. Alfredo Varela Echavarría



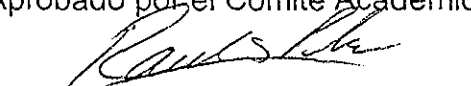
Primer suplente Dr. Juan Rafael Riesgo Escobar



Segundo suplente Dr. Gonzalo Martínez de la Escalera Lorenzo



Aprobado por el Comité Académico


Dr. Raúl Paredes Guerrero
Coordinador del programa

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Itzel Ricaño Cornejo

FECHA: 14-01-2002

FIRMA: 

RESUMEN

Para que el sistema nervioso de un organismo funcione de forma correcta, es necesario que durante su desarrollo embrionario se generen las interconexiones adecuadas entre diversos grupos neuronales; para ello los axones en crecimiento recorren grandes distancias hasta contactar a sus células blanco, formando tractos de una forma estereotípica. Establecer cuáles son los mecanismos que guían la proyección axonal ha sido un tema de gran interés en la biología del desarrollo. Actualmente se conoce que los axones en crecimiento son capaces de responder de forma específica a señales quimiotrópicas, las cuales regulan la dirección de su crecimiento. En los vertebrados uno de los primeros tractos que genera una proyección longitudinal es el tracto de la comisura postóptica (TPOC, por sus siglas en inglés). En el ratón, el núcleo neuronal del TPOC está situado en la base del tallo óptico, e inicia su proyección el día 10.5 de gestación (E10.5). En estadios posteriores proyecta por la región alar del embrión hasta el rombencéfalo en desarrollo. Poco se sabe de los mecanismos que regulan la proyección caudal de este tracto. En embriones de *Xenopus* se ha identificado que ciertas poblaciones de axones del TPOC expresan los receptores Neuropilina-1 y Deleted in Colorectal Cancer (DCC), lo que sugiere la participación de las moléculas quimiotrópicas Semaforinas y Netrinas en la regulación de la proyección de este tracto en esta especie. El objetivo de este trabajo fue identificar moléculas con efectos quimiotrópicos que se expresen en la región del prosencéfalo, y cuyo patrón de expresión sugiera una participación en la regulación de la proyección de este tracto. Mediante técnicas de hibridación *in situ* e inmunohistoquímica, se identificó que el TPOC expresa el receptor Neuropilina-1 y los receptores Robo 1 y Robo 2. Asimismo, se establecieron mapas de expresión de los ligandos reconocidos para estos receptores, las Semaforinas (Semas) y las moléculas Slit, respectivamente. Con base a los patrones de expresión observados, se propone que el sistema Neuropilina-Semaforina participa en la regulación de la proyección caudal del TPOC mediante el

receptor Neuropilina-1 y los ligandos Sema 3A y Sema 3C. De igual manera, se propone que el sistema Robo²-Slit^{4b}, participa en la regulación de la proyección este tracto, con los receptores Robo1 y Robo2 y con los ligandos Slit 1 y Slit 2. En conjunto los resultados indican que la proyección caudal del TPOC está siendo regulada por mas de un sistema quimiotrópico, lo que sugiere que existen mecanismos quimiotrópicos redundantes durante el desarrollo embrionario de la rata, para asegurar que la proyección de este tracto se lleve acabo de forma correcta.

SUMMARY

During the development of the central nervous system, different neuronal groups project to their specific targets in a stereotypic manner. Growing axons can identify and respond to different chemotropic molecules that control their direction of growth to specific targets. In the developing vertebrate brain, one of the earliest tracts to project is the tract of the post-optic commissure (TPOC), which originates in the forebrain in the base of the optic stalk. In mouse embryos, the TPOC begins its caudal projection at E10.5, and projects to the hindbrain following a pathway that courses through the alar plate. There is scant information regarding the control of the TPOC projection in mammals. Our initial hypothesis was that the caudal projection of TPOC is the consequence of axonal repulsion produced by secreted factors derived from a rostral tissue. Using immunohistochemistry and *in situ* hybridization, we determined that TPOC axons express the Semaphorin (sema) receptor Neuropilin-1 (Npn-1), and the Slit receptors Robo 1 and Robo 2. *In situ* hybridization for potential ligands for these receptors revealed that Sema 3A and Sema 3C are expressed rostral to the origin of the TPOC. Moreover, slit 1 and slit 2 are expressed in domains that lie dorsal and ventral to the tract, respectively. These results suggest that Sema 3A and 3C and Slit 1 and 2 could be involved in the regulation of the TPOC caudal projection *in vivo*.

DEDICATORIA

A Dios por su infinito amor.

A mi familia, Centli, Yandí, María y Juan Manuel por ser mis cuatro pilares, mi fuerza, por estar conmigo apoyándome siempre y sobre todo por creer en mí.

A Lázaro por su amor, comprensión y apoyo.
Gracias por todos los momentos vividos juntos.

A Erica y Liliana por su amistad.
Por todas las conversaciones, cafés, risas y llantos compartidos.

A Laura, David, Alejandra, Rosina, Lupe, Roberto, Gloria y Erick, por hacer de mi vida en Querétaro algo placentero.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar agradezco al Dr. Alfredo Varela Echavarría por la oportunidad que me brindó al abrirme las puertas de su laboratorio, por su paciencia, sus consejos y por el apoyo que me ha dado a lo largo de los dos años que ha durado esta aventura.

A todas mis compañeras y compañeros de laboratorio.....Ofelia, Adriana G, Hebert, Esperanza, Adriana M, Ana Cecilia, Teresa, Lourdes, Ada, Conchita y Eduardo por todos los momentos compartidos, los innumerables pasteles y por hacer del laboratorio un lugar de trabajo muy agradable. Muchas gracias!!!

A los miembros de mi comité tutorial el Dr. Manuel Salas, la Dra. Carmen Clapp, y la Dra. Carmen Aceves por su apoyo, consejos y críticas, durante el desarrollo de este proyecto.

A los miembros de mi jurado de examen, Dr. Juan Riesgo, Dr. Enrique Salas y el Dr. Gonzalo Martínez de la Escalera, por la revisión de mi tesis y las sugerencias para mejorarla.

A la Unidad de Enseñanza, en especial a Isabel Bolaños y a Leonor Casanova, por todo el apoyo brindado para mantener en orden mis documentos y por preocuparse siempre por nosotros los estudiantes.

Al MVZ Martín Servín y al personal de la Unidad de Bioterio, por su gran apoyo con los animales utilizados en este trabajo.

A la Unidad de Fotografía, en especial al Sr. Arturo García, por los innumerables rollos revelados.

A la M. en C. Ma. Carmen Mejía Viggiano por el apoyo técnico otorgado.

A la Biblioteca del Instituto de Neurobiología, en especial a la Lic. Pilar Galarza por hacer fácil el acceso a la información.

A la UNAM por permitirme formar parte de ella.

Al CONACyT por su apoyo económico a lo largo de estos dos años con la beca no. 159568

A la DGEP, Dirección General de Estudios de Posgrado, por el apoyo económico recibido.

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

INDICE

	página
RESUMEN	ii
SUMMARY	iii
I. INTRODUCCIÓN	2
Mecanismos generales que guían el crecimiento axonal	2
Moléculas con efectos quimiotrópicos	3
Influencia de campos eléctricos endógenos	14
Desarrollo temprano del prosencéfalo	16
Marcadores moleculares para el estudio de la proyección axonal	20
II. ANTECEDENTES	21
Control molecular de la proyección axonal longitudinal	21
El tracto de la comisura postóptica	24
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	28
IV. HIPÓTESIS	29
V. OBJETIVOS	29
VI. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	30
VII. MATERIALES Y MÉTODOS	33
VIII. RESULTADOS	48
IX. DISCUSIÓN	61
X. CONCLUSIONES	67
XI. PERSPECTIVAS	69
XII. REFERENCIAS	70
XIII. INDICE DE FIGURAS Y TABLAS	78

I. INTRODUCCIÓN

El funcionamiento del Sistema Nervioso Central (SNC) de un organismo depende de las complejas conexiones neuronales que se establecen principalmente durante el desarrollo embrionario y que permiten conectar grupos neuronales con sus respectivas células blanco. Para ello, los axones en crecimiento de macro neuronas atraviesan grandes distancias dentro del SNC y la periferia hasta llegar a sus células blanco. Aún más sorprendente es el hecho de que las proyecciones axonales muestran patrones altamente estereotípicos y directos, con muy pocos errores durante su trayectoria. Actualmente se sabe que en el establecimiento de estos patrones de proyección axonal se involucra la acción conjunta de diversas moléculas moduladoras, conservadas evolutivamente (Goodman, 1994). Asimismo, se ha identificado que los mecanismos de elongación de las proyecciones axonales se caracterizan por dos comportamientos celulares generales: la proyección lineal simple y el cambio en la orientación de la proyección axonal (cambio de dirección, identificación de células blanco y fasciculación). Es de gran importancia determinar cómo se generan los patrones de proyección neuronal, así como establecer cuáles son los factores moleculares que regulan y que llevan a cabo este proceso, con el fin de entender algunos de los mecanismos que determinan el desarrollo del SNC.

a. Mecanismos generales que guían el crecimiento axonal

Los factores que guían el crecimiento axonal son muy diversos; actúan en conjunto y en etapas precisas del desarrollo para establecer la arquitectura propia del cerebro adulto. Entre los factores más conocidos se encuentran el efecto de moléculas quimiotrópicas y la influencia de los campos eléctricos endógenos (Tessier-Lavingne y Goodman, 1996; Davies, 2000; Hotary y Robinson, 1994). Todos estos factores actúan de forma coordinada y su estudio tanto individual como en conjunto, permitirá tener una mayor comprensión de los mecanismos moleculares que dirigen la proyección axonal *in vivo*.

- **Moléculas quimiotrópicas**

El crecimiento axonal está controlado por moléculas guía involucradas en cuatro tipos generales de señalización: la quimiorrepulsión, de corto y largo alcance, y la quimioatracción, de corto y largo alcance. Entre los moduladores de corto alcance se encuentran moléculas de adhesión celular, las efrinas, las semaforinas transmembranales, las proteínas slit y las moléculas de la matriz extracelular (ECM, por sus siglas en inglés). Entre los moduladores de largo alcance están las semaforinas secretadas, las netrinas y las proteínas morfogenéticas del hueso (BMP por sus siglas en inglés) (Augsburger, Schuchardt, Hoskins, Doss y Butle, 1999; Tessier-Lavigne y Goodman, 1996). Actualmente se sabe que las señales de largo alcance controlan la dirección del crecimiento axonal, mientras que las señales de corto alcance, están involucradas en la formación de las rutas o caminos que serán seguidos por los axones en crecimiento (Varela-Echavarría y Guthrie, 1997). En la Figura 1 se presenta de forma esquemática lo que percibe a una neurona hipotética durante su proyección axonal. Tanto A como B son señales quimiodifusibles que forman un gradiente de expresión, el cual es detectado por el cono de crecimiento de la neurona. El axón crece alejándose de la señal quimiorrepelente producida por A y orienta su crecimiento respondiendo a la señal quimioatrayente de B. La señal C es de corto alcance e inhibitoria para el axón en crecimiento y la señal D constituye una ruta que permite el crecimiento axonal.

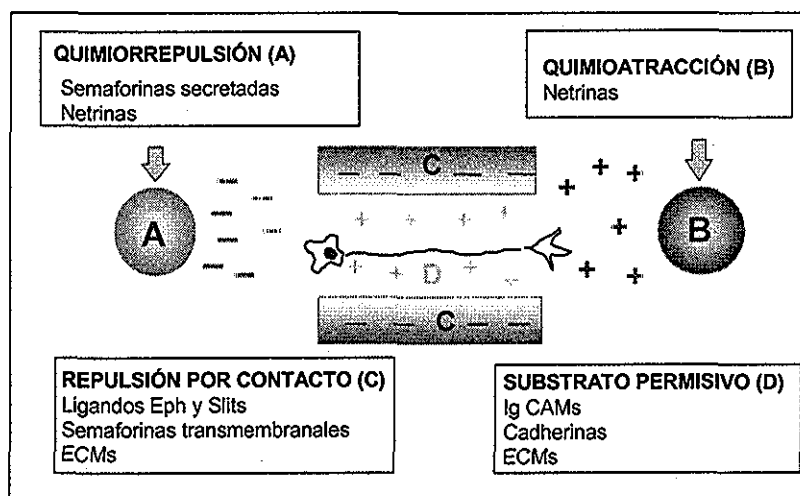


Figura 1. Mecanismos involucrados en la navegación axonal.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

La Figura 1 resume las señales de largo (A y B) y de corto (C y D) alcance, que guían a los axones hasta encontrar sus blancos. Abreviaturas Ig CAMs, dominios de inmunoglobulinas de las moléculas de adhesión celular; ECMs, moléculas de unión a la matriz extracelular; Eph, Efrinas.

A continuación se describen los principales grupos de moléculas que se ha demostrado participan en el control del crecimiento axonal durante el desarrollo del SNC.

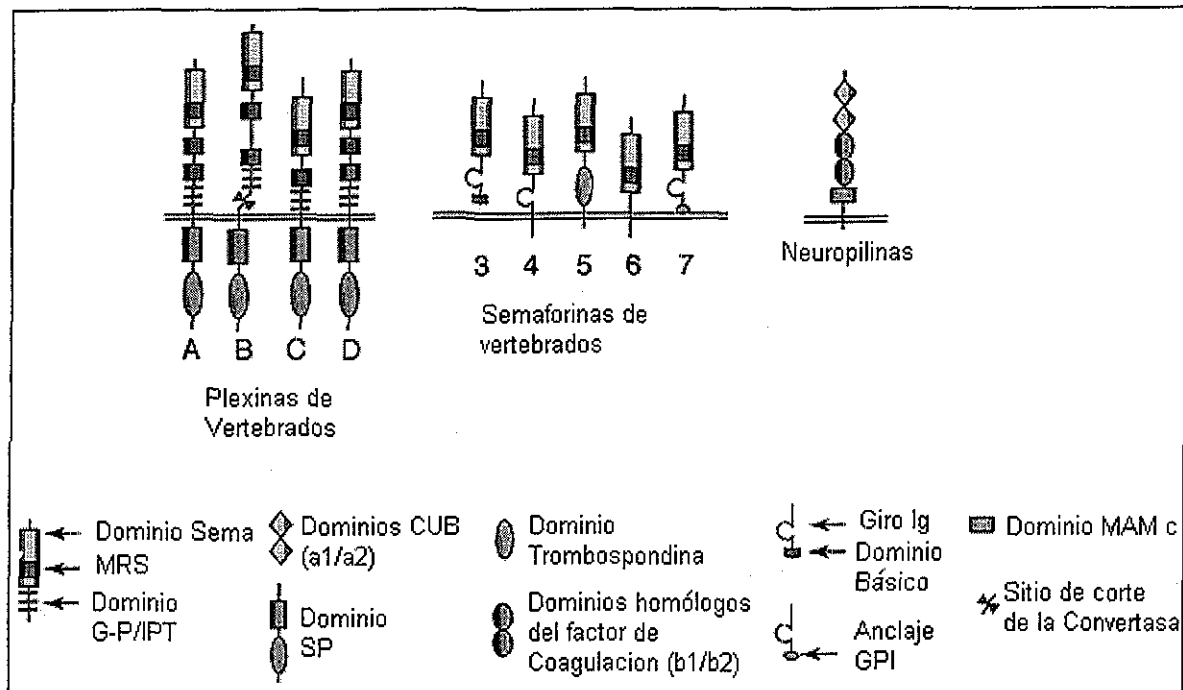
Semaforinas. Las semaforinas (Semas) son una familia de más de 20 proteínas, solubles y transmembranales, filogenéticamente conservadas que se encuentran involucradas en procesos de guía axonal tanto en invertebrados como en vertebrados (Chisholm y Tessier-Lavinge, 1999). Las semaforinas son proteínas con un promedio de 750 aminoácidos de longitud, que se caracterizan por la presencia del dominio sema (que contiene aproximadamente 500 aminoácidos y 16 cisteínas conservadas). Poseen dominios de inmunoglobulinas (Ig) localizados en su región extracelular para el caso de las moléculas transmembranales o en la región carboxilo terminal en las moléculas secretadas (Keynes y Cook, 1995). En los vertebrados las semaforinas se dividen en cinco grupos: el grupo 3 formado por las semaforinas secretadas con dominios Ig y dominios carboxilo terminales básicos (también llamadas Semaforinas clase III); el grupo 4 que abarca a las semaforinas transmembranales con dominios Ig y con un dominio citoplásmico corto; el grupo 5 de las semaforinas transmembranales sin dominios Ig, pero con siete dominios de trombospondina tipo 1 y un dominio citoplásmico corto; el grupo 6 formado por las semaforinas transmembranales sin dominios Ig y con un dominio citoplásmico corto, y el grupo 7 que agrupa a las semaforinas con dominios Ig y que se encuentran ancladas a la membrana celular mediante un GPI (glucofosfatilinositol) (Tamagnone Comoglio, 2000). En contraste, los insectos y nemátodos poseen un número menor de semaforinas, las cuales se dividen en dos grupos: el grupo 1 formado por las proteínas transmembranales y el grupo 2 formado por las secretadas (Chisholm y Tessier-Lavinge, 1999).

Existen dos tipos de receptores para las semaforinas clase III: las neuropilinas y las plexinas. Las neuropilinas, Neuropilina-1 (Npn-1) y Neuropilina-2 (Npn-2), se unen con gran afinidad a este grupo de semaforinas. La Npn-1 se une con alta afinidad a la Semaforina E (renombrada como Semaforina 3C), a la Semaforina 4, (renombrada como Semaforina 3F), y a la Semaforina 3 (renombrada como Semaforina 3A), mientras que

Npn-2 se une con alta afinidad a la Semaforina 3C, a la Semaforina 3F, pero pobremente a la Semaforina 3A (Chen, Chédotal, He, Goodman y Tessier-Lavinge, 1997). Las neuropilinas no parecen ser moléculas conservadas a lo largo de varias especies ya que no han sido encontrados homólogos en invertebrados (Chisholm y Tessier-Lavinge, 1999). Esta familia de receptores se ha visto involucrada en procesos de guía axonal. Por ejemplo, se tiene evidencia de que en ratones (*Mus musculus*) knockout para el receptor Npn-2 el desarrollo de varios nervios tanto craneales como espinales se ve alterado. En el cerebro adulto de estos ratones se observa que los nervios craneales se encuentran desorganizados, desfasiculados o no están presentes (Giger et al, 2000).

En 1998 Winberg y colaboradores mostraron evidencia bioquímica y genética que implicaba a la proteína transmembranal Plexina-A de *Drosophila melanogaster* en acciones repulsivas al interactuar con Sema-1. Este hecho permitió descubrir una nueva familia de receptores a las semaforinas, las plexinas. Las plexinas son una familia grande de proteínas transmembranales con cinco miembros en los vertebrados, dos en *D. melanogaster* y dos en *Caenorhabditis elegans* (Winberg et al, 1998). La parte extracelular de estas proteínas está formada por un dominio similar al dominio sema de las semaforinas, así como por varios dominios con homología al receptor Met tirosincinasa, las llamadas secuencias MRS (por sus siglas en ingles, Met-Related Sequences). Sus dominios citoplásmicos son de gran tamaño y están altamente conservados (Chisholm y Tessier-Lavinge, 1999), ver Figura 2.

Debido a que las neuropilinas poseen un dominio citoplásmico muy corto y a que se ha demostrado la interacción funcional entre neuropilinas y plexinas, se ha propuesto que las plexinas funcionan como co-receptores de las semaforinas clase III. Así las plexinas se unen al complejo semaforina-neuropilinas y por medio de sus dominios citoplásmicos, transducen la señal al interior de la neurona (Takahashi et al, 1999).



Netrinas. Las netrinas son una familia de moléculas difusibles involucradas en el crecimiento axonal que se han identificado tanto en invertebrados como en vertebrados (Tessier-Lavigne y Goodman, 1996). Estructuralmente se parecen a la familia de las lamininas, tienen una secuencia señal en el extremo amino terminal, un dominio globular tipo laminina VI, tres dominios del tipo de las lamininas del factor de crecimiento epidermal (EGF) y un módulo característico de las netrinas en su extremo carboxilo terminal (Tessier-Lavigne y Goodman, 1996; Yin, Sanes y Miner, 2000). Poseen un peso molecular de entre 70 y 80 kDa (Chisholm y Tessier-Lavigne, 1999). Las netrinas están involucradas tanto en procesos de quimioatracción (Braisted et al, 2000), de quimiorrepulsión (Varela-Echavarría, Tucker, Püschel y Guthrie, 1997) como en procesos que regulan la migración celular (Bloch-Gallego, Ezan, Tessier-Lavigne y Sotelo, 1999).

Las netrinas fueron identificadas como los homólogos vertebrados de la proteína UNC-6 de *C. elegans* (Serafini et al, 1994), cuyo papel como molécula guía para axones pioneros

ya había sido estudiado (Ishii, Wadsworth, Stern, Culotti y Hedgecock, 1992). Han sido identificadas en la rata (*Ratus norvergicus*), el ratón (*Mus musculus*), el pollo (*Gallus gallus*), el humano (*Homo sapiens*), en la rana (*Xenopus leavis*) (Meyerhardt et al, 1999; Tessier-Lavigne y Goodman, 1996). Recientemente se han identificado en el ratón a dos nuevos miembros de la familia de las netrinas, Netrina-3 que tiene un papel predominante en el desarrollo del sistema nervioso periférico (Wang, Copeland, Gilbert, Jenkins y Tessier-Lavigne, 1999) y Netrina-4 que se expresa de forma selectiva en la médula espinal por las células de los márgenes laterales de la placa del piso (Yin, Sanes y Miner, 2000).

La función más estudiada de las netrinas ha sido como quimioatrayente para poblaciones neuronales, dirigiendo su proyección hacia la línea media ventral del tubo neural, atrayendo axones comisurales al tiempo que repele poblaciones de axones motores (Kennedy, Serafini, de la Torre y Tessier-Lavigne 1994; Shirasaki, Mirzayan, Tessier-Lavigne y Murakami, 1996). Ratones deficientes en Netrina-1 tienen defectos en la formación de las comisuras espinales, así como defectos en el cuerpo caloso, la comisura hipocampal y la comisura anterior (Serafini, 1996). Por otro lado también se ha brindado evidencia de la participación de las netrinas en otras estructuras del SNC. Por ejemplo durante el desarrollo de la retina de embriones de *Xenopus*, los axones retinales son atraídos hacia el disco óptico por la Netrina-1. Cuando se agrega al medio laminina soluble, esta respuesta cambia por una de tipo repulsiva. En estos experimentos se encontró que la Netrina-1 media su señal mediante el aumento de los niveles intracelulares de adenosinmonofosfato cíclico (AMPc). Cuando se encuentra a la laminina en el medio, los niveles de AMPc decrecen inhibiendo la respuesta y convirtiéndola en repulsiva (Höpker, Shewan, Tessier-Lavigne, Poo y Holt 1999).

Los receptores involucrados en la actividad quimioatrayente de las netrinas son los receptores transmembranales de la familia DCC –Deleted in Colorectal Cancer- (Keino-Masu et al, 1996). Estos receptores poseen cuatro dominios de inmunoglobulinas (Ig), seis repeticiones tipo III de fibronectina (FNIII), una sola región transmembranal y una región citoplásmica que no tiene homología a ninguna proteína reportada (Livesey, 1999). Los mecanismos de quimiorrepulsión están mediados por los receptores transmembranales de

la familia de UNC-5, los cuales poseen dos dominios de inmunoglobulinas (Ig) y dos de trombospondina, Tsp (Chisholm y Tessier-Lavigne, 1999). En nemátodos es la proteína UNC-40 el receptor que media la quimioatracción debido a las netrinas y UNC-5 como el que media los mecanismos de quimiorrepulsión (Hong et al. 1999; Chan et al. 1996)). En *D. melanogaster* se ha descrito al gen *frazzled*, homólogo de DCC, el cual se requiere para que los axones comisurales crucen la línea media (Kolodziej et al. 1996).

Efrinas. Las efrinas son moléculas transmembranales que median *in vitro* el colapso del cono de crecimiento de los axones y en consecuencia la repulsión de éstos hacia la fuente de estas proteínas. Las efrinas se clasifican en dos grupos, A y B, de acuerdo a la forma en que se anclan a la membrana celular. Las efrinas tipo A se unen a la membrana celular mediante un glicosilfosfatidilinositol (GPI), mientras que las efrinas tipo B lo hacen mediante dominios proteicos transmembranales (Chisholm y Tessier-Lavigne, 1999).

Los receptores de efrinas son miembros de la superfamilia de receptores tirosincinasa, 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). Esta familia de receptores se divide en dos grandes grupos, EphA y EphB, con base a su secuencia de aminoácidos y a su especificidad por ligandos. En general los receptores EphA muestran una mayor afinidad por las efrinas de tipo A y los receptores EphB muestran mayor afinidad por las efrinas tipo B; sin embargo, algunos receptores muestran una afinidad similar para ambos tipos de efrinas (Chisholm y Tessier-Lavigne, 1999).

Las Efrinas A2 y A5 parecen estar involucradas en el establecimiento de mapas topográficos retinales en el tectum (Monschau et al., 1997). El receptor Eph A5 se encuentra involucrado en la proyección axonal del hipocampo al séptum. Los receptores Eph A3 y A4 así como ligandos de Efrinas tipo A, han sido involucrados en la proyección de subpoblaciones motoras hacia sus blancos (Küry, Gale, Connor, Pasquale y Guthrie, 2000).

Proteínas Slit. Son proteínas extracelulares de gran tamaño (aproximadamente 190 kDa), que contienen en su secuencia de aminoácidos cuatro regiones repetidas ricas en residuos de leucina y varios dominios del tipo del factor de crecimiento epidermal (EGF) (Chisholm y Tessier-Lavinge, 1999). En *D. melanogaster* y *C. elegans* se conoce solo una molécula slit, mientras que en humanos y en ratas se conocen tres moléculas (Zinn y Sun, 1999). En vertebrados las proteínas slit han mostrado ser capaces de repeler axones en cultivo y promover la arborización de los axones *in vitro* (Brose et al, 1999). En *D. melanogaster*, Slit es expresada por las células gliales de la línea media y funciona como un substrato repelente para los axones que proyectan ipsilateralmente y para los axones comisurales después que han cruzado la línea media, evitando así su recruce (Zinn y Sun, 1999).

Los receptores a las proteínas Slit son los receptores Robo. Esta familia de receptores muestra una alta conservación a través de varias especies ya que se les han encontrado en invertebrados y en vertebrados (Kidd et al, 1998). En *D. melanogaster* la expresión de estos receptores está correlacionada con la inhabilidad de los axones para cruzar la línea media; es decir los axones longitudinales, los cuales expresan *Robo*, no cruzan la línea media. En cambio los axones que si la cruzan (axones comisurales), normalmente tienen niveles de expresión de *Robo* muy bajos o nulos (Chisholm y Tessier-Lavinge, 1999). Las interacciones entre Slit y Robo están evolutivamente conservadas, ya que en experimentos recientes se ha mostrado que existe interacción entre proteínas Slit y receptores Robo de diferentes especies (Brose et al, 1999).

Se ha mostrado la expresión complementaria de Slit 1, Slit 2 y de los receptores Robo 1 y Robo 2 en el prosencéfalo de la rata. Tanto en el sistema olfatorio como en el hipocampo, los receptores Robo y las proteínas Slit se expresan a lo largo de patrones complementarios, sugiriendo la posibilidad de que las Slits pudieran actuar quimiorrepeliendo axones en el prosencéfalo. De este modo se confirma que la función de estas moléculas guía se encuentra conservada a lo largo del SN y no sólo está confinada a la médula espinal (Ba-Charvet et al, 1999).

Moléculas de la Matriz Extracelular (ECMs) y Moléculas de Adhesión Celular (CAMs).

Proteínas extracelulares como la láminina, la tenascina, la colágena, la trombospondina y la fibronectina, así como algunas moléculas de adhesión celular (N-CAMs, por ejemplo), están implicadas en dirigir axones hasta sus células blanco, actuando como substratos permisivos para la elongación de los axones (Tessier-Lavigne y Goddman, 1996). TAG-1 un miembro de la superfamilia de las inmunoglobulinas/fibronectina III (Ig/FNIII) regula la proyección de interneuronas comisurales de la espina dorsal en la rata (Dodd, Morton, Karagogeos, Yamamoto y Jessell, 1988).

Por otro lado, en el pollo, miembros de la familia de las Ig/FNIII, Ng-CAM, Nr-CAM y Axonin-1 (homólogo en pollo de TAG-1), participan también en la regulación de la proyección de interneuronas comisurales antes y después de su paso por la placa del piso (Stoeckli y Landmesser, 1995). 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). 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 el pollo, el ácido polisiálico (PSA), que es un carbohidrato que está unido covalentemente a N-CAM, se encuentra implicado en la proyección de axones motores hacia los primordios de las extremidades (Tessier-Lavigne y Goodman, 1996). Las CAMs tienen un papel importante entre las señales moleculares que guían a los axones en crecimiento ya que forman rutas de crecimiento permisivas e inhibitorias (Chiba y Keshishian, 1996).

Los receptores identificados de las ECM son las integrinas (miembros de la superfamilia de las inmunoglobulinas) y los proteoglicanos. Estos últimos han sido más bien descritos como moléculas de unión o moléculas presentadoras, más que como receptores a las señales guía (Tessier-Lavigne y Gooddman, 1996).

Como puede observarse las familias de moléculas que poseen un efecto quimiotrópico sobre la proyección axonal son diversas y se encuentran filogenéticamente conservadas, hecho que resalta su papel dentro del desarrollo embrionario de las especies. A pesar de

que se cuenta con evidencia de su función trópica y que actualmente se conocen sus estructuras moleculares, aun falta por aclarar cómo en conjunto actúan para definir la arquitectura de los tractos neuronales durante el desarrollo. En la Figura 3 se muestra un esquema de la estructura de los distintos dominios de los ligandos y receptores de las moléculas descritas hasta el momento.

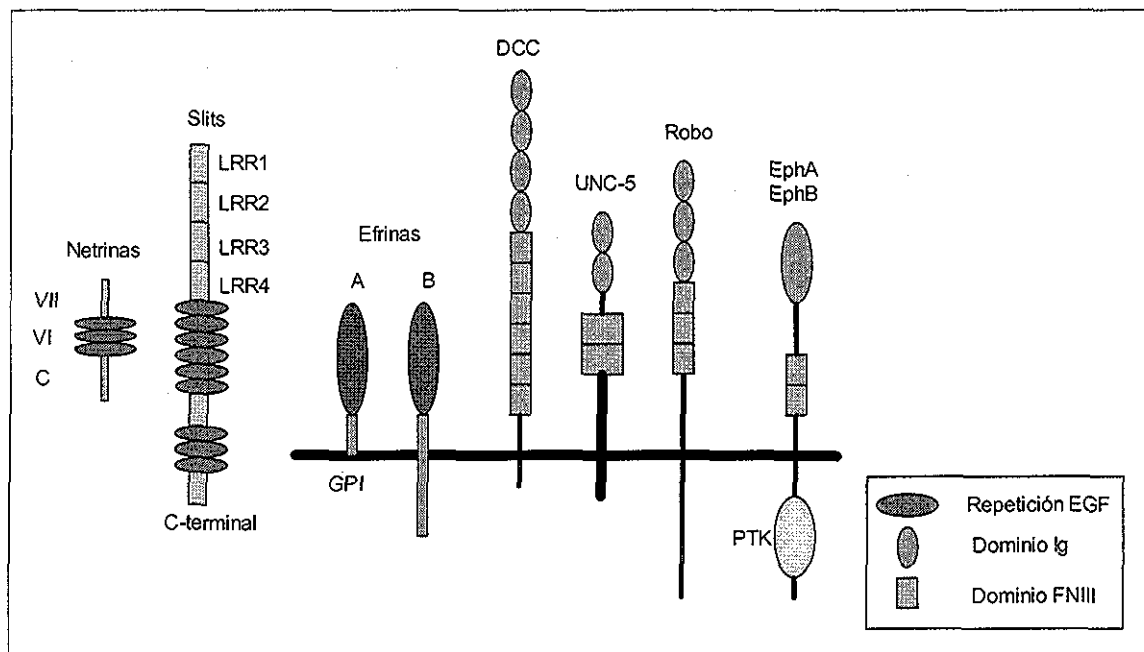


Figura 3

Estructuras de los dominios de las familias de moléculas quimiotrópicas revisadas en este trabajo. Abreviaturas PTK, proteína torosin cinasa; LRR 1 a 4, repeticiones ricas en leucina 1 a 4; Ig, dominio de inmunoglobulina; FNIII, repeticiones tipo III de fibronectina; EGF, repeticiones del factor de crecimiento epidérmico; GPI, glicosilfosfatidilinositol.

Modificado de Chisholm y Tessier-Lavigne, 1999

- **Moléculas neurotróficas.**

Los factores neurotróficos 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 y promueven mecanismos de supervivencia neural (Herzog y Bartheld, 1998). Actualmente se les ha implicado también en procesos de guía axonal. Por ejemplo en *Xenopus* se ha demostrado que los axones de neuronas

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ganglionares de la retina, expresan receptores para el factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR) y que este factor (FGF) se encuentra localizado en un patrón complementario a la proyección del tracto óptico. Asimismo, se ha comprobado su participación en la regulación de la proyección de estas neuronas hacia el tectum (McFarlane, McNeill y Holt, 1995). Estudios *in vitro* han mostrado que el factor trófico BMP-7 (Bone Morphogenetic Protein 7) funciona como una molécula quimiodifusible producida por la placa del techo de la rata (la estructura más dorsal del embrión en desarrollo) y, que mediante un mecanismo de repulsión, participa en dirigir la proyección en dirección ventral de los axones de neuronas comisurales en la médula espinal (Augsburger, Schuchardt, Hoskins, Dodd y Butler, 1999).

Dentro de las familias y subfamilias de los factores tróficos, la formada por las neurotrofinas ha sido la más estudiada y existe evidencia de que tienen una participación directa en la regulación de la proyección axonal. Las neurotrofinas son una familia compuesta por moléculas secretadas que tienen una gran influencia en el desarrollo y funcionamiento del sistema nervioso. Cuatro miembros de esta familia han sido identificados en aves y mamíferos: el factor de crecimiento nervioso (NGF), el factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF), Neurotrofina-3 (NT-3) y Neurotrofina-4 (NT-4) (Davies, 2000). Las neurotrofinas tienen influencia directa sobre la actividad sináptica participando en el refinamiento de las conexiones y regulando el tamaño de poblaciones de neuronas, sin embargo su función más conocida es la promoción del crecimiento neural (Ip Fanny, Cheung e Ip Nancy, 2001). Se ha encontrado que los factores neurotróficos NT-3 y BDNF atraen el desarrollo de axones trigeminales *in vitro*, por lo que se ha sugerido que estos factores confieren una información direccional en los estadios iniciales del desarrollo (O'Connor y Tessier-Lavigne, 1999).

La presencia local de NGF tiene influencia en la extensión de la arborización axonal terminal, en la complejidad dendrítica *in vivo* y además promueve la extensión de neuritas *in vitro* (Davies, 2000). Se ha demostrado la liberación de neurotrofinas en dendritas y axones debido a la influencia de otras neurotrofinas exógenas. Este hecho demuestra que existen mecanismos autorregulados de la secreción de estas proteínas que podrían

contribuir al reforzamiento y la estabilización de las conexiones sinápticas (Canossa et al, 1997). Los receptores a las neurotrofinas son glicoproteínas transmembranales de dos tipos: miembros de la familia de receptores Trk de los cuales hay receptores para cada una de las neurotrofinas; y el receptor $p75^{NTR}$ que es un receptor común a todas ellas (Davies, 2000).

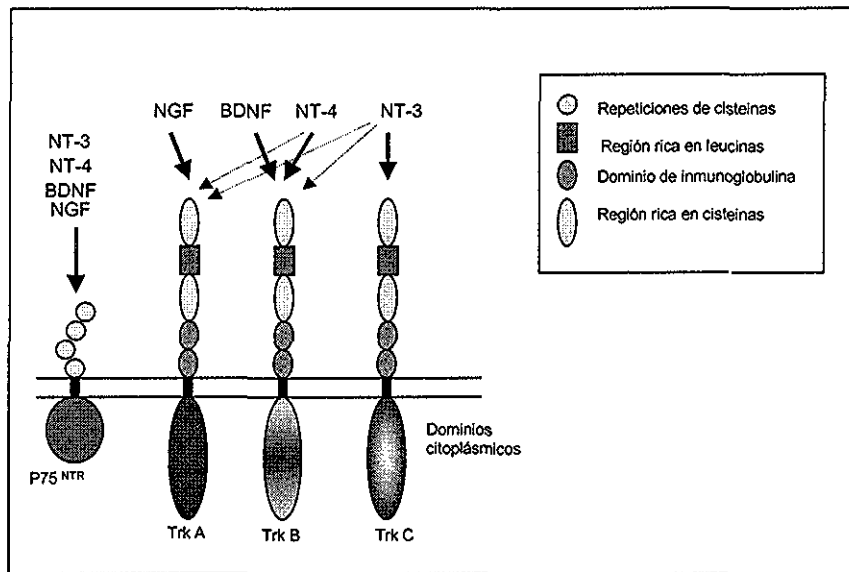


Figura 4
Estructura de los receptores de las neurotrofinas

Muchos de los mecanismos de señalización involucrados en guiar a los axones en crecimiento se encuentran conservados entre insectos, nemátodos y vertebrados, y probablemente se originaron en un metazoario ancestral común. En general los vertebrados tienen un mayor número de cada uno de los ligandos y receptores, lo que pudiera reflejar eventos de duplicación genómica en el linaje de los vertebrados. El estudio de estas familias de moléculas ha permitido concluir que el control molecular del crecimiento y proyección axonal a lo largo del desarrollo, se encuentra mediado por la combinación de varias de estas señales, las cuales presentan patrones de expresión espacio-temporal característicos, y que finalmente permiten a los axones llegar hasta sus células blanco (ver Tabla 1). Entre las preguntas aún por resolver está ¿Cómo los conos en crecimiento integran las diversas señales a las que están sujetos para dar lugar a patrones de proyección reproducibles?

Tabla 1
Moléculas con acción quimiotrópica en el SNC

Proteínas	Receptores	Principal efecto quimiotrópico
Semaforinas	Neuropilinas Plexinas	Repulsión Repulsión
Efrinas	Receptores a Efrinas, Eph	Repulsión
Netrinas	DCC Familia de UNC-5	Atracción Repulsión
Slit	Robo	Repulsión
Moléculas de la Matriz Extracelular (ECMs) y Moléculas de Adhesión Celular (CAMs).	Integrinas	Diverso
Neurotrofinas	Trk y p75 NTR	Atracción
FGF	FGFR	Atracción
BMPs	BMPR	Repulsión

- **Influencia de los campos eléctricos endógenos en el desarrollo**

Un mecanismo importante en el control de la proyección axonal es el efecto que tienen sobre el crecimiento neurítico, los campos eléctricos endógenos del embrión en desarrollo y que contribuyen de forma importante, al establecimiento de la polaridad en el cono de crecimiento. Se ha mostrado *in vitro* que las neuronas responden modificando su morfología, al estar expuestas a la influencia de campos eléctricos. Este proceso se denomina Galvanotropismo. Actualmente existe evidencia creciente de que la construcción del SN se lleva a cabo bajo la presencia de campos eléctricos endógenos, los cuales fluctúan dinámicamente en tiempo y espacio durante el desarrollo embrionario. La alteración de estos campos eléctricos en etapas tempranas del desarrollo causa alteraciones en la formación del SN y da origen a formas aberrantes de él, tales como defectos en el cierre del tubo neural, reducción del tamaño de la cabeza, formación retardada del ojo y errores en la formación de cilios funcionales (Hotary y Robinson, 1994).

El crecimiento de las neuritas bajo un campo eléctrico fisiológico externo depende de la carga eléctrica del substrato en la cual están creciendo, así como de la adhesividad de éstas al substrato. Sin embargo, se ha visto que las neuritas crecen de forma más rápida y arborizan más en dirección al cátodo que hacia el ánodo (Rajnicek, Robinson y McCaig, 1998). Estos hallazgos son consistentes con la idea de que la distribución espacio-

temporal de la expresión de moléculas de adhesión en embriones, puede interactuar con la ocurrencia de campos eléctricos endógenos para promover el crecimiento axonal en direcciones específicas (McCaig, Sangester y Stewart, 2000).

Se ha encontrado que períodos cortos de estimulación eléctrica sobre neuronas en proyección, son capaces de modificar las respuestas habituales de estas neuronas ante moléculas quimiotrópicas. *In vitro* un gradiente de Netrina-1 normalmente produce una acción repulsiva sobre la dirección del crecimiento de axones en cultivos de menos de 10 hrs. (cultivos jóvenes), y ejerce una ligera atracción en cultivos de más de 16 hrs. (cultivos maduros). Se ha encontrado que una pre-exposición de estos cultivos a una pequeña estimulación eléctrica, resulta en la conversión del efecto de repulsión a un efecto de atracción en los cultivos jóvenes, y a un aumento en la atracción en los cultivos maduros (Ming, Henley, Tessier-Lavigne, Song y Poo, 2001). En otro ejemplo, la respuesta de cultivos neuronales de *Xenopus* ante campos eléctricos exógenos, se ve aumentada por la adición de neurotrofinas al medio de cultivo. En presencia de NT-3, las neuritas muestran un crecimiento mayor y más rápido hacia el cátodo bajo la influencia de campos eléctricos exógenos de menor magnitud, que los observados en cultivos con ausencia de NT-3. Asimismo, la adición de NT-4 y de BDNF a este tipo de cultivos, baja la magnitud de los campos eléctricos exógenos que se deben aplicar, para observar un cambio significativo en la dirección de crecimiento de las neuritas (McCaig, Sangester y Stewart, 2000).

A pesar de que actualmente se tiene un mayor conocimiento de la composición del substrato en el que crecen las neuronas y de que los campos eléctricos endógenos pueden considerarse como factores que guían el crecimiento de los axones, la interacción entre estos dos sistemas es un tema aún poco explorado.

b. Desarrollo temprano del prosencéfalo

En los vertebrados el proceso de gastrulación crea un embrión con una capa interna, el endodermo; una capa intermedia, el mesodermo y una capa externa, el ectodermo. La interacción entre el mesodermo dorsal y el ectodermo situado encima de él induce a este último a formar la placa neural, estructura formada por una capa de células alargadas que comienzan a invaginarse formando el surco neural, el cual comienza a cerrarse en dirección rostro-caudal, para finalmente separarse de la superficie del ectodermo formando así el tubo neural. El mecanismo de la formación del tubo neural es similar en anfibios, reptiles, aves y mamíferos.

Después, procesos inductivos crean diferencias moleculares regionales que inician distintos programas de proliferación, migración y diferenciación en diferentes regiones del tubo neural, dando origen al establecimiento de los ejes dorso-ventral (D/V) y anterior-posterior (A/P) durante el desarrollo embrionario. En el eje A/P del tubo neural se generan tres subdivisiones transversas o vesículas importantes: el prosencéfalo, el mesencéfalo y el romboencéfalo, cada una con características morfológicas e histológicas particulares. Estas corresponderán burdamente a las estructuras adultas del cerebro anterior, del cerebro medio y del cerebro posterior, respectivamente. Divisiones subsecuentes de las vesículas producen segmentos o neurómeras a lo largo del tubo neural, ocho rombómeras (r1 a r8) en el rombencéfalo y seis prosómeras (p1 a p6) en el prosencéfalo; el mesencéfalo no sufre divisiones posteriores.

Basados en patrones de expresión genética e información embriológica, histológica y morfológica realizados en el pollo, el ratón y el pez cebra, se ha propuesto el Modelo Prosomérico para la subdivisión del prosencéfalo (Hauptmann y Gerster, 2000; Puelles, Amat y Martínez-de-la-Torre, 1987; Rubenstein, Martinez, Shimamura y Pulles, 1994). Este modelo propone que el cerebro anterior es una estructura neuromérica subdividida en un patrón de red, con dominios transversales y longitudinales. Las fronteras longitudinales segregan columnas de células con propiedades características, que son especificadas por los mecanismos del patrón D/V equivalentes a las placas del piso, basal, alar y del techo,

en la médula espinal. Las fronteras transversales están formadas por las neurómeras del prosencéfalo, las prosómeras (Rubenstein et al, 1994).

Actualmente se ha revelado la existencia de marcadores celulares y moleculares característicos de cada prosómera (Rubenstein y Shimamura, 1997). En el pez cebra se han identificado patrones de expresión para los genes *dlx-2*, *fgf-8*, *shh*, *hlx-1*, *otx2*, *pax-6.1*, *pax-2.1*, *zp-50*, *f-spondin* y *wnt-d*, en el prosencéfalo y su distribución espacial permitió la identificación de ocho dominios trasversos en el diencéfalo lo que sugiere una subdivisión neuromérica dentro del cerebro rostral. Sumado a lo anterior se ha mostrado evidencia que sugiere la presencia de fronteras transversas en el prosencéfalo caudal (o diencéfalo) del pollo en desarrollo. Se ha propuesto que la identidad de los segmentos del diencéfalo especificada por la expresión de una combinación específica de genes, es mantenida mediante restricciones policlonales en las fronteras de cada uno de estos segmentos. Esta restricción consiste en barreras físicas que evitan el paso de neuronas de un segmento a otro dentro del embrión en desarrollo (Figdor y Stern, 1993). Debido a lo anterior las prosómeras pueden considerarse unidades de desarrollo; es decir, dominios dentro de los cuales la identidad de sus células es especificada y sus axones son guiados (Figura 5).

Las teorías de la organización de la región más rostral del prosencéfalo, el telencéfalo, son más variadas. Esto debido principalmente a la relación topológica del telencéfalo con el resto del cerebro anterior. En muchos postulados morfológicos el telencéfalo es considerado el segmento más anterior del cerebro, mientras que en el modelo prosomérico se postula que esta estructura es un dominio dorsal de las prosómeras p5 y p6. Esto último es apoyado por Hauptmann y Gerster (2000), con base al patrón de expresión de ciertos genes en el pez cebra.

En la Figura 5 se aprecia los dominios de expresión de los factores de transcripción *Nkx-2.2*, *Dlx-2*, *Gbx-2*, *Otx-2*, *Shh*, *Nkx-2.1*, los cuales definen las fronteras de las neurómeras y les confieren características morfológicas diferentes a cada una.

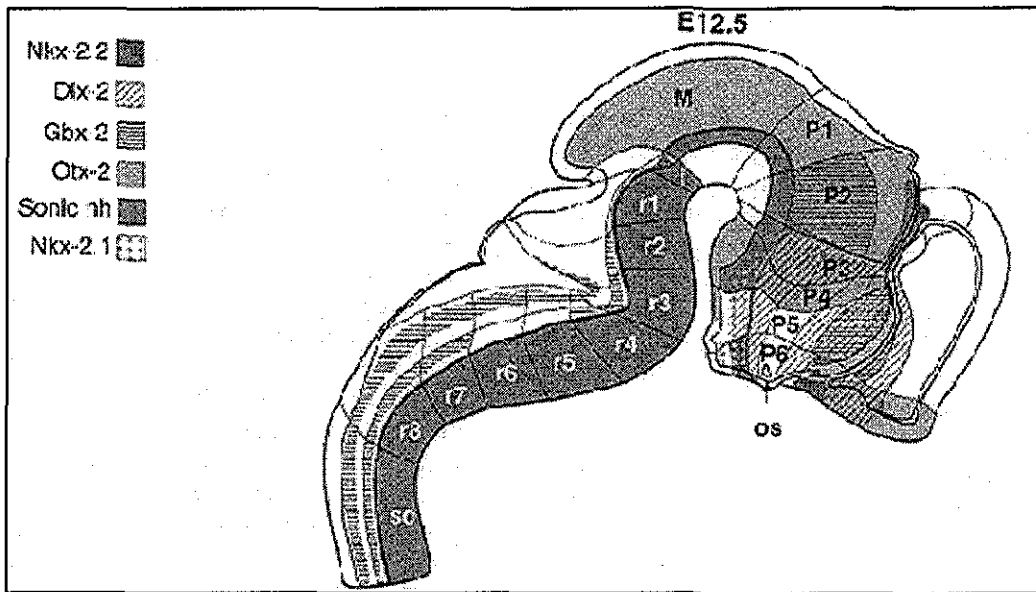


Figura 5

Modelo Prosomérico de la División del Prosencéfalo
 Patrón de expresión génica en el embrión de ratón en el estadio 12.5, E12.5
 Abreviaciones r1 a r8 rombómeros 1 a 8; p1 a p6, prosómeros 1 a 6; os, (optic stalk) tallo óptico.
 M, mesencéfalo; sc, (spinal cord) médula espinal.
 Tomado de Rubenstein et al. 1994.

A un nivel molecular se han descrito genes que inducen el desarrollo temprano del prosencéfalo. Uno de los principales factores que define el patrón de desarrollo ventral del prosencéfalo es el gen *sonic hedgehog (shh)*, el cual se expresa a lo largo del mesodermo axial incluyendo la placa precordial. Asimismo, se ha encontrado que la expresión de otros factores de transcripción se induce o reprime de forma dosis-dependiente a la concentración de *shh* a lo largo del mesodermo, lo que finalmente induce la diferenciación de distintos tipos neuronales a lo largo del eje A/P. En la diferenciación del eje D/V del tubo neural participan principalmente moléculas de la familia de BMPs, producidas por células localizadas en la frontera entre el neuroectodermo y el ectodermo no-neural. En particular dos miembros de esta familia, *Bmp4* y *Bmp7*, parecen tener un papel importante en la diferenciación del prosencéfalo dorsal, ya que no se expresan en la región anterior del ectodermo, la cual flanquea al prosencéfalo durante la gastrulación (Rubenstein y Beachy, 1998).

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

En el ratón se ha implicado la participación de *Pax-6* en la formación del diencefalo dorsal, comprobándose que es necesaria la expresión normal de este gen para la correcta regulación de los precursores de la proliferación del diencefalo, como lo son *Dlx-2* y *Wnt-3* (Warren y Price, 1997). En esta misma especie, los genes *noggin*, *Shh* y *Nkx-2.2* definen columnas longitudinales de células presentes a lo largo del eje A/P del SNC. En particular, dentro del prosencefalo la expresión de estos genes, así como de *Nkx-2.1* y *BF-1*, se localizan en regiones longitudinales específicas para cada uno, a lo largo de la placa del piso y del tubo neural (Shimamura, Hartigan, Martínez, Puelles y Rubenstein, 1995).

No obstante la evidencia experimental de la participación de dominios genéticos que inducen la formación de los ejes A/P y D/V en el prosencefalo, aún queda por definir cómo interactúan en conjunto todas estas señales para dar establecer la arquitectura característica del prosencefalo.

II. ANTECEDENTES

Los axones en crecimiento proyectan en dos direcciones principalmente: una a lo largo del eje dorso-ventral (D/V) del embrión, que corresponden a las proyecciones circunferenciales; y la otra a lo largo del eje rostro-caudal (anterior-posterior, A/P), y representan a las proyecciones longitudinales. A la fecha, aún no se han caracterizado de forma exhaustiva las regiones del neuroepitelio y las moléculas que generan el patrón A/P y D/V en el prosencéfalo. Aunque se cuenta con una caracterización de los patrones de expresión de varios genes y de las fronteras que éstos establecen durante el desarrollo embrionario, aún falta llevar a cabo una caracterización más detallada de esta región, en especial de la región más rostral, dada la mayor complejidad de su desarrollo. Este hecho hace que el estudio de los factores moleculares que guían el crecimiento longitudinal de los axones en esta zona sea más complicado y no muy bien entendido hasta ahora. Por tanto, será de gran importancia descubrir y determinar cuáles son las señales morfológicas y químicas que guían el crecimiento axonal y establecen el eje A/P de los tractos que se originan en esta área.

a. Control molecular de la proyección axonal longitudinal

El SNC de los vertebrados está compuesto por una gran variedad de tractos neuronales longitudinales que se extienden rostral y caudalmente. A pesar de que en estudios recientes se han demostrado que la quimioatracción y la quimiorrepulsión axonal juegan un papel importante en guiar a las neuronas durante su proyección circunferencial, los mecanismos de proyección axonal a lo largo del eje longitudinal, así como qué determina la polaridad rostro-caudal permanecen aun sin ser totalmente descritos. Aún no se entiende a detalle cómo subpoblaciones específicas de axones son guiadas selectivamente a través de puntos críticos para establecer los primeros tractos durante el desarrollo. Sin embargo, existe evidencia experimental que sugiere la presencia de sistemas que guían activamente a los axones a lo largo del eje longitudinal. Actualmente se sabe que muchos de los patrones organizados en el eje A/P requieren

la presencia de estructuras neuroepiteliales transversas (organizadores transversos) que tienen propiedades inductoras y son capaces de definir fronteras; el *istmo* y la *zona limitans* son ejemplos de este tipo de organizadores (Rubenstein, Martinez, Shimamura y Pulles, 1994).

Experimentos *in vitro* han definido la presencia de señales clave en el sustrato de crecimiento que guían la proyección rostral de los axones de células dopaminérgicas situadas en el mesencéfalo. En embriones de ratas (*R. norvegicus*) en el estadio 11, E11, las neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo ventral extienden sus axones dorsalmente. Para el estadio E12 inician proyecciones en el eje A/P y finalmente para el estadio E13 casi todas las neuronas proyectan rostralmente hacia sus blancos en el prosencéfalo. Cuando este grupo neuronal es cultivado en un sustrato que tiene una polaridad rostrocaudal invertida a la que normalmente tienen, se modifica su patrón de proyección y crecen siguiendo la nueva polaridad del sustrato, proyectando ahora caudalmente. Esta serie de experimentos muestra la presencia de señales locales que brindan direccionalidad y que guían a los axones a migrar a lo largo del eje longitudinal (Nakamura, Ito, Shirasaki y Murakami, 2000). Dentro de este mismo contexto, la expresión ectópica de neuronas epifisiales en el pez cebra (*B. rerio*), demostró que las señales que guían el crecimiento ventral de las neuronas se encuentran distribuidas a lo largo del eje rostrocaudal de este organismo, pero que las señales para la proyección anterior de estas neuronas están restringidas al sitio donde las neuronas epifisiales normalmente iniciarían su proyección longitudinal (Kanki y Kuwada, 2000).

Asimismo, se ha demostrado la participación de ciertos genes en el establecimiento de patrones específicos en la proyección longitudinal de grupos de axones. En el 2000 Pujol, Torregrossa, Ewbank y Brunet caracterizaron la función del gen *CePhox2/ceh-17* en *C. elegans*. Este gen se expresa en cinco neuronas rostrales (ALA y 4 SIAs), las cuales proyectan en dirección caudal a través de los tractos lateral y sublateral de este nemátodo. Mutantes de *ceh-17* muestran proyecciones anormales en el eje A/P mas allá de la región media del cuerpo, sin alterar otras características fenotípicas de este grupo de neuronas. En este mismo nemátodo se ha descrito que el gen *vab-8* dirige la

proyección caudal de conos de crecimiento. Mutantes en *vab-8* muestran alteraciones en la proyección axonal longitudinal en dirección caudal sin que se vean alterados los patrones de proyección D/V (Wightman et al, 1996).

Moléculas con efectos quimiotrópicos se han visto involucradas en el control de la proyección longitudinal de los axones. Imondi, Wideman y Kaprielian (2000), mostraron que células de ratón (*M. musculus*) localizadas a lo largo de la placa del piso expresan Efrinas de la clase B, y que los receptores a estas proteínas se expresan en los axones que proyectan longitudinal y paralelamente a esta zona. Este patrón de expresión ligando-receptor sugiere que las interacciones de tipo repulsivo que se dan entre las Efrinas clase B y sus receptores, definen la dirección de la proyección longitudinal de estos axones a lo largo de la médula espinal.

El reconocimiento de regiones neuroepiteliales así como de genes que estén involucrados en el establecimiento de los patrones de crecimiento axonal A/P, permitirá tener un mayor conocimiento de los mecanismos moleculares involucrados en estos procesos y que hasta ahora no están del todo comprendidos (Tabla 2).

Tabla 2
Ejemplos de efectos quimiotrópicos sobre la proyección logitudinal

Especie		Efecto
<i>Caenorhabditis elegans</i>	<i>CePhox2/ceh-17</i>	Mutantes de <i>ceh-17</i> muestran proyecciones anormales en el eje A/P mas allá de la región media del cuerpo
<i>Caenorhabditis elegans</i>	<i>vab-8</i>	Mutantes en <i>vab-8</i> muestran alteraciones en la proyección longitudinal de los axones
<i>Ratus norvegicus</i>	Polaridad del substrato	Dirige la proyección rostral de neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo ventral
<i>Brachydanio rerio</i>	Polaridad del substrato	La expresión ectópica de neuronas epifisiales, altera sus patrones de proyección rostral a lo largo del eje A/P
<i>Mus musculus</i>	Efrinas tipo B y sus receptores.	Interacciones repulsivas entre las Efrinas clase B y sus receptores, definen la dirección en la proyección longitudinal de ciertos axones en la medula espinal

b. El tracto de la Comisura Postóptica

El tracto de la comisura postóptica (TPOC) es un fascículo dorsal longitudinal que se origina en la base del tallo óptico y que proyecta sus axones en dirección rostro-caudal. En el ratón empieza a aparecer en el estadio E9.5 y confluye con el tracto del núcleo mesencefálico del trigémino (tmesV) en el E11.5, estableciendo un camino dorsal longitudinal que se extiende desde p6 (la prosómera más anterior) hasta el romboencéfalo (ver Figura 6) (Mastick y Easter Jr, 1996). El TPOC es también uno de los primeros tractos que se forma durante el desarrollo del prosencéfalo en otras especies. Ha sido identificado en el pez cebra y en *Xenopus* (Anderson y Key, 1999), sin embargo en cada una de estas especies el TPOC posee características diferentes. En el pez cebra algunos de los axones del TPOC entran en la lámina basal mientras que otros lo hacen en la lámina alar. En el ratón todos los axones pasan dorsalmente al fascículo longitudinal medio (mlf) y se unen con el tracto alar del tmesV (Mastick y Easter Jr, 1996). En esta misma especie, el núcleo que da origen al TPOC, el núcleo anterobasal o nTPOC, se localiza en la placa basal del prosencéfalo de forma ventral a la base del tallo óptico. Puede ser detectado en E9.5 con inmunotinciones contra anticuerpos de β -Tubulina clase III. El núcleo anterobasal produce los axones que proyectan caudalmente y originan al TPOC (Easter Jr, Ross y Frankfurter, 1993; Shimamura, Hartigan, Martínez, Puelles y Rubeinstein, 1995).

Poco se sabe sobre los mecanismos moleculares que controlan la proyección longitudinal del TPOC. En *Xenopus* se han descrito los efectos de un exceso de sulfatos de condroitina, en la proyección de los axones de una subpoblación de neuronas del TPOC, las neuronas NOC2+, denominadas así porque expresan una nueva glicofoma de las NCAMs. Cuando se adicionan sulfatos de condroitina solubles a cultivos de cerebros de embriones de *Xenopus*, los axones de las neuronas NOC2+ no siguen su trayectoria natural a través de la línea media ventral, por el contrario inician proyecciones dorsales o continúan proyectando longitudinalmente dentro del TPOC. (Anderson, Walz, Holt y Key, 1998). En un trabajo posterior, Anderson y Key (1999), demostraron la participación de esta nueva glicofoma de las NCAMs, en el

reconocimiento y fasciculación de neuronas NOC2+ del TPOC, con neuronas del Tracto Supraóptico, SOT. Neuronas NOC2+ dentro del SOT convergen selectivamente con neuronas ventrales del TPOC. La alteración de la expresión de la glicofoma en neuronas del TPOC, ya sea por el uso de anticuerpos contra NOC2 o mediante la remoción quirúrgica de los axones NOC2+ en este tracto, modifican los patrones de proyección de las neuronas NOC2+ del SOT, evitando que los axones realicen cambios en su dirección de proyección y evitando su fasciculación con el TPOC.

Asimismo, se ha observado la participación del receptor Neuropilina-1 (Npn-1) en el establecimiento de patrones específicos de crecimiento axonal. La Npn-1 es expresada selectivamente por un grupo de axones que también expresa el carbohidrato NOC2, lo cual permite marcarlas selectivamente y seguir su proyección a lo largo del desarrollo embrionario de *Xenopus*. Lo que se ha encontrado es que los niveles de Npn-1 en esta población neuronal son críticos para la determinación de la región donde estos axones alcanzan la línea media ventral. En embriones cuyas las células NOC2+ sobreexpresaron Npn-1 los axones formaron normalmente el TPOC, pero fallaron en alcanzar la línea media ventral estableciendo patrones de proyección anormales (Anderson, Jackson, Fujisawa y Key, 2000). Asimismo se ha encontrado que el receptor DCC (receptor para las Netrin) se expresa también en la población de axones NOC2+ del TPOC, tanto a lo largo de su proyección longitudinal como durante su paso por la línea media, formando la comisura ventral. La pérdida de las interacciones DCC dependientes tanto *in vitro* como *in vivo* evita que los axones NOC2+ crucen la línea media ventral en el mesencéfalo (Anderson, Cooper, Jackson, Seaman y Key, 2000).

Se han encontrado correlaciones entre dominios neuronales que expresan factores de transcripción tempranos y el establecimiento de los patrones de proyección del TPOC. Por ejemplo, el factor de transcripción *pax-6* se expresa en patrones muy específicos dentro del prosencéfalo del ratón y define la frontera entre el prosencéfalo y el mesencéfalo en esta especie. En ratones silvestres del estadio E10.5 el TPOC inicia su proyección longitudinal y contacta con un grupo neuronal que expresa *pax-6*. En ratones mutantes (homocigotos para *pax-6*) el TPOC proyecta inicialmente de forma

correcta pero realiza errores en el momento de contactar al grupo de neuronal que en el ratón silvestre si expresa *pax-6+*, pero que ahora no lo hace. Lo que sugiere que el dominio de expresión de *pax-6+* en el prosencéfalo pudiera estar mediando el reconocimiento de rutas por las cuales proyecta el TPOC. (Mastick, Davis, Andrews y Easter Jr, 1997). Asimismo, se ha descrito una correlación entre el patrón de expresión de otro factor de transcripción *Nkx-2.2* y la proyección del TPOC. En embriones de ratón de E10.5, el dominio de expresión de *Nkx-2.2* se co-localiza en la misma zona del neuroepitelio por la cual ha proyectado este tracto. Caudalmente a la *zona limitans* el TPOC se mezcla con otros tractos tanto ventral como dorsalmente, pero siempre dentro del dominio de expresión de *Nkx-2.2*. Lo que sugiere que este factor de transcripción pudiera estar mediando mecanismos que hacen de esta región del neuroepitelio, un sustrato permisivo para la elongación del TPOC. (Shimamura, Hartigan, Martínez, Puelles y Rubenstein, 1995).

Por otro lado, en el pez cebra se ha realizado un estudio extenso sobre la correlación que pudiera haber entre los patrones de expresión de varios genes y la proyección inicial de los primeros tractos en el prosencéfalo. Este estudio observó que los axones pioneros exhiben una relación espacio-temporal dinámica en relación a poblaciones de células neuroepiteliales que expresan diferentes genes reguladores. Se postula que los axones en crecimiento no son guiados por un camino continuo definido por un solo dominio de células que expresen un gen regulador específico, sino que son guiados por muchas señales clave independientes reguladas por una red compleja de genes. En el caso específico del TPOC, al inicio de su proyección cruza dominios celulares que expresan *Shh*, *Nkx2.2* y *Dlx2*; cuando los axones llegan al mesencéfalo cruzan inicialmente un dominio que expresa *pax6* y posteriormente el tracto se dirige ventralmente y deja este dominio. Debido a lo anterior los autores proponen que los axones pioneros del TPOC no crecen a lo largo de fronteras definidas por los genes analizados en este estudio, sino que existen diferencias espacio-temporales en la relación entre la trayectoria de los axones del TPOC y los dominios de expresión que atraviesa (Hjorth y Key, 2001).

Hasta el momento los estudios realizados con el fin de determinar cuáles son las moléculas o genes que regulan la proyección caudal del TPOC (Tabla 3), no nos dejan claro si la proyección de este tracto sigue algún dominio específico o si esta sujeta a la acción de una molécula en particular, aunque nos han permitido tener un panorama de lo complejo que es el sistema. Aún son necesarios más estudios con el objetivo de tener un mejor conocimiento de los factores que regulan la proyección de este tracto, para finalmente establecer cómo actúan en conjunto para guiar al TPOC hasta sus células blanco.

Tabla 3
Moléculas que pudieran estar participando en la regulación de la proyección del TPOC

Especie	Molécula	Efecto
<i>Xenopus</i>	Sulfatos de condroitina	Cuando se exponen a sulfatos de condroitina exógenos los axones NOC2+ dentro del TPOC fallan en seguir su trayectoria normal a través de la línea media ventral cruzando por la comisura ventral en el mesencéfalo
<i>Xenopus</i>	NOC2	La alteración de la expresión del carbohidrato NOC2 en neuronas del TPOC, modifica los patrones de proyección de las neuronas del SOT, que también expresan NOC2
<i>Xenopus</i>	Neuropilina-1	Los niveles de neuropilina-1 en esta población neuronal es crítica para la determinación de la región donde estos axones alcanzan la línea media ventral.
<i>Xenopus</i>	DCC	Las interacciones DCC dependientes, son importantes para que los axones NOC-2+ del TPOC crucen la línea media en el mesencéfalo, formando la comisura ventral.
<i>Mus musculus</i>	<i>Pax-6</i>	Los dominios de expresión de <i>Pax-6</i> en el prosencéfalo sugieren que este factor de transcripción pudiera estar mediando el reconocimiento de rutas por las cuales proyecta el TPOC
<i>Mus musculus</i>	<i>Nkx-2.2</i>	El dominio de expresión de <i>Nkx-2.2</i> sugiere que este factor de transcripción pudiera estar mediando mecanismos que hacen de esta región del neuroepitelio, un sustrato permisivo para la elongación del TPOC
<i>Brachydanio rerio</i>	<i>Shh, Nkx2.2, Dlx2, Pax-6.</i>	De acuerdo con los autores, que los axones pioneros del TPOC no crecen a lo largo de las fronteras definidas por los dominios de expresión de estos genes

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Debido a que los mecanismos que regulan la proyección axonal longitudinal aún no se encuentran bien descritos, es necesario identificar modelos de trabajo que nos permitan su reconocimiento y estudio. Tomando en consideración que se cuenta con una descripción detallada de la proyección longitudinal del TPOC a lo largo del desarrollo de varias especies, y que se tienen herramientas metodológicas específicas para su estudio en la rata (Figura 6); se puede afirmar que la proyección del TPOC es un modelo apropiado para estudiar los mecanismos que regulan la proyección axonal longitudinal durante el desarrollo embrionario de los vertebrados. Asimismo, los sistemas de cultivo de tejido neural en roedores se encuentran firmemente establecidos y han probado ser una herramienta poderosa para el estudio *in vitro* de la proyección axonal. Sumado a lo anterior, aún no se conocen cuáles son las moléculas que participan activamente en guiar la proyección longitudinal de este tracto, por lo que aún queda mucho que investigar al respecto. En este proyecto se estudiará la proyección inicial del TPOC en la rata, con el objetivo de identificar las regiones del neuroepitelio que participan en el control de la proyección caudal de este tracto, con el fin de contribuir a esclarecer los mecanismos generales de la proyección axonal longitudinal en los vertebrados.

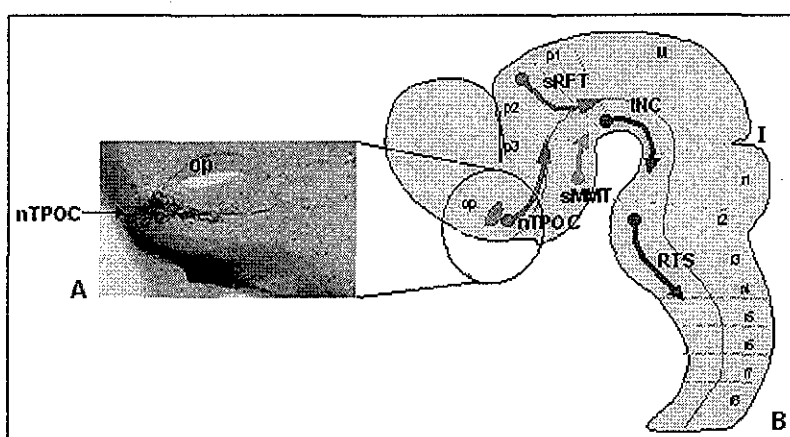


Figura 6

A) Inmunotinción con calbindina D-28K de nTPOC (E12.5 en rata)

B) Proyección longitudinal de los primeros núcleos neuronales en el desarrollo embrionario en la rata

Abreviaciones: p, prosómeras; r, rombómeros; M, mesencéfalo; op, tallo óptico; I, istmo; RTS, neuronas reticuloespinales; SMMT neuronas del tracto mamilotegmental; INC, neuronas del núcleo intersticial de Cajal.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

IV HIPÓTESIS

El neuroepitelio rostral al núcleo del Tracto de la Comisura Postóptica, secreta moléculas quimiotrópicas capaces de dirigir el crecimiento de estos axones en el sentido caudal.

V OBJETIVOS

Objetivo General

Identificar las regiones neuroepiteliales del prosencéfalo que controlan la dirección del crecimiento longitudinal del nTPOC durante el desarrollo del SNC de la rata.

Objetivos particulares:

1. Caracterizar la proyección del Tracto de la Comisura Postóptica durante el desarrollo embrionario de la rata por medio de tinción inmunohistoquímica.
2. Identificar regiones del neuroepitelio que generen moléculas quimiotrópicas capaces de controlar la proyección caudal de los axones del Tracto de la Comisura Postóptica.

IV HIPÓTESIS

El neuroepitelio rostral al núcleo del Tracto de la Comisura Postóptica, secreta moléculas quimiotrópicas capaces de dirigir el crecimiento de estos axones en el sentido caudal.

V OBJETIVOS

Objetivo General

Identificar las regiones neuroepiteliales del prosencéfalo que controlan la dirección del crecimiento longitudinal del nTPOC durante el desarrollo del SNC de la rata.

Objetivos particulares:

1. Caracterizar la proyección del Tracto de la Comisura Postóptica durante el desarrollo embrionario de la rata por medio de tinción inmunohistoquímica.
2. Identificar regiones del neuroepitelio que generen moléculas quimiotrópicas capaces de controlar la proyección caudal de los axones del Tracto de la Comisura Postóptica.

VI ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

- **Objetivo 1 Caracterización del TPOC por tinción inmunohistoquímica.**

Experimento 1. Caracterización de la proyección longitudinal del TPOC durante el desarrollo embrionario en la rata. El patrón de proyección del TPOC no está descrito en la rata, pero se sabe que en el ratón el nTPOC inicia su aparición en el estadio E9.5, en la base del tallo óptico (Easter, Ross y Frankfurter, 1993) y proyecta caudalmente hasta unirse al tmesV para formar una vía longitudinal caudal que se extiende desde la prosómera 6 hasta el romboencéfalo (Mastick y Easter, 1996). Con el objetivo de caracterizar la proyección longitudinal del TPOC durante el desarrollo embrionario en la rata, se realizaron tinciones inmunohistoquímicas con anticuerpos policlonales contra calbindina D-28K (calbindina), del estadio E11.5 al E14.5 del desarrollo embrionario de la rata. La calbindina es miembro de la familia de proteínas que unen iones Ca^{2+} (CaBP's, por sus siglas en inglés) y se ha descrito que se expresa de forma regionalizada en distintas zonas del SNC (Miyata, Khan y Hatton, 1998). En investigaciones previas hechas en el laboratorio se encontró que la calbindina tiñe de forma específica al nTPOC y al tracto, por lo que se utilizó como una herramienta para caracterizar de forma específica su proyección.

Experimento 2. Establecimiento de un cultivo *in vitro* para la caracterización del TPOC. Se implementó la técnica de cultivos en geles de colágena de explantes del neuroepitelio que contenían al nTPOC, con el propósito de establecer un sistema de cultivo *in vitro* para poder estudiar y manipular el control del crecimiento axonal de este grupo neuronal. Se ha mostrado que los geles de colágena son un substrato permisivo para el crecimiento neuronal y son útiles para el establecimiento de gradientes de moléculas quimiotrópicas (Guthrie y Lumsden, 1994). Esta técnica ha permitido obtener información sobre mecanismos de quimiorregulación durante el desarrollo de diferentes estructuras del SNC (Augsburger, Schuchardt, Hoskins, Doss y Butle, 1999; Braisted et al, 2000).

Experimento 3. Identificación de los receptores a moléculas guía del TPOC.

Tomando como base el trabajo de Anderson, Jackson, Fujisawa y Key (2000), en el cual se reporta la expresión selectiva de Npn-1 en una sub-población de neuronas del TPOC en *Xenopus*, y con el objetivo de identificar el sistema quimiotrópico que se encuentra regulando la proyección del tracto, se realizaron cultivos del nTPOC en geles de colágena. Estos cultivos fueron teñidos mediante inmunohistoquímica contra npn-1 y npn-2, obteniendo una tinción positiva sólo con el primer anticuerpo.

- **Objetivo 2. Identificación de regiones del neuroepitelio que regulan la proyección del TPOC.**

Experimento 4. Co-cultivos en geles de colágena del nTPOC y de la zona

retroquiasmática. Algunas de las estructuras que se organizan a lo largo del eje A/P requieren de la presencia de organizadores transversos, los cuales tienen propiedades inductoras importantes. Como se mencionó anteriormente, el istmo y la zona *limitants* son organizadores de este tipo (Rubenstein, Martinez, Shimamura y Pulles, 1994). Si los organizadores transversos generan moléculas que son atrayentes se observará un aumento en el número de neuritas de un núcleo particular, que crezcan en dirección al tejido quimioatrayente. Por el contrario, si estos tejidos generan moléculas que son repelentes, se observará una inhibición en el crecimiento neurítico del núcleo y la deflexión de los axones alejándose del tejido quimiorrepelente.

Con el objetivo de establecer si la región neuroepitelial más rostral al nTPOC (zona retroquiasmática) tiene un efecto quimorreplente en la proyección caudal de este tracto, se realizaron co-cultivos de explantes del nTPOC y la zona retroquiasmática. Al caracterizar los co-cultivos se pudo observar que existe una alta migración celular en ellos, lo que hace imposible determinar si el efecto de quimiorrepulsión que se está buscando, se deba a una propiedad intrínseca de la zona retroquiasmática o a una barrera física producida por las células en migración.

Experimento 5. Identificación de regiones del neuroepitelio reguladoras del crecimiento del nTPOC.

Otra forma de abordar el problema de identificar las regiones neuroepiteliales que participan en la regulación de la proyección del TPOC, consiste en hacer mapas de expresión de moléculas quimiotrópicas en el prosencéfalo. Este tipo de mapas proporcionan información importante que nos permiten establecer en donde se encuentran localizadas estas moléculas, para poder evaluar posteriormente su papel quimiotrópico en la proyección caudal del tracto. Para ello, se realizaron hibridaciones *in situ* de las moléculas quimiotrópicas que en la literatura han mostrado tener una participación en la regulación de la proyección de tractos neuronales en el prosencéfalo.

Se inició estableciendo el patrón de expresión de las Semaforinas 3A, 3B, 3C y 3E, que son las moléculas ligando para Npn-1 (Campbell et al, 2001; Varela-Echavarría, Tucker, Püschel y Guthrie, 1997; Nakamura, Tanaka, Takahashi, Kalb y Strittmatter, 1998). Asimismo, se realizaron hibridaciones *in situ* de las de las moléculas Slit y sus receptores Robo, ya que es un sistema quimiotrópico que participa en el control de la proyección de tractos neuronales en el prosencéfalo (Ba-Charvet et al, 1999; Erskine et al, 2000; Ringstedt et al, 2000). Al describir el mapa de expresión de ambas familias quimiotrópicas, se podrá identificar cuáles de ellas muestran patrones que sugieren una participación en la regulación de la proyección caudal del TPOC. Esta información nos permitirá en experimentos posteriores, evaluar funcionalmente a las moléculas identificadas.

VII. MATERIAL Y MÉTODOS

A continuación se muestra los materiales y métodos que se utilizaron para la realización del presente estudio.

- **Animales**

Se utilizaron ratas (*Ratus norvergicus*) gestantes de la cepa Wistar de 11.5, 12.5 13.5 y 14.5 días de gestación, E11.5, E12.5, E13.5 y E14.5 respectivamente. Para obtener los explantes se utilizaron ratas hembras gestantes de E12.5, dado que en este estadio los axones del nTPOC comienzan su proyección caudal (Easter Jr, Ross y Frankfuter, 1993). La preñez de la rata se identificó por la presencia del tapón vaginal. Este punto se toma como el estadio E0.5 de gestación que equivale a 12 horas *post coito*. Las ratas fueron sacrificadas mediante dislocación cervical e inmediatamente se realizaron incisiones abdominales para extraer todos los embriones y colocarlos en solución Ringer para mantener el tejido vivo. Las ratas fueron sacrificadas por dislocación cervical ya que los métodos químicos comúnmente utilizados para sacrificar animales de experimentación, tales como la sobredosis de anestesia y la inhalación de CO₂, alteran la integridad de los embriones debido principalmente a que éstos pueden recibir trazas de los compuestos anteriormente señalados, introduciendo una fuente de variación entre los embriones. Es importante aclarar que la eutanasia de animales por dislocación cervical está aprobada por la norma sobre especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio, NOM-062-ZOO-1999, que se encuentra dentro del Catálogo de normas oficiales mexicanas (SECOFI, 1999).

- **Métodos**

Disección de embriones para inmunohistoquímica. Se utilizaron embriones en los estadios E12.5, E13.5 y E14.5, a los cuales se les realizó una disección para dejarlos libres de tejido no neural y poder trabajar así con el tubo neural limpio. Los embriones se fijaron en PFA (SIGMA, P-6148) al 3.5 %, por al menos dos horas a 37 °C, o bien se fijaron toda la noche a 4°C.

Disección para cultivos. Se utilizaron ratas en el estadio E12.5. Después de ser liberados de la bolsa amniótica, los embriones se colocaron en Ringer (ver soluciones) durante todo el proceso de disección, el cual se lleva a cabo en frío. Al finalizar la disección se obtiene el tubo neural libre de tejido no neural. Posteriormente, se cortó la zona del neuroepitelio a cultivar teniendo cuidado de que los cortes fueran de un solo trazo. La zona del prosencéfalo que se cultivó se muestra en la Figura 7.

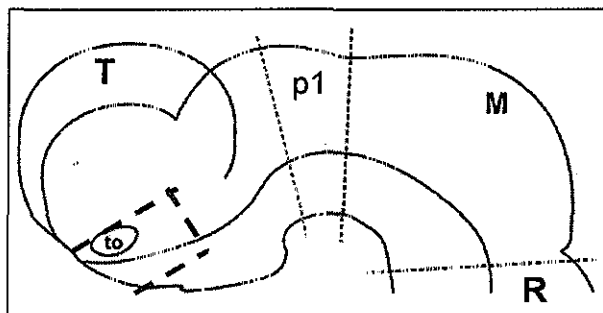


Figura 7

El recuadro muestra el corte del neuroepitelio utilizado para realizar cultivos en geles de colágena
Abreviaturas: T, telencéfalo; p1, prosómera 1; M, mesencéfalo; R, rombencéfalo; to, tallo óptico

Sistema de cultivo en geles de colágena (tomado de Guthrie y Lumsden, 1994). En este trabajo se utilizaron cultivos en geles de colágena. Ésta es una matriz semisólida que proporciona un substrato permisivo para el crecimiento axonal y la formación de gradientes de moléculas difusibles con propiedades quimiotrópicas (Guthrie y Lumsden, 1994). Una vez obtenidos los explantes que contenían al nTPOC, se montaron cada uno en un gel de colágena y se mantuvieron en cultivo por 48 horas en la incubadora a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5%.

Para la extracción de colágena de rata se utilizaron colas congeladas a -20°C. Se descongelaron a temperatura ambiente y se esterilizaron en etanol al 70% por 10 minutos y se 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 (JT Baker, 9000-03) al 70% por 15 minutos. Después se recolectaron en un tubo quitándoles el etanol usado y añadiendo ácido acético (JT Baker, 9507-02) al 0.1%, se dejaron agitando lentamente por un día

completo. Al día siguiente se diluyeron con un poco de H₂O desionizada (aproximadamente 300 ml) y se centrifugaron por 30 minutos a 12000 rpm. Por último se recolectó el sobrenadante y se almacenó a 4°C.

La mezcla del gel de colágena se preparó con 300 µL de D-MEM (Gibco BRL, 1918), 100 µL de colágena, 10 µL de NaCl (JT Baker, 3624-05) 1.537 M y 10 µL de bicarbonato de sodio (JT Baker, 3506-01) al 7.5%. La mezcla se mantuvo en hielo hasta el momento de ser usada.

Durante los ensayos se utilizaron cajas de cultivo de cuatro pozos (Nunc). En un ensayo típico, se colocaron 30 µL del gel de colágena en cada pozo esparciéndose hasta formar un disco de aproximadamente 6 mm de diámetro, el cual se dejó solidificar por un mínimo de 20 minutos dentro de la incubadora a 37°C. Al término de este tiempo las cajas se encuentran listas para montar el cultivo. Para ello los explantes recortados que se encuentran en la solución Ringer se tomaron con una micropipeta, se colocaron sobre el gel de colágena y se les extrajo el exceso de líquido. Posteriormente, se colocaron 30 µL de la mezcla de colágena sobre los explantes, se esparció de forma uniforme sobre la superficie del gel que se había colocado al inicio, cubriendo de forma completa a los explantes y teniendo cuidado que el neuroepitelio quedara entre ambas capas de gel. Por último se dejó solidificar la segunda capa de gel, por un mínimo de 20, minutos en la incubadora a 37°C. Transcurrido ese tiempo se colocaron 200 µL de medio de cultivo Opti-Mix (ver soluciones) en cada pozo y se incubaron por 48 horas a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5%.

Al terminar el tiempo de cultivo, los explantes se fijaron con PFA al 3.5% dentro de las cajas de cultivo de 4 pozos. El crecimiento de neuritas fue evaluado utilizando la técnica de tinción por inmunohistoquímica utilizando anticuerpos contra calbindina D-28 K (Chemicon, AB1778), los cuales reconocen de forma específica a las neuronas y neuritas del TPOC, como se ha mencionado anteriormente.

Técnica de tinción por inmunohistoquímica para embriones y cultivos de explantes (Tomado de Guthrie y Lumsden,1992). Las muestras (embriones o cultivos) se lavaron durante 24 hrs. en PBS (ver soluciones) / Tritón X-100 (JT Baker, x198-07) al 1% a 4°C, con un mínimo de cuatro cambios, para quitar los residuos de PFA al 3.5 %. Después se cambia la solución de lavado por PBS/ Tritón X-100 1%/ H₂O₂ al 0.1% (JT Baker,2186-01) y se deja en esta solución durante dos horas a temperatura ambiente. Al finalizar este tiempo se lava con PBS/ Tritón X-100 1% por una hora. Posteriormente se preincuba en la solución PBS /Tritón X-100 1%/ suero de cabra (Gibco BRL, 2481) al 10%, durante tres hrs. a temperatura ambiente. Al finalizar la preincubación se coloca el anticuerpo primario diluido 1:1000 durante 72 hrs. a 4°C, en PBS / Tritón X-100 1% / suero de cabra 10 %. Los anticuerpos primarios que se utilizaron fueron: anticuerpos policlonales anti calbindina (Chemicon, AB1778) y anticuerpos policlonales anti Neuropilina-1 (Santa Cruz Biotechnology, sc5541).

Al finalizar la incubación con el anticuerpo primario se lavan los embriones con PBS / Tritón X-100 1% durante 24 hrs. a 4°C, con un mínimo de cuatro cambios. Posteriormente se incuba con el anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa (Jakson Inmuno Research, 111-036-003), diluido 1:1000 durante 48 hrs. a 4°C en PBS / Tritón X-100 1% / suero de cabra 10%. Al finalizar la incubación con el anticuerpo secundario, se lavan los embriones o cultivos con PBS /Tritón 1% durante 24 hrs. a 4°C, con un mínimo de cuatro cambios. La inmunotinción se revela con 3,3' Diaminobencidina , DAB, (Sigma, D5905) bajo el siguiente procedimiento:

1. Se disuelve una tableta de DAB de 20 mgr., en 20 ml de Tris 0.1 M, a pH 7.2, y se centrifuga para eliminar la pastilla que se forma.
2. Se incuba en esta solución de DAB los embriones o los cultivos durante 2 hrs. a temperatura ambiente en la oscuridad.
3. Se añade 6 µl de H₂O₂ al 30 % por cada 10 ml de solución de DAB que se agregó a los embriones o a los cultivos.
4. Se incuba con esta solución hasta alcanzar el contraste y color deseado (aproximadamente 30 min.).

Los cultivos de explantes fueron colocados en portaobjetos para su observación bajo el microscopio. Para ello se colocaron de cuatro a seis cultivos en un portaobjeto, eliminando el exceso de líquido. Después se colocó glicerol (Mallinckrodt, 5092) entre los cultivos para evitar que se sequen. Posteriormente, se coloca el cubre-objetos y se sella para evitar la salida del glicerol.

Hibridación *in situ* (Tomado de Püschel, Adams y Betz, 1995). Las muestras de DNA (sondas) para las hibridaciones *in situ* realizadas fueron obtenidas gracias a la colaboración que se cuenta con el laboratorio del Dr. Marc Tessier-Lavigne del Departamento de Anatomía, Howard Hughes Medical Institute (HHMI) y del Departamento de Bioquímica y Biofísica, Universidad de California, San Francisco.

➤ Transformación de las bacterias

Se colocaron 5 μ L de cada muestra de DNA de ligación (Vector) en 50 μ L de células competentes (*E. Coli*) en baño de hielo durante 30 minutos y se dejaron incubando durante 3 minutos a 37°C. Posteriormente se añadieron 500 μ L de medio LB (3002-021, BIO101) bajo condiciones estériles a cada muestra y se dejaron incubando durante 30 minutos a 37°C. Después del tiempo de incubación se centrifugaron a 12,000 rpm durante 1 minuto. Finalmente se sembraron las mezclas en cajas de petri con medio LB con ampicilina (Roche, 835 242), previamente cubiertas con perlas de vidrio estériles (aproximadamente de 6 a 10 perlas). Se dejaron incubando las muestras a 37°C durante no más de 20 horas. Se debe recalcar que todo se maneja en condiciones estériles.

➤ Mini-preparación (miniprep) para la obtención de plásmidos

Las soluciones de este método se encuentran descritas de forma detallada en la sección de soluciones. Se seleccionaron dos colonias de cada caja de petri cultivada y se inocularon con ellas dos tubos de ensaye con 3 mL de medio LB / ampicilina 2% c/u. Se dejaron incubando en agitación a 37 °C durante toda la noche (no más de 20 horas).

Después del tiempo de incubación se cosecharon 1.5 ml de las bacterias. Se centrifugaron por 2 minutos a 13,500 rpm desechando el sobrenadante obtenido. Los 1.5 ml restantes de bacterias se congelaron para su uso posterior. Al sobrenadante obtenido, se le agregaron 100 μ l de la solución I, agitando hasta resuspender la pastilla. Posteriormente, se agregaron 200 μ l de la solución II, mezclando por inversión de diez a quince veces. Es importante señalar que la solución II debe ser preparada en el momento. A la mezcla se le agregaron 150 μ L de la solución III, agitando hasta resuspender. Se centrifugaron durante seis minutos a 13,500 rpm. Entonces se recupera el sobrenadante, no importando perder un poco de líquido con tal de que éste salga limpio, sin contaminación por la materia que sedimenta después de la centrifugación.

Posteriormente se añade un volumen de la solución de Fenol-Cloroformo 1:1 (Gibco BRL, 15513-039 y JT Baker, 9180-02, respectivamente) (la mezcla de Fenol-Cloroformo se realiza en el momento) al volumen total recuperado, se agita y se centrifuga durante un minuto a 13,500 rpm. Se recupera la fase superior (se debe tener cuidado de no llevarse la proteína que se encuentra en la interfase) colocándola en otro tubo eppendorf. Después se precipita el DNA añadiendo dos volúmenes de etanol al 100%, agitando y dejándolo reposar durante diez minutos a temperatura ambiente. Se centrifuga diez minutos a 13,500 rpm y se decanta. La pastilla se lava con etanol al 70%, haciendo inversiones y centrifugando durante cuatro minutos a 13,500 rpm. La pastilla se lava nuevamente con etanol a 100%, mediante inversiones y posteriormente se centrifuga durante cuatro minutos a 13,500 rpm. El líquido se decanta y la muestra se deja secar al aire. Finalmente, se resuspende la pastilla en 20 μ L de agua destilada libre de RNasas, incubándole durante treinta minutos a 37 °C. El DNA obtenido se almacena a una temperatura de - 20°C.

➤ Geles de agarosa al 1%:

Para la visualización de las muestras de DNA obtenidas se utilizaron geles de agarosa al 1% disueltos en TBE (ver soluciones). Los geles se dejaron correr por

buffer de reacción (al 10 % del volumen total), 1 μ gr de DNA (1 a 5 μ L de acuerdo a la concentración final obtenida), finalmente se ajusta el volumen final a 30 μ L con agua libre de RNAasas. Para linearizar el DNA de los vectores se utilizaron las enzimas de restricción que se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4
Enzimas de restricción utilizadas para la linearización del DNA

Sonda	Enzima	Marca
Slit 1	Pst 1	Roche
Slit 2	Xho1	GibcoBRL
Slit 3	EcoR1	Roche
sema 3A	EcoR1	Roche
sema 3B	EcoR1	Roche
sema 3C	EcoR1	Roche
sema 3E	Sal 1	Roche
robo1	EcoR1	Roche
robo2	Not 1	Roche

La mezcla de reacción se deja incubando durante 2 horas a 37 °C, y después del tiempo indicado la reacción se detiene en frío. El DNA linearizado se puede almacenar a -20 °C. Los fragmentos de DNA linearizados se visualizaron en geles de agarosa al 1%.

➤ Purificación del DNA mediante la Técnica de Fenol-Cloroformo

El DNA cortado se purifica añadiendo un volumen (similar al volumen de DNA linearizado que se obtuvo) de una solución de Fenol-Cloroformo 1:1 v/v, y agitando por inversión 3 veces en un tubo eppendorff. La mezcla se centrifuga por 10 minutos a 12,000 rpm. Después se retira con cuidado la fase acuosa que contiene el DNA (fase superior), evitando la contaminación de la solución con la fase inferior. Se le agregaron dos volúmenes de etanol al 100 % frío y 1/10 (del volumen obtenido después de la extracción con cloroformo y fenol) de Acetato de Sodio (JT Baker, 3470-01) 3M. Se agitaron los tubos y se colocaron a -20°C durante 30 minutos. Después del tiempo de

incubación se centrifugaron por 10 minutos a 12,000 rpm, y se drena el sobrenadante teniendo cuidado de no desprender la pastilla de DNA que se ha formado.

La pastilla de DNA se lava resuspendiéndola en 300 a 500 μL de etanol al 70 % (diluido en agua libre de RNAsas), y se centrifuga por 10 minutos a 12,000 rpm. Se drena el sobrenadante. Posteriormente, se agregan 200 μL de etanol al 100 %, se centrifuga nuevamente durante 10 minutos a 12,000 rpm. Se drena el sobrenadante. Finalmente, sin desprender la pastilla, se deja secar a 37°C y se resuspende en 20 μL de agua libre de RNAsas.

➤ Obtención de la sonda de RNA

Todo el material que se utilizó para RNA se limpió con etanol puro. Se utilizaron guantes durante todo el proceso y puntas con filtro en las pipetas. Se colocó en un tubo eppendorf de 500 μL la siguiente mezcla:

1 μgr de DNA linearizado y purificado	1 a 5 μL
10 % del volumen de reacción de la solución de nucleótidos marcados con DIG 10 X (Roche, no. cat. 1277073)	2 μL
Inhibidores de RNAsas (Roche, no. cat. 799025)	1 μL
La T7 o T3 RNA Polimerasa (GibcoBRL, no. cat. 18033-019)	2 μL
10 % del volumen de reacción del buffer de transcripción 10 X (Roche, no. cat. 1465384)	2 μL
Agua libre de RNAsas	12 a 8 μL

La mezcla de todos los componentes se dejó incubar a 37°C durante dos horas. Al terminar el tiempo se añadieron 2 μL de DNAsa I (Roche, 776785) y se dejó a 37°C durante 15 minutos. Finalmente, se agregaron 80 μL de agua libre de RNAsas y se mezcló por inversión. Para purificar la sonda se utilizaron Columnas Quick Spin G-50 Sephadex marca Roche (cat. 1274 015), bajo el procedimiento siguiente:

1. La columna se agita por inversión.
2. Se deja drenar por aproximadamente 10 minutos por efecto de la gravedad.
3. Se centrifuga la columna para secarla a 2,200 rpm por 2 minutos.
4. Se coloca la muestra de RNA (100 μ L) en el centro de la columna. Se coloca debajo de la columna el tubo recolector.
5. Se centrifuga a 2,200 rpm durante 2 minutos.
6. El líquido obtenido en el tubo recolector contiene la sonda de RNA, la cual se almacena a -20 °C.

➤ Procedimiento seguido para la Hibridación *in situ*

Hibridación. Se fijaron los embriones de rata o ratón con PFA al 3.5 % durante al menos 2 horas a temperatura ambiente o se dejaron fijando toda la noche a 4 °C. Se disectaron los embriones en PBS, removiendo lo más posible todas las membranas que recubren el tubo neural. Se realizaron dos lavados con PBT durante 10 minutos cada uno. Después se lavaron con metanol (JT Baker, 9093-03) al 50 % (diluido en PBT) durante 10 minutos. Posteriormente, se realizaron dos lavados con metanol al 100% durante 10 minutos cada uno (en este paso se pueden almacenar a -20 °C menos de de metanol /PBT al 66%, 50 % y 33% consecutivamente. Los embriones se colocaron en 2 mL de cada una de estas soluciones y se dejaron sedimentar antes de cambiar de solución. Se realizaron dos lavados con PBT de 10 minutos cada uno. Después se les agregó la Proteínasa K (Roche, 1413783) a una concentración final de 10 μ gr/ μ L en PBT y se le dejó actuar durante 20 minutos, después del tiempo se removió la Proteínasa K.

Se postfijaron los embriones durante 20 minutos en PFA al 3.5% con Glutaraldehído (GTH, Electrón microscopi science, 16310) al 0.1% en PBT, para que finalmente queden 10 mL de PFA al 3.5%, 40 μ L de GTH al 25% y 100 μ L Tween 20 (JT Baker, X251-07) al 10%. Se realizaron dos lavados de 10 minutos con PBT. Posteriormente se lavaron con una solución 1:1 de PBT:mezcla de hibridación durante 10 minutos, para después se lavarlos con la mezcla de hibridación sola hasta que los embriones

sedimenten (aproximadamente 10 minutos). Posteriormente, se reemplaza la solución anterior con 1mL de la Mezcla de hibridación fresca y se incuba más de 1 hora a 70°C. La incubación se realizó en una cámara húmeda para evitar la evaporación de las soluciones, la cual contiene una solución de formamida al 50 % en agua destilada. Finalmente, se añade 1mL más de la mezcla de hibridación precalentada el cual contiene la SONDA (el mRNA antisentido) en un volumen tal que la solución de la sonda sea 1/20 parte de la reacción de hibridación (8 µL de la sonda para 2 mL de volumen final). Se deja incubar en la cámara húmeda a 70°C por 3 días.

Post-hibridación, lavados y anticuerpo: Se realizan dos lavados con la mezcla de hibridación a 70°C durante 10 minutos. Posteriormente, se realizan tres lavados de 1 hora c/u con la mezcla de hibridación a 70°C. Después se lavan los embriones durante 10 minutos con una solución 1:1 de la Mezcla de hibridación y TBST (ver soluciones) a 70°C. Luego se realizan dos lavados de 10 minutos cada uno y luego dos de 15 minutos cada uno con TBST. Se bloquean los embriones con una solución de TBST / suero de cabra inactivado al 10 % (el suero de cabra se inactiva calentándolo a 55-60 °C durante 30 minutos). El anticuerpo anti-DIG (Roche, 1093274) se agrega después de preabsorberlo mediante el siguiente procedimiento:

- a) Se descongela la suspensión bloqueante (Roche, 1096176), manteniéndola en hielo. Se añaden 5 µL de suero de cabra y 1µL del anticuerpo anti-DIG.
- b) Se agita suavemente durante 1 hora o más a 4°C.
- c) Se diluye la suspensión en un volumen final de 2 mL de una solución de TSBT/ suero de cabra al 10 %.

Se cambia la solución de TSBT/suero de los embriones y se reemplaza por la solución que contiene el anticuerpo preabsorbido. Se deja incubando a 4°C toda la noche.

Lavados post-anticuerpo y revelado: Se realizaron dos lavados con TBST de 10 minutos cada uno. Posteriormente, se realizan cuatro lavados de 1 hora cada uno con 6 ml de TBST. Se reemplaza el TSBT por TBST nuevo y se deja lavando toda la noche.

Al día siguiente se lava dos veces con NTMT (ver soluciones) durante 10 minutos. Se deja incubando a 37°C con una solución que contiene la siguiente mezcla: 1.5 mL de NTMT, 4.5 µL de NBT (Roche, 1383 213) y 3,5 µL de BCIP (Roche, 1383 211). Hay que mantener en oscuridad la reacción por un periodo de 30 a 40 minutos. Posteriormente se lava tres veces con PBT durante 10 minutos. Los embriones así tratados se almacenan en una solución 1:1 de PFA al 3.5% y PBS, a 4°C.

La hibridación *in situ* de las sondas de Slit 1, 2 y 3 se realizaron en embriones de rata en los estadios E11.5, E12.5 y E13.5, mientras que la expresión de los mRNAs de las Semaforinas 3A, 3C, 3D y 3F se observó en embriones de ratón en los estadios E10.5, E11.5 y E12.5, ya que en esta etapa del desarrollo los estadios entre estas dos especies son equivalentes (Easter Jr, Ross y Frankfurter, 1993; Auclair, Marchand y Glover, 1999).

- **Materiales**

I. Soluciones

a) soluciones para cultivos en geles de colágena e inmunohistoquímica

Ringer. Solución salina Ringer pH 7.2: Se hace con una concentración 0.1232 M de NaCl, 0.0015 M de CaCl₂·2H₂O, 0.0049 M de KCl.

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

PBS. 8 gr de Cloruro de Sodio, 0.2 gr de Cloruro de Potasio, 1.15 gr de fosfato de sodio dibásico (Na₂HPO₄), 0.2 gr de fosfato de potasio, monobásico (KH₂PO₄).

PFA al 3.5 %. Paraformaldehído al 3.5% en PBS/pH 7.4.

PBS pH 7.3. Concentración 0.0014 M de NaCl, 0.0026 M de KCl, 0.0042 M de Na₂HPO₄ y 0.0014 M de KH₂PO₄.

b) soluciones para la transformación de células.

Medio LB en cápsulas (BIO 101 Inc., 3002-021) disuelto en agua destilada estéril.

c) soluciones de la Miniprep:

Solución I: Glucosa 50 mM, EDTA 10 mM, Tris-HCl 25mM. El pH se ajusta a un valor de 8.0. La solución se esteriliza y se almacena a 4°C.

Solución II: Dodecil sulfato de sodio (SDS) al 10 % y NaOH 10N

Solución III Acetato de K 3M y ácido acético glacial 2M en agua tridestilada

d) soluciones para geles de agarosa al 1%

TBE 62.2 % de TRIS, 31.9% de ácido bórico y 5.4% de EDTA,

e) soluciones de la hibridación *in situ*:

PBT = PBS + Tween 20 al 0.1%,

<u>Mezcla de hibridación</u>		para 300 mL
Formamida	50 %	150mL
SSC (20 X, pH 4.5)	1.3 X	19.5 mL
EDTA (0.5M, pH8)	5mM	3 mL
RNA de Levadura (20 mg/mL)	50 µgr/mL	750 µL
Tween-20 (10 %)	0.2 %	6 mL
CAPS (10 %)	0.5 %	15 mL
Heparina (50 mgr/ml)	100µgr/ml	600 µL
Agua destilada		105 mL

<u>TBST</u>	Para 1 litro
NaCl	8 gr
KCl	0.2 gr
Tris -HCL pH 7.5 1M	25 mL
Tween-20	11 gr
Agua destilada	para llenar 1 litro

<u>NTMT</u>	Para 50 ml
NaCl 5M	1 mL
Tris-HCl pH 9.5 2M	5 mL
MgCL ₂ 2M	2.5 mL
Tween-20 10 %	5 mL
Agua destilada	37.5 mL

VIII. RESULTADOS

Objetivo 1. Estudio y caracterización de la proyección del TPOC durante el desarrollo embrionario en la rata.

En el ratón (*Mus musculus*) las células del nTPOC situadas en la base del tallo óptico, empiezan a proyectar en el estadio E9.5. Los axones prosiguen su proyección alrededor de la frontera ventrocaudal del tallo óptico en dirección a la flexura cefálica. Para E10 los axones del nTPOC pasan el cuerpo mamilar y llegan a la flexura cefálica, en la prosómera 2. Para E11.5 el tracto se ha curvado y proyecta paralelo a la flexura cefálica. En este mismo estadio, el TPOC confluye con el tracto del nervio trigémino (trmesV) en el mesencéfalo. Por lo anterior el TPOC en el ratón es un tracto dorsal longitudinal que se extiende desde la prosómera 6, hasta al menos el rombencéfalo (Easter Jr, Ross y Frankfurter, 1993; Mastick y Easter, 1996).

Con el fin de describir la proyección de este tracto en la rata (*Rattus norvegicus*), inicialmente se realizó una serie de tinciones inmunohistoquímicas, para identificar un anticuerpo que tiñera de forma específica el TPOC. Se probaron anticuerpos contra calretinina y contra calbindina D-28K (calbindina). De los dos anticuerpos utilizados, solo los policlonales contra calbindina tiñen tanto al núcleo anterobasal o nTPOC como al tracto mismo. Una vez que identificamos a la calbindina como marcador del TPOC, se realizaron tinciones inmunohistoquímicas en el tubo neural de embriones de rata en estadios E11.5, E12.5, E13.5 y E14.5 de rata. El uso de este anticuerpo reveló que en E11.5 aparecen las primeras neuronas del nTPOC, las cuales proyectan caudalmente y dan origen al tracto (Figura 8A). En el estadio E12.5 la proyección del tracto ha alcanzado el extremo caudal del tallo óptico (Figura 8B) y para E13.5 la proyección se une en su región caudal con el Tracto Supra Óptico, SOT, a la altura del tallo óptico (Figura 9A). En este estadio es posible observar la proyección fasciculada de ambos tractos en dirección caudal.

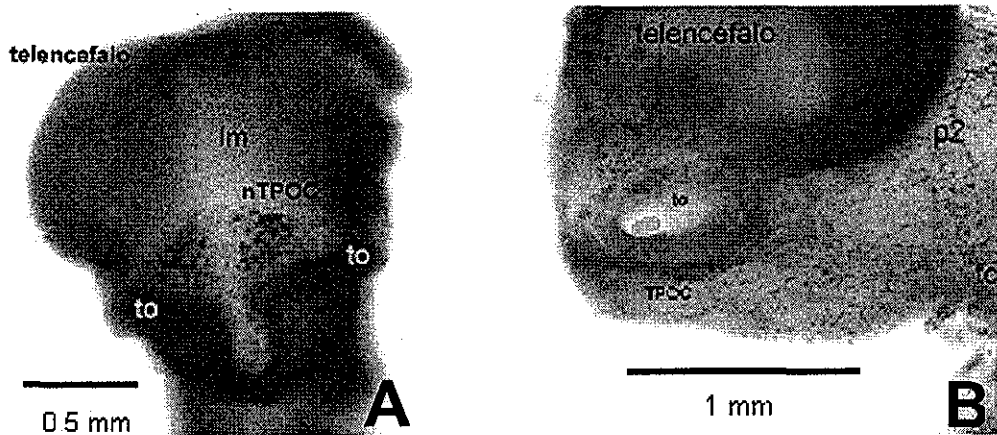


Figura 8

Inmunotinciones con calbindina en el tubo neural de embriones de rata
 A) vista frontal, embrión de rata E11.5, B) vista lateral, embrión de rata E12.5
 lm, línea media; to, tallo óptico; p2, prosómera 2; fc flexura cefálica
 TPOC, tracto de la comisura postóptica; nTPOC; núcleo del TPOC.

Para E14.5 ya no es posible observar una proyección mas caudal del TPOC, la cual llega a la prosómera 2 (Mastick., Davis, Andrews y Easter Jr , 1997), sin embargo es posible observar un engrosamiento del tracto a la altura del tallo óptico (Figura 9B). La dificultad para ver la proyección más caudal de TPOC podría deberse a un cambio en las propiedades intrínsecas del tracto, por lo que los anticuerpos anti-calbindina ya no lo detectan, o bien podría deberse a un engrosamiento del tejido neuroepitelial que impide la entrada del anticuerpo hasta su blanco.

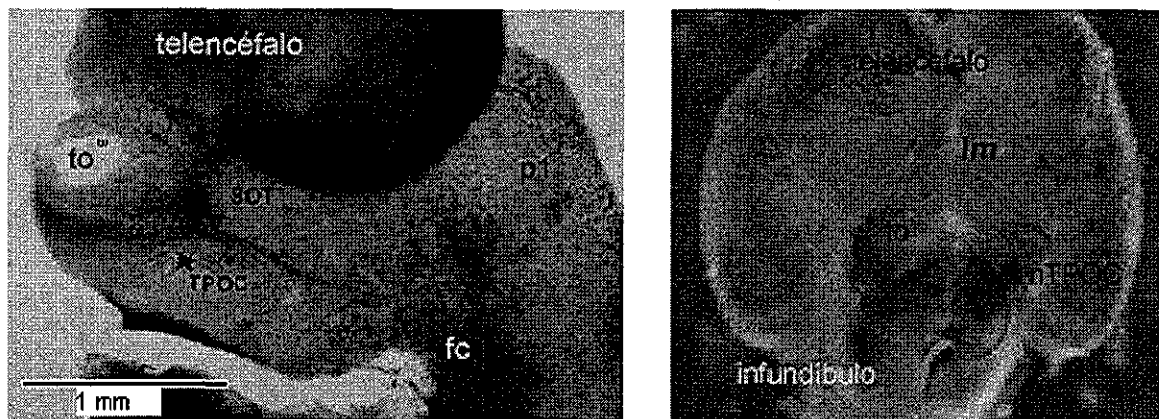


Figura 9

Inmunotinciones con calbindina del tubo neural de embriones de rata
 A) Vista lateral, estadio E13.5, se señala la proyección del TPOC
 B) Vista frontal, estadio E14.5 en el cual se señala con la cabeza de la flecha la localización del TPOC
 SOT tracto supra óptico; p1, prosómera 1

Como puede observarse, las primeras etapas de proyección del TPOC en la rata, son similares a las reportadas en el ratón (Easter Jr, Ross y Frankfurter, 1993; Mastick y Easter 1996; Shimamura, Hartigan, Martínez, Puelles y Rubeinstein, 1995). Estudios posteriores que abarquen el control de la proyección del TPOC en regiones más caudales, podrán realizar tinciones con anticuerpos anti β -Tubulina clase III, con la cual se puede detectar a este tracto en estadios más avanzados del desarrollo del ratón (Mastick y Easter, 1996). La diferencia de dos días entre el inicio de la proyección del TPOC reportada en ratón, E9.5 y el inicio de la proyección de este tracto encontrada en la rata E11.5, es coherente con reportes anteriores que establecen una diferencia de dos días en el desarrollo de ambas especies durante esta etapa del desarrollo embrionario (Auclair, Marchand y Glover, 1999).

Con el objetivo de tener un modelo *in vitro* para estudiar la proyección del nTPOC, se implementó la técnica de cultivo de explantes de tejido neuroepitelial en geles de colágena. Esta técnica consiste en la colocación de un explante de tejido neuroepitelial entre dos capas de colágena (principalmente del tipo I), de tal forma que se establece una matriz tridimensional alrededor del tejido permitiendo el crecimiento neurítico del explante, en todas direcciones (Guthrie y Lumsden, 1994). Una ventaja del uso de los geles de colágena para estudios *in vitro*, es que se pueden establecer gradientes de sustancias quimiotrópicas o tróficas; asimismo los explantes pueden ser colocados y orientados de forma precisa en relación unos de los otros. Además, el ambiente químico dentro del gel así como en el medio que lo rodea, pueden ser manipulados ya sea por el uso de suplementos (proteínas de la matriz extracelular, factores de crecimiento en el medio), o por la adición de anticuerpos que bloqueen la actividad de las moléculas bajo estudio (Guthrie y Lumsden, 1994).

Para obtener los explantes del tejido que contienen al nTPOC, primero se realizó la disección del tejido neural del prosencéfalo, hasta dejarlo libre de los tejidos no neurales. Debido a que en la rata el nTPOC se localiza en la base del tallo óptico (Figuras 8 y 9), se tomó esta estructura como referencia para realizar los cortes del tejido, de tal forma que el explante siempre contenía al núcleo. En una primera aproximación se realizaron cortes que contenían tanto el núcleo como al tallo óptico. Se logró con éxito establecer el cultivo

en geles de colágena del nTPOC; se obtuvo un crecimiento importante de neuritas a los dos días de cultivo en la incubadora húmeda de CO₂. Los explantes cultivados fueron tanto unilaterales (sólo uno de los núcleos, Figura 10A), como bilaterales (contenían los dos nTPOC a ambos lados de la línea media ventral, Figura 10B). Las neuritas de nTPOC fueron identificadas mediante la técnica de inmunohistoquímica con anticuerpos contra calbindina.

Un resultado importante es que se probó que la técnica de inmunohistoquímica con anticuerpos contra calbindina es una herramienta poderosa para poder seguir la trayectoria del tracto *in vitro*, tanto en embriones completos como en los cultivos de explantes.

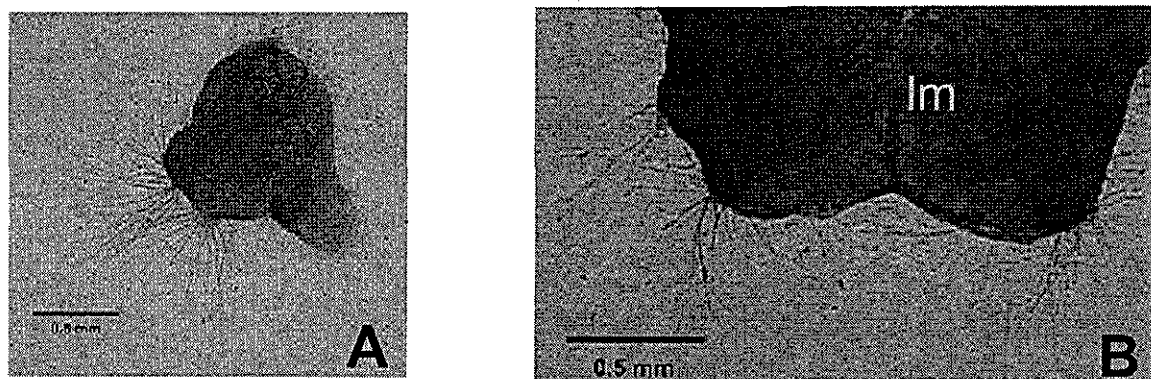


Figura 10

Cultivo del nTPOC en geles de colágena, inmunotinción con calbindina
A) Cultivo unilateral del nTPOC, B) cultivo bilateral que contiene ambos nTPOC

Posteriormente, se realizaron cortes más pequeños, de tal forma que el explante sólo contenía al nTPOC. Esto se hizo con el objetivo de describir cómo proyecta el núcleo *in vitro*. Era necesario establecer de qué manera inicia este núcleo su proyección fuera de su sitio de origen, para conocer si lo realiza de forma circunferencial o lo realiza siguiendo un patrón definido. Tras una serie de experimentos se encontró que el núcleo del TPOC proyecta sus neuritas por dos polos dominantes, localizados de forma opuesta uno del otro (Figura 11).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

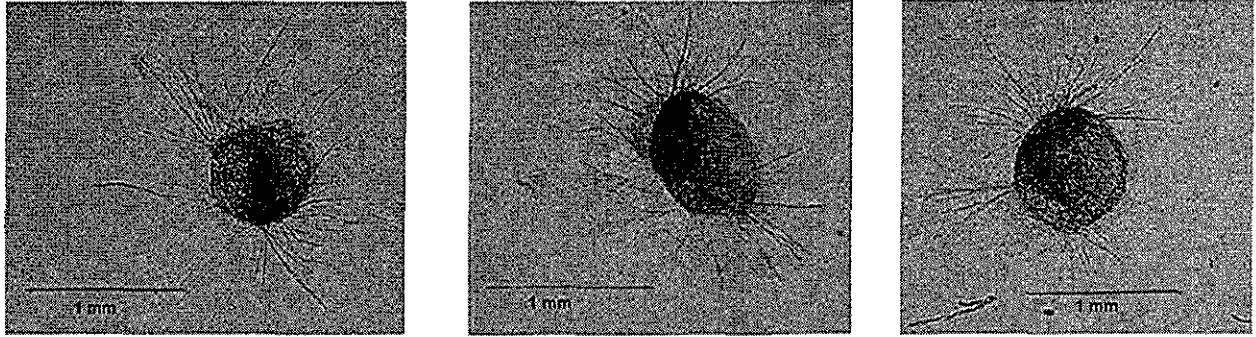


Figura 11

Cultivos del nTPOC en geles de colágena, inmunotinción con calbindina

Objetivo 2. Identificación de regiones del neuroepitelio que generan moléculas quimiotrópicas capaces de controlar la proyección caudal de los axones del TPOC.

Los organizadores transversos son áreas neuroepiteliales localizadas entre límites estructurales dentro del tubo neural que son capaces de producir señales morfogenéticas y establecer propiedades polarizantes en las regiones neurales que las rodean (Garda, Echevarría y Martínez, 2001). Tomando como base el conocimiento que se tiene sobre los organizadores transversos, se propuso probar el efecto que tendría la zona retroquiasmática, situada rostralmente al nTPOC, en la proyección de este tracto. Por tal motivo se realizaron cultivos en geles de colágena en los cuales se colocó un explante de nTPOC adyacente a un explante que contenía a la zona retroquiasmática. Tras una primera serie de experimentos para caracterizar el sistema se encontró que existe una alta migración celular dentro del co-cultivo, por lo que se decidió no continuar con esta técnica experimental. Lo anterior debido a que se vuelve difícil determinar cuál es el efecto real de la zona retroquiasmática, ya que un fenómeno de inhibición podría deberse a la acción propia de esta zona o bien, deberse a la presencia de una barrera física establecida por las células en migración (Figura 12).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

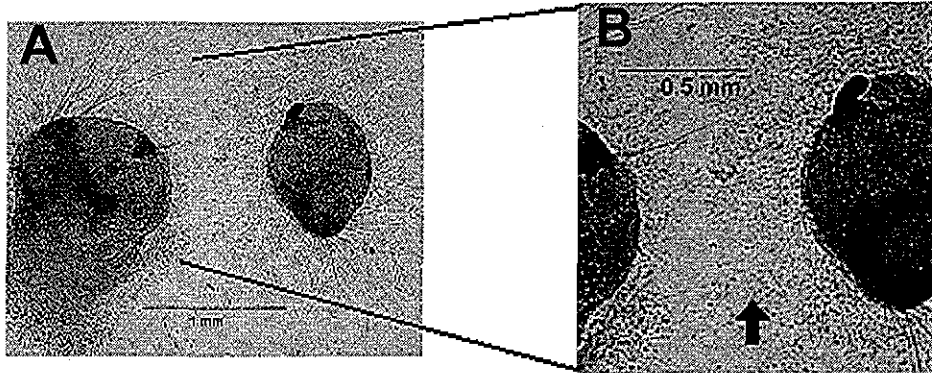


Figura 12
 Cocultivo de la zona Retroquiasmatica y el nTPOC
 Ampliación de la zona señalada, la flecha indica la migración celular
 Inmunotinción con calbindina

Por tal motivo se propone utilizar otra técnica experimental para la realización de estudios posteriores que nos lleven a identificar qué región del neuroepitelio se encuentra dirigiendo el patrón de proyección caudal del TPOC. Esta técnica consiste en realizar cultivos del tubo neural completo de embriones ratón (*Mus musculus*), en membranas de policarbonato. En estos cultivos es posible realizar electroporaciones con vectores de expresión de diversas moléculas guía para expresarlas ectópicamente, y valorar así su papel en la regulación de la proyección del nTPOC (Garda, Echevarría y Martínez, 2001). Sin embargo, para realizar este tipo de experimentos es necesario primero establecer cuáles son las moléculas quimiotrópicas que pudieran estar involucradas en la regulación de la proyección del tracto.

Con ese objetivo final se propuso en este proyecto estudiar los patrones de expresión de moléculas quimiotrópicas que pudieran estar participando en la regulación de la proyección del TPOC, para describir un mapa de la expresión de estas moléculas en el prosencéfalo. Con base a este mapa se determinarán las moléculas guía a ser electroporadas en el cultivo de cerebros completos en mallas de policarbonato en experimentos posteriores.

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

El primer paso para cumplir este objetivo fue identificar qué receptores a moléculas guía expresa el nTPOC. Tomando como base el trabajo de Anderson, Jackson, Fujisawa y Key, (2000), en el cual se reporta la expresión selectiva de Npn-1 en una sub-población de neuronas del TPOC en *Xenopus* y su papel como molécula guía en la proyección de este tracto, nos dimos a la tarea de comprobar la expresión de dos miembros de la familia de receptores de Neuropilina en el nTPOC. Se realizaron cultivos en geles de colágena de nTPOC y se tiñeron posteriormente mediante inmunohistoquímica con anticuerpos contra npn-1 y contra npn-2. Como se muestra en la Figura 13A, la tinción para Npn-1 resultó positiva, con lo que se comprueba la expresión de este receptor también en las neuritas de TPOC de la rata. No se observó tinción alguna en los explantes de este núcleo con el anticuerpo contra Npn-2. Para corroborar la expresión de Npn-1 por el TPOC *in situ*, se realizó una tinción inmunohistoquímica en el tubo neural del embrión con anticuerpos contra Npn-1 y nTPOC (Figura 13B).

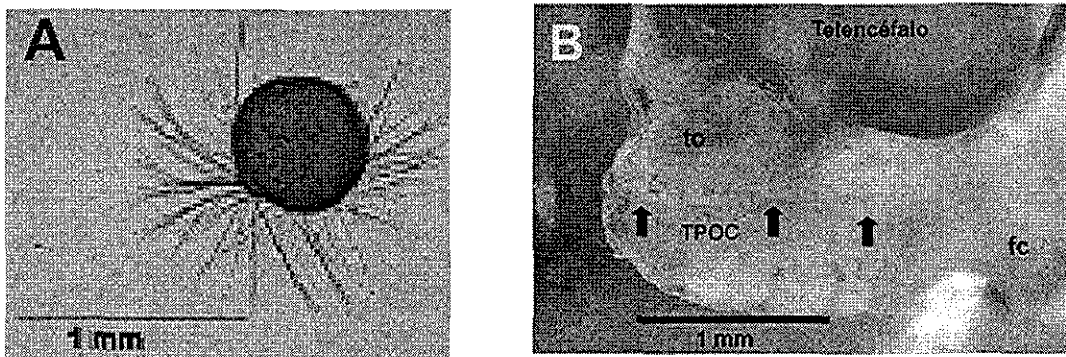


Figura 13

- A) Cultivo en Colágena de un explante del nTPOC inmunoteñido con anticuerpos contra npn-1;
 B) Vista lateral del prosencefalo de rata E13 5 inmunopositivo para npn-1

Tomando en cuenta que las neuritas del nTPOC resultaron positivas para Npn-1, se realizó la hibridación *in situ* de las Semaforinas 3A, 3B, 3C y 3E que son las moléculas ligando para Npn-1 (Chen, Chédotal, He, Goodman y Tessier-Lavinge M, 1997; Nakamura, Tanaka, Takahashi, Kalb y Strittmatter, 1998; Raper, 2000; Tagmanone y Comoglio, 2000; Varela-Echavarría, Tucker, Püschel y Guthrie, 1997), Solamente Semaforina 3A (Sema 3A) y Semaforina 3C (Sema 3C) mostraron patrones de expresión cercanos al sitio de proyección del TPOC. Sema 3C se expresa alrededor del tallo óptico y en una región rostral a éste (Figura 14), y por otro lado Sema 3A se expresa también alrededor del tallo

óptico y además en una región ventral a esta estructura (Figura 15A). Esta zona de expresión tanto de Sema 3A y como de Sema 3C, localizada ventral al tallo óptico, podría estar participando en el control de la proyección del tracto. También existe la posibilidad de que la Sema 3A esté siendo expresada por neuronas del TPOC, ya que su región de expresión se sobrepone a la región en la cual se localiza el nTPOC (Figura 15B). Considero necesario realizar experimentos posteriores de co-expresión para verificar si la expresión de Sema 3A se localiza rostral al nTPOC tracto o esta siendo expresada por este núcleo.

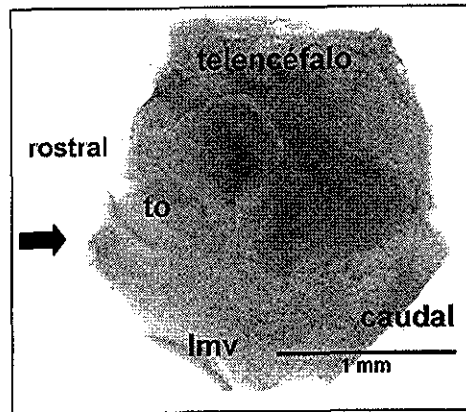


Figura 14

Vista lateral de una hibridación *in situ* de Sema 3C en el prosencéfalo de un embrión estadio E10.5 de ratón

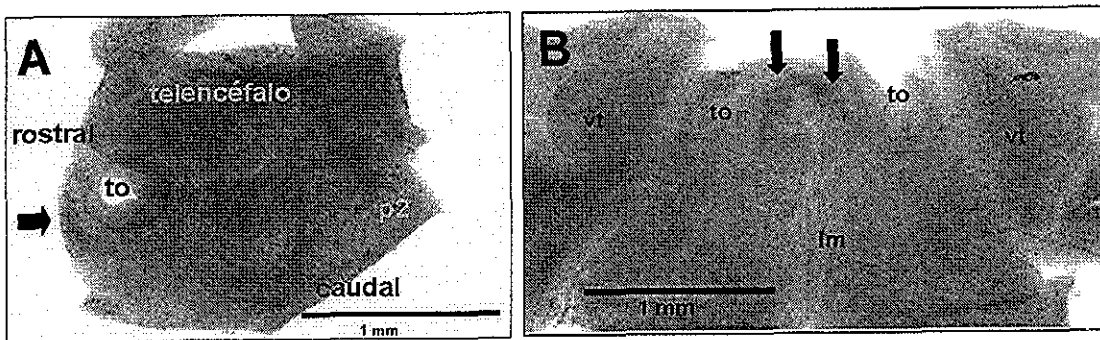


Figura 15

In situ para de Sema 3A en el prosencéfalo de un embrión de ratón E11
 vista lateral del prosencéfalo; B) Vista frontal del prosencéfalo.
 Las flechas señalan los sitios de expresión

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

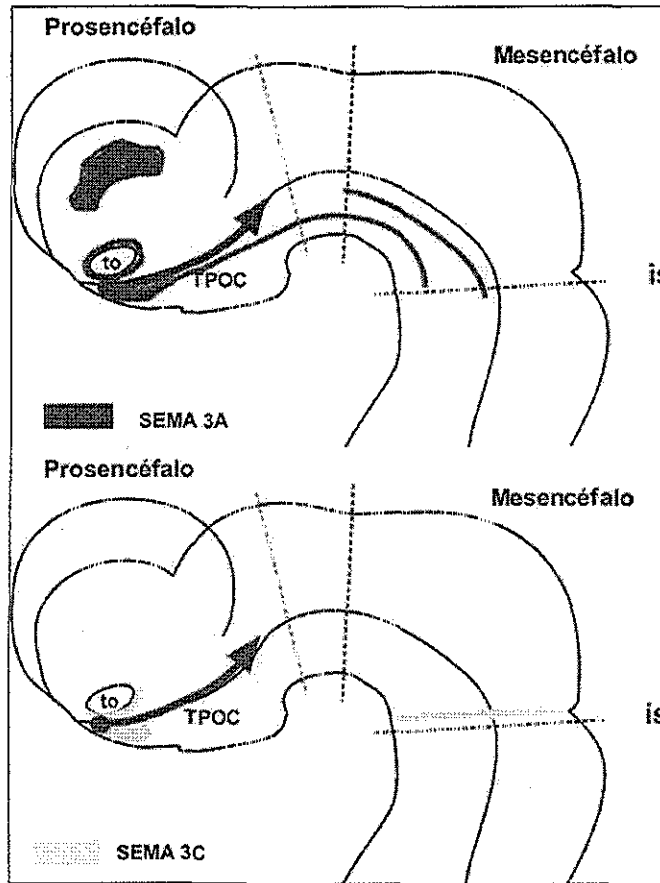


Figura 16
 Esquema del patrón de expresión de Sema 3A y Sema 3C
 En el prosencéfalo (P) y el mesencéfalo (M) de un embrión de ratón estadio E13
 is, istmo

También se analizaron los patrones de expresión de las moléculas Slit y sus receptores Robo, ya que forman parte de un sistema que participa en el control de la proyección de tractos neuronales en el prosencéfalo (Ba-Charvet et al., 1999; Bagari et al., 2002; Erskine et al., 2000; Ringstedt et al., 2000). Tres distintos genes *slit* (*slit 1*, *slit 2*, *slit 3*) y tres distintos genes *robo* (*robo 1*, *robo 2*, *robo 3*) han sido clonados en mamíferos, pero a la fecha solo Robo1 y Robo 2 han demostrado ser receptores para las Slits (Marillat et al., 2002). Primero se llevaron a cabo las hibridaciones *in situ* para los receptores Robo. En las hibridaciones *in situ* es posible observar que tanto Robo 1 como Robo 2 se expresan en la misma región que el nTPOC. Debido a que en esa área del prosencéfalo sólo se encuentra el nTPOC (Easter Jr, Ross y Frankfurter, 1993), podemos afirmar que las neuronas del TPOC están expresando los receptores Robo (Figuras 17A y B).

ILSIS CON
 FALLA DE ORIGEN

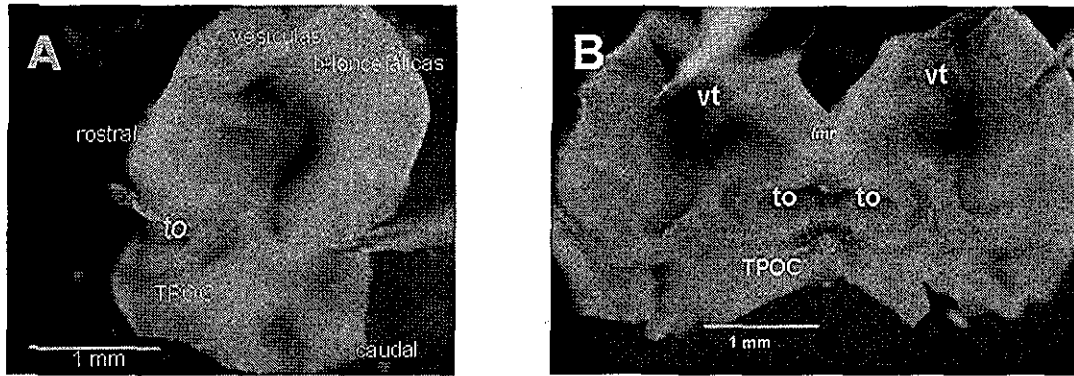


Figura 17

- A) Vista lateral de la hibridación *in situ* de Robo 1, E13.5
 B) Vista frontal de la hibridación *in situ* de Robo 2, E13.5
 lmr, línea media rostral

Debido a que se encontró que el nTPOC expresa los receptores Robo, se realizaron hibridaciones *in situ* de las moléculas Slit 1, Slit 2 y Slit 3. Los resultados indican que Slit 1 se expresa en el prosencefalo, principalmente en la región mas rostral de las vesículas telencefálicas y rodeando la parte caudal del tallo óptico (Figura 18A). Slit 2 se expresa en regiones que flanquean la región de proyección del TPOC, es decir, se expresa dorsal y ventralmente a la región por la cual proyecta el tracto (Figura 18B). Por otro lado Slit 3 no se expresa en esta región del cerebro (Figura 19).

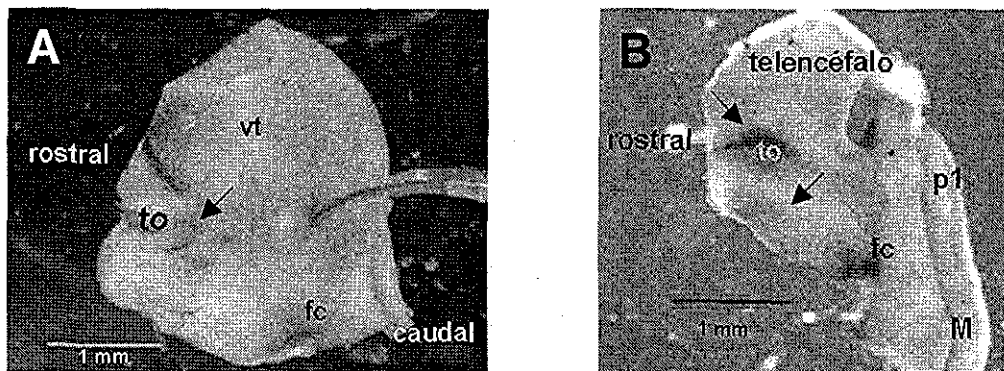


Figura 18

- A) vista lateral del prosencefalo, *in situ* para Slit 1, E13.5,
 B) vista lateral del prosencefalo *in situ* para Slit 2, E12.5
 Las flechas indican la expresión de las moléculas Slit

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

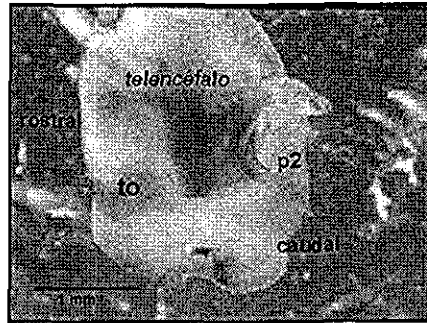


Figura 19

Vista lateral del prosencéfalo, *in situ* para Slit 3, E13.5

Como puede observarse el patrón de expresión en el prosencéfalo para cada una de las moléculas Slit es distinto. En el rombencéfalo estas tres moléculas muestran regiones comunes de expresión, principalmente a lo largo de la placa del piso. A continuación se brinda una descripción mas detallada de los patrones de expresión de estas moléculas:

Slit 1 se expresa a lo largo de la placa del piso desde el romboencéfalo hasta donde termina la flexura cefálica, en el diencéfalo. También se expresa en la placa del techo a lo largo de todo el romboencéfalo teniendo como límite rostral la prosómera 2. En el mesencéfalo es posible observar un engrosamiento a la altura de la flexura cefálica. En el prosencéfalo Slit 1 se expresa en una franja que tiene como límite superior la región más rostral de las vesículas telencefálicas, a la altura de la placa comisural, continua dorsalmente al tallo óptico y tiene como límite caudal una región dorsal y caudal a éste. Asimismo slit 1 se expresa en el borde caudal del tallo óptico (Figura 20).

Slit 2 se expresa a lo largo de la placa del piso y de la placa del techo, es posible observar un engrosamiento de la expresión en la placa del techo a la altura del *istmo* y en la placa del piso, en el mesencéfalo. En el prosencéfalo Slit 2 se expresa en una franja gruesa paralela a la placa precordial, así como en una franja dorsal al tallo óptico, que va desde la región mas rostral de esta estructura, hasta su región caudal, dejando libre así la región de proyección del TPOC (Figura 20).

Slit 3 se expresa solamente en la placa del piso teniendo como límite rostral la mitad del mesencéfalo. En la placa del techo solo se observa tinción en la región dorsal del *istmo*. En el prosencéfalo no se observa expresión de Slit 3 (Figura 20).

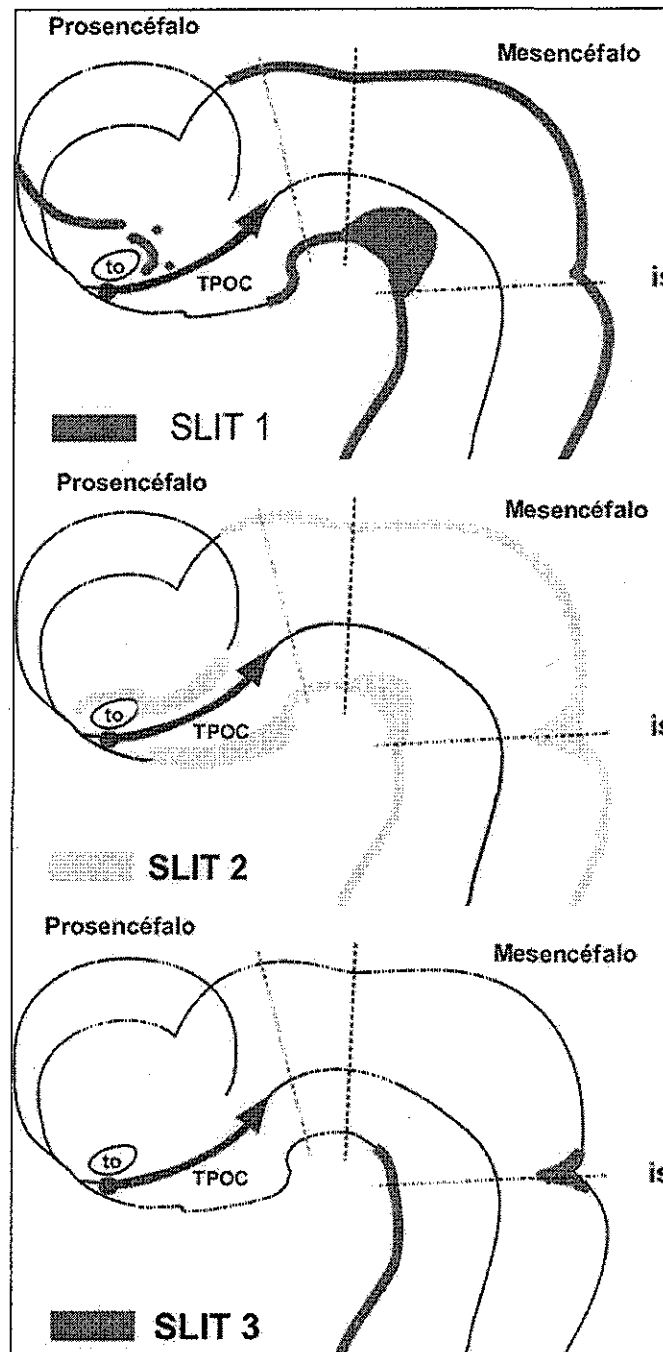


Figura 20
 Esquema del patrón de expresión para las Slits
 Procencéfalo y mesencéfalo de E13, is, istmo.

El ligando Slit 2 muestra un patrón de expresión que sugiere ser complementario al patrón obtenido con los receptores Robo. Para E12, que es cuando el TPOC inicia su proyección, se observa que Slit 2 se encuentra delimitando el área de proyección de este tracto, es decir, es posible observar expresión de Slit 2 dorsal y ventral a este tracto (Figura 18B). En

el ratón se ha reportado que el TPOC proyecta por la región alar del prosencéfalo rostral (Mastick et al, 1996), por lo que la expresión de Slit 2, que cubre la placa basal de esta región del prosencéfalo, podría estar participando en la regulación de la proyección de esta tracto al delimitar la zona por la cual proyecta el tracto.

En la Figura 21 se muestra un esquema del prosencéfalo en el cual se representan de forma conjunta a las moléculas Slit, por un lado, y a Sema 3A y Sema 3C, por otro. Este esquema nos permite tener una visión global de algunas de las moléculas quimiotrópicas que se expresan en la región y que podrían estar involucradas en la regulación de la proyección caudal inicial del TPOC.

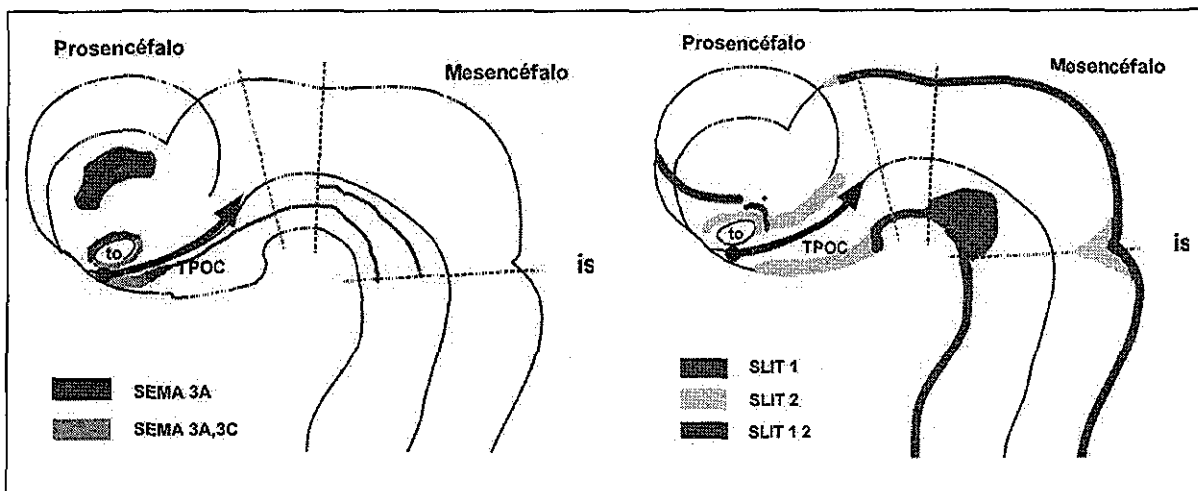


Figura 21

Esquema del patrón de expresión en el prosencéfalo de las moléculas analizadas en el presente trabajo

Los resultados presentados hasta el momento han permitido obtener una descripción general del modelo de estudio (el TPOC). Esta descripción servirá para trabajos posteriores, con el fin de describir en una forma más detallada, los procesos moleculares involucrados en la regulación de la proyección caudal del TPOC en el prosencéfalo en desarrollo de la rata. Esto a su vez contribuirá a dilucidar las bases de la proyección longitudinal de tractos neuronales durante el desarrollo del SNC en mamíferos.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

IX DISCUSIÓN

Uno de los resultados importantes de este estudio fue la identificación de un marcador para el TPOC. La tinción con calbindina resultó ser positiva para las neuritas del tracto, por lo que se cuenta con una herramienta poderosa para seguir su trayectoria, ya sea en cultivos o en estudios *in vivo*.

Se realizaron cultivos en geles de colágena para describir la proyección inicial del TPOC y encontramos que el núcleo proyecta principalmente a través de dos polos dominantes. Mediante esta misma técnica se observó la expresión de Npn-1 por las neuritas de este núcleo y se comprobó su expresión *in situ* mediante una inmunotinción con anticuerpos anti Npn-1 en el tubo neural completo de embriones E13.5. Con el objetivo de identificar regiones del prosencéfalo que regulen la proyección del TPOC, se realizaron co-cultivos de la zona retroquiasmática y del nTPOC. Después de una serie de experimentos preliminares, se detectó una alta migración celular en ellos. Debido a que este fenómeno podría enmascarar el efecto trópico de la zona retroquiasmática sobre el núcleo neuronal, se decidió cambiar de estrategia experimental para identificar las regiones del neuroeptelio que controlen la proyección del TPOC.

Se llevaron a cabo hibridaciones *in situ* de algunas moléculas quimiotrópicas, como otra aproximación para identificar las regiones del prosencéfalo que regulan la proyección del TPOC. Así, se realizaron las hibridaciones de las Semaforinas 3A, 3B, 3C y 3E, así como de las moléculas Slit 1, Slit 2, Slit 3 y sus receptores Robo 1 y Robo 2, con el objetivo de describir un mapa de los patrones de expresión de estas moléculas quimiotrópicas en el prosencéfalo. Con base en estos patrones de expresión se propone a Sema 3A, Sema 3C y a las moléculas Slit 1 y Slit 2 como primeros candidatos para evaluar su papel en el control de la proyección del TPOC, describiendo el efecto que pudieran tener sobre la proyección de este tracto al ser expresadas ectópicamente en cultivos de cerebros completos de embriones de rata.

- **Caracterización de la proyección del TPOC en la rata en desarrollo**

Existe una descripción amplia de la proyección del TPOC en el pez cebra (*B. reiro*) (Hjorth y Key, 2001), en *Xenopus* (Anderson y Key, 1999) y en el ratón (*M. musculus*) (Easter Jr, Ross y Frankfurter, 1993; Mastick y Easter Jr, 1996)). La proyección del TPOC en la rata desde el estadio E11.5 hasta el estadio E13.5 concuerda con la reportada en el ratón, pero difiere con la reportada en el pez cebra y en *Xenopus*. En el pez cebra algunos de los axones del TPOC entran en la lámina basal mientras que otros lo hacen en la lámina alar (Hjorth y Key, 2001). En *Xenopus* lo realizan siempre por la placa basal (Anderson y Key, 1999) y no así en el ratón donde todos los axones pasan dorsalmente al fascículo longitudinal medio (mlf) y se unen con el tracto alar del tmesV (Mastick y Easter Jr, 1996).

De acuerdo con la evidencia experimental obtenida de las inmunohistoquímicas realizadas en este trabajo, encontramos que el TPOC proyecta de forma similar en la rata y en el ratón. Este hecho es importante ya que permite combinar diferentes técnicas metodológicas para el estudio molecular de la regulación de la proyección caudal de este tracto. Así podemos utilizar las técnicas de cultivo *in vitro* de tejidos neuroepiteliales que se encuentran muy bien establecidas para el tejido de rata, y utilizar las herramientas genéticas de los ratones (principalmente los knockout) para estudiar los efectos de diferentes moléculas quimiotrópicas en la regulación de la proyección del TPOC.

- **Cultivos y co-cultivos de explantes en geles de colágena**

Los cultivos de explantes de tejido neuronal en geles de colágena han sido una técnica ampliamente utilizada para identificar regiones neuroepiteliales que regulan la proyección de núcleos neuronales específicos. Sin embargo para el modelo experimental utilizado en este trabajo, los cultivos en geles de colágena no son la técnica adecuada para brindarnos la información necesaria para determinar qué regiones neuroepiteliales pudieran estar participando en la regulación de la proyección

del TPOC. Esto debido principalmente a que se encontró una elevada migración celular en los explantes y este hecho podría enmascarar el efecto que pudiera tener alguna región del neuroepitelio sobre el nTPOC.

Sin embargo no debemos abandonar el uso de esta técnica, ya que en experimentos posteriores se pueden realizar co-cultivos del nTPOC con agregados celulares que estén expresando y secretando las moléculas quimiotrópicas identificadas en este trabajo, como posibles candidatos a regular la proyección caudal del TPOC. Así, de acuerdo al papel quimiorrepelente que tienen tanto las Semaforinas como las moléculas Slit sobre los axones en crecimiento, las neuritas del nTPOC en este tipo de cultivos proyectarían los efectos de las moléculas Slit 1, Slit 2, Sema 3A, Sema 3C, sobre la proyección del TPOC.

- **Hibridación *in situ* de las semaforinas.**

En *Xenopus*, la expresión de Npn-1 por las neuronas del TPOC está relacionada con la formación de la primera comisura de este tracto en el mesencéfalo. La sobreexpresión de este receptor altera el patrón de proyección del TPOC, los axones entran a la comisura ventral, pero fallan en cruzar la línea media. Los autores sugieren que los niveles de expresión de Npn-1 por las neuronas del TPOC, son críticos para determinar dónde estos axones alcanzan la línea media (Anderson, Jackson, Fujisawa y Key, 2000). Mediante inmunohistoquímica *in vitro* e *in situ*, observamos la expresión de Npn-1 por las neuronas del TPOC en el prosencéfalo de la rata en desarrollo. Esto sugiere que también en la rata, este receptor participa en la regulación de la formación de las comisuras del TPOC a lo largo de su proyección caudal. Experimentos similares a los realizados por Anderson et al. (2000) de sobre-expresión del gen, o bien estudios de ratones knockout para este receptor, nos brindaran mayor información del papel de la Npn-1 en la proyección de este tracto.

Lo relevante de los patrones de expresión obtenidos de las Semaforinas 3A y 3C es su proximidad a la región de proyección del TPOC, sin embargo aún no contamos con suficiente evidencia experimental para determinar si la expresión de estas moléculas es

rostral al tracto o están siendo expresadas por la neuronas del nTPOC. Estos dos casos nos brindan perspectivas diferentes sobre el papel de las semaforinas en la regulación de la proyección del TPOC. En el caso de que se compruebe que el mismo núcleo expresa tanto el receptor (Npn-1) como el ligando (Sema 3A), se tendrá un modelo experimental para estudiar los procesos moleculares intrínsecos al nTPOC, que participan en regular que el núcleo celular responda primero a una señal quimiotrópica y posteriormente durante su desarrollo, responda a otra. Por otro lado si la expresión de Sema 3A y Sema 3C, se localiza rostral y ventral al núcleo del tracto, su papel sería de tipo trópico, ya que estarían orientando la proyección de los axones del TPOC en dirección caudal.

- **Hibridaciones *in situ* de la moléculas del sistema Slit-Robo**

Marillat y colaboradores (2002) estudiaron los patrones de expresión de las tres moléculas Slit identificadas en mamíferos, Slit 1, Slit 2 y Slit 3, y los receptores Robo 1 y Robo 2. Encontraron que existe un patrón de expresión espacio-temporal definido de los receptores robo en poblaciones neuronales que navegan distancias largas dentro del SNC en desarrollo. Asimismo, encontraron que los ligandos Slit se expresan de forma complementaria a los receptores robo; esto es a lo largo de puntos estratégicos por los cuales proyectan estas poblaciones neuronales. Lo anterior sugiere que estas moléculas juegan diversos papeles en el control del desarrollo del SNC. Por ejemplo, el sistema Slit-Robo participa activamente en el desarrollo correcto del sistema visual en mamíferos (Erskine et al, 2000; Plump et al, 2002). Es relevante el estudio que se ha hecho en ratones knockout para Slit 1 y Slit 2. En estos ratones se han observado alteraciones en la proyección de varios tractos del prosencefalo tales como: el tracto córtico-fugal, el cuerpo calloso y el tracto tálamo-cortical (Bagari et al, 2002).

Los estudios realizados sobre el efecto que tiene el sistema Slit y Robo en la proyección de las neuronas ganglionares de la retina (Erskine et al, 2000; Plump et al, 2002), así como toda la información con que se cuenta de su acción en la formación de las comisuras en *D. melanogaster* (Guthrie, 2001; Kidd et al, 1998); confirman que las

interacciones entre las moléculas Slit y sus receptores Robo se requieren para regular la proyección axonal en el lado ipsilateral del cerebro embrionario antes de que crucen la línea media en alguna región posterior. Tomando como base lo expuesto anteriormente, podríamos sugerir que el sistema Slit-Robo está participando en asegurar la proyección ipsilateral del TPOC, durante su trayecto desde p6 hasta el mesencéfalo.

- **Otras moléculas quimiótropicas en el prosencéfalo**

En el prosencéfalo, se conoce poco sobre el patrón de expresión de otras moléculas con efectos trópicos reconocidos, tales como las Efrinas, las Neurotrofinas y las Netrinas. Estudios posteriores serán necesarios para describir los patrones de expresión de estas familias de moléculas en el prosencéfalo, con el fin de que el mapa presentado en este trabajo, sea aún mas completo y brinde una mayor información sobre la región por la cual proyecta el TPOC.

Será importante establecer si el TPOC expresa también el receptor DCC y en caso de que la respuesta sea afirmativa, describir su expresión de forma temporal. Lo anterior, no solo porque en *Xenopus* se haya descrito su expresión en una sub-población de neuronas del TPOC (Anderson, Cooper, Jackson, Seaman y Key, 2000), sino porque en la literatura se ha descrito la interacción física entre dominios citoplásmicos del receptor Robo con el receptor DCC, como un mecanismo de regulación por el cual los axones en crecimiento son capaces de aumentar su respuesta a las señales de repulsión mediadas por las moléculas Slit, y a disminuir, al mismo tiempo, la respuesta de atracción mediada por las Netrinas (Stein y Tessier-Lavigne, 2001).

Finalmente con base al mapa de expresión descrito de las moléculas estudiadas en este trabajo, es evidente que existe más de un sistema que pudiera estar regulando la proyección de este tracto. En la literatura existen descripciones en las cuales un núcleo neuronal y el tracto que forma, son guiados hasta sus células blanco por más de un sistema quimiotrópico (Plump et al, 2002; Varela-Echavarría y Guthrie, 1997). Lo

anterior no es de sorprenderse, ya que es necesario la acción de varios sistemas con el fin de asegurar la correcta proyección de los tractos neuronales durante el desarrollo.

El presente estudio describe un mapa de los patrones de expresión de algunas moléculas guía en una región del cerebro de la cual se sabe poco sobre la regulación de la proyección de sus tractos neuronales. Anteriormente, se han realizado grandes esfuerzos por encontrar una correlación entre dominios de expresión de genes y patrones de proyección de tractos. Hjorth y Key (2001), obtuvieron patrones de expresión espacio-temporales de diversos genes en la zona del prosencéfalo, con el fin de comparar los dominios de expresión con las rutas por las cuales proyectaban los tractos pioneros en el pez cebra. No encontraron una relación clara entre los dominios de expresión y las trayectorias de los tractos. En su trabajo proponen que éstos no son guiados por caminos continuos, definidos por un solo dominio de células que expresan un gen regulativo en particular, sino que son guiados por numerosas señales independientes reguladas por una red compleja de genes. El trabajo que presentamos se une a este esfuerzo por intentar establecer cuáles son los mecanismos generales que regulan la proyección de los primeros tractos neuronales en el prosencéfalo.

X CONCLUSIONES

- Debido a que en los estadios embrionarios E11.5, E12.5 y E13.5 la proyección del TPOC en la rata es similar a las reportadas para el ratón en los estadios E9.5, E10.5 y E11.5 (Easter et al, 1993; Mastick y Easter, 1996; Mastick et al, 1997), podemos concluir que el tracto proyecta de forma similar en ambas especies, tomando en consideración que existe una diferencia de aproximadamente 2 días entre los periodos de gestación de la rata y el ratón en esta etapa del desarrollo (Auclair, Marchand y Glover, 1999).
- Se determinó que la inmunotinción con calbindina D-28K es una técnica que permite la tinción del TPOC y de su núcleo, por lo que se tiene una herramienta valiosa para poder seguir la trayectoria del tracto tanto en experimentos *in vitro* como *in situ*.
- El sistema de cultivo *in vitro* en geles de colágena es una técnica que permite el crecimiento de neuritas del TPOC. Sin embargo debido a la alta migración celular que se presentó en los explantes, se decidió que esta técnica no es la indicada para realizar estudios que nos lleven a identificar tejidos neuroepiteliales que pudieran estar regulando el patrón de proyección del TPOC.
- Mediante técnicas de inmunotinción se describió, tanto en cultivos como *in situ*, la expresión de Npn-1 en las neuritas del nTPOC. Esto sugiere la participación del sistema Semaforina-Neuropilina en el control de la proyección del tracto.
- Mediante hibridación *in situ*, se obtuvieron los patrones de expresión de las semaforinas de la clase 3, ligandos reconocidos para el receptor npn-1. Se encontró que Sema 3A y Sema 3C muestran un patrón de expresión en el prosencéfalo cercano al nTPOC, por lo que pudieran estar participando en la regulación de la proyección caudal del tracto.

- Por otro lado utilizando hibridaciones *in situ* se describió también la expresión de los receptores Robo1 y Robo 2 en los axones del TPOC.
- Con base en los patrones de expresión obtenidos por hibridación *in situ* de las moléculas Slit, se propone que el sistema Slit-Robo está participando en la regulación de la proyección del TPOC vía sus receptores Robo y por sus ligandos Slit 1 y Slit 2.

XI PERSPECTIVAS

Los cultivos *in vitro* de cerebros completos de embriones en mallas de policarbonato son un sistema que ha permitido con éxito el cultivo y manipulación del tubo neural en desarrollo. Un aspecto importante de estos cultivos es que se mantiene la morfología del embrión, así como la topografía de sus tractos neuronales. En este sistema es posible realizar electroporaciones con vectores de expresión de diversas moléculas guía de tal forma que la expresión ectópica de ellas es útil para valorar el papel que ejercen en la proyección de un tracto en particular (Garda et al, 2001). Se podrá utilizar esta técnica para caracterizar las moléculas involucradas en la proyección caudal del TPOC.

Teniendo como base el patrón de expresión de las moléculas slits y de las semaforinas descrito en el presente trabajo, se proponen como primeros candidatos a electroporarse a las moléculas slit 1, slit 2 y a sema 3A y sema 3C. Tomando en cuenta el papel quimiorreplente de ambas familias de ligandos, una expresión ectópica de estas moléculas en una región caudal al nTPOC obligaría a sus axones a cambiar la dirección de crecimiento, alejándose de la fuente ectópica de las moléculas guía.

Asimismo será necesario establecer los patrones de expresión en el prosencéfalo de otras moléculas quimiotrópicas, para tener una mejor descripción de la zona de proyección del TPOC. Tomando en cuenta la expresión del receptor DCC por una subpoblación de neuronas del TPOC en *Xenopus* (Anderson, Cooper, Jackson, Seaman y Key, 2000) será importante determinar si en la rata, este receptor también se expresa en los axones del TPOC. Asimismo, será necesario definir los patrones de expresión de las netrinas en esta zona, con el fin de determinar si este sistema está participando también en la regulación de la proyección de este tracto. En el caso de que se encontrara un patrón de expresión cercano al tallo óptico, será necesario hacer estudios de electroporación del vector y evaluar su papel trópico sobre el nTPOC.

XII. REFERENCIAS

- Anderson RB y Key B. (1999). Novel guidance cues during neuronal pathfinding in the early scaffold of axon tracts in the rostral brain. *Development* 126, 1859-1868.
- Anderson RB, Cooper HM, Jackson SC, Seaman C y Key B. (2000). DCC plays a role in navigation of forebrain axons across the ventral midbrain commissure in embryonic *Xenopus*. *Developmental Biology* 217, 244-253.
- Anderson RB, Jackson SC, Fujisawa H y Key B. (2000). Expression and putative role of neuropilin-1 in the early scaffold of axon tracts in embryonic brain, *Developmental Dynamics* 219, 102-108.
- Anderson RB, Walz A, Holt CE y Key B. (1998). Chondroitin sulfates modulate axon guidance in embryonic *Xenopus* brain. *Developmental Biology* 202, 235-243.
- Auclair F, Marchand R y Glover JC. (1999). Regional patterning of reticulospinal and vestibulospinal neurons in the hindbrain of mouse and rat embryos. *Journal of Comparative Neurology* 411, 288-300.
- Augsburger A, Schuchardt A, Hoskins S, Doss J y Buttle S. (1999), BMP's as mediators of roof plate repulsion of commissural neurons. *Neuron* 24, 127-141.
- Ba-Charvet KTN, Brose K, Marillat V, Kidd T, Goodman CS, Tessier-Lavigne M, Sotelo C y Chédotal A. (1999). Slit-2 mediated chemorepulsion and collapse of developing forebrain axons. *Neuron* 22, 463-473.
- Bagari AB, Maron O, Plump AS, Mak J, Pleasure SJ, Rubenstein JLR y Tessier-Lavigne M. (2002). Slit proteins prevent midline crossing and determine the dorsoventral position of major axonal pathways in the mammalian forebrain. *Neuron* 33, 233-248.
- Bloch-Gallego E, Ezan F, Tessier-Lavigne M y Sotelo C. (1999). Floor plate and netrin-1 are involved in the migration and survival of inferior olivary neurons. *Journal of Neuroscience* 19, 4407-4420
- Braisted JE, Catalano SS, Stimac R, Kennedy TE, Tessier-Lavigne M, Shatz CJ. Y O'Lery DDM. (2000). Netrin-1 promotes thalamic axon growth and is required for proper development of the thalamocortical projection. *Journal of Neuroscience* 25, 5792-5801.
- Brose K, Bland KS, Wang KH., Arnott D, Henzel W. Goodman CS, 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.

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.

Campbell DS, Regan AG, Lopez JS, Tannahill D, Harris WA y Holt CE. (2001). Semaphorin 3A elicits stage-dependent collapse, turning, and branching in *Xenopus* retinal growth cones. *Journal of Neuroscience* 21, 8538-8547

Canossa M, Griesbeck O, Berninger B, Campana G, Kolbeck R y Thoenen H. (1997). Neurotrophin release by neurotrophins: Implications for activity-dependent neuronal plasticity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 13279-13286.

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 CS 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. *Developmental Biology* 180, 424-432.

Chisholm A y Tessier-Lavigne M. (1999). Conservation and divergence of axon guidance mechanisms. *Current. Opinion in Neurobiology* 9, 603-615.

Cooper AJ y Stanford IM. (2002). Calbindin D-28k positive projection neurons and calretinin positive interneurons of the rat globus pallidus. *Brain Research* 929, 243-251

Davies Alun M. (2000). Neurotrophins: Neurotrophic modulation of neurite growth. *Current Biology* 10, 198-200.

Dennis DM y Wilkinson DG. (1999). Eph receptors and ephrins in general development. *Current. Opinion in Neurobiology* 9, 65-73.

Dodd J, Morton SB, Karagogeos D, Yamamoto M y Jessell TM. (1988). Spatial regulation of axonal glycoprotein expression on subsets of embryonic spinal neurons. *Neuron* 2, 105-116.

Easter Jr SS, Ross LS y Frankfurter A. (1993). Initial tract formation in the mouse brain. *Journal of Neuroscience* 13, 283-299.

Erskine L, Williams SE, Brose K, Kidd T, Rachel RA, Goodman CS, Tessier-Lavigne M y Mason CA. (2000). Retinal ganglion cell axon guidance in the mouse optic chiasm: expression and function of robo and slits. *Journal of Neuroscience* 20, 4975-4982.

Figdor MC y Stern CD. (1993). Segmental organization of embryonic diencephalon, *Nature* 363, 630-634.

Garda AI, Echevarría D y Martínez S. (2001). Neuroepithelial co-expression of Gbx2 and Otx2 precedes *Fgf8* expression in the isthmic organizer. *Mechanical Development* 101, 111-118.

Giger RJ, Cloutier JF, Sahay A, Prinjha RK, Levengood DV, Moore SE, Pickering S, Simmons D., Rastan S, Walsh FS, Kolodkin AL, Ginty DD y Geppert M. (2000). Neuropilin-2 is required in vivo for selective axon guidance responses to secreted semaphorins. *Neuron* 25, 29-41.

Goodman CS. (1994). The likeness of being phylogenetically conserved: Molecular mechanisms of growth cone guidance. *Cell* 78, 353-356.

Götz B, Scholze A, Clement A, Joester A, Schütte, Wigger F, Frank R, Spiess E, Ekblom P y Faissner A. (1996). Tenascin-C contains distinct adhesive, antiadhesive, and neurite outgrowth promoting sites for neurons. *Journal of Cell Biology* 132, 681-699.

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

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

Hamon B, Conde F, Jaillard D, Thomasset M y Crepel F. (1991) In vitro development of rat cerebellar neurons of early embryonic origin. An anatomical and electrophysiological study. *European Journal of Neuroscience* 3, 855-865

Hauptmann G y Gerster T. (2000). Regulatory gene expression patterns reveal transverse and longitudinal subdivisions of the embryonic zebrafish forebrain. *Mechanisms of Development* 91, 105-118.

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. *Journal of Neuroscience* 18, 1998.

Hjorth JT y Key B. (2001). Are pioneer axons guided by regulatory gene expression domains in the zebrafish forebrain? High-resolution analysis of the patterning of the zebrafish brain during axon tract formation. *Developmental Biology* 229: 271-286.

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.

Hotary K.B y Robinson KR. (1994). Endogenous electrical currents and voltage gradients in *Xenopus* embryos and the consequences of their disruption. *Developmental Biology* 166: 789-800.

Imondi R, Wideman Ch y Kaprielian Z. (2000). Complementary expression of transmembrane ephrins and their receptors in the mouse spinal cord: A possible role in constraining the orientation of longitudinally projecting axons. *Development* 127, 1397-1410.

Ip Fanny CF, Cheung J e Ip Nancy Y. (2001). The expression profiles of neurotrophins and their receptors in rat and chicken tissues during development, *Neuroscience Letters* 301, 107-110.

Ishii N, Wadsworth WG, Stern BD, Culotti JG y Hedgecock EM. (1992). UNC-6, a laminin-related protein guides cells and pioneer axon migrations in *C. elegans*. *Neuron* 9, 873-881.

Jinno s y Kosaka T. (2002). Patterns of expression of calcium binding protein and neuronal nitric oxide synthase in different populations of hippocampal GABAergic neurons in mice. *Journal of Comparative Neurology* 449, 1-25

Kanki JP y Kuwada JY. (2000). Growth cones utilize both widespread and local directional cues in the zebrafish brain. *Developmental Biology* 219, 364-372.

Keino-Masu K, Masu M, Hinck L, Leonardo ED, Chan SS, Culotti JG y Tessier-Lavigne M. (1996). Deleted in Colorectal Cancer (DCC) encodes a netrin receptor. *Cell* 87, 175-185.

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

Keynes R y Cook GMW. (1995). Axon guidance molecules. *Cell* 83, 161-169.

Kidd T, Brose K, Mithecell KJ, Fetter RD, Tessier-Lavigne M, Goodman CS y Tear G. (1998). Roundabout control axon crossing of the CNS and defines a novel subfamily of evolutionarily conserved guidance receptors. *Cell* 92, 205-215.

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.

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. *Molecular and Cellular Neuroscience* 15, 123-140.

Livesey FJ., (1999), Netrins and netrins receptors. *Cellular and Molecular Life Sciences* 56, 62-68.

Marillat V, Cases O, Tuyen K, Ba-Charvet N, Tessier-Lavigne M, Sotelo C y Cédotal A. (2002). Spatiotemporal expresión patterns of *slit* and *robo* genes in the rat brain. *Journal of Comparative Neurology* 442, 130-155

Mastick GS, Davis NM, Andrews G y Easter Jr SS, (1997), Pax-6 fuctions in boundary formation an axon guidance in the embryonic mouse forebrain, *Development* 124, 1985-1997.

Mastick GS y Easter Jr. SS. (1996). Initial organization of neurons and tracts in the embryonic mouse fore- and midbrain. *Developmental Biology* 173, 79-94.

McCaig CD, Sangester L y Stewart R. (2000). Neurotrophins enhance electrical field-directed growth cone guidance and directed nerve branching. *Developmental Dynamics* 271, 299-308.

McFarlane S, McNeill L y Holt C. (1995). FGF signaling and target recognition in the developing *Xenopus* visual system. *Neuron* 15, 1017-1028.

Meade CA, Deng YP, Fusco FR, Del Mar N, Hersch S, Goldowitz D y Reiner A. (2002). Cellular localization and development of neuronal intranuclear inclusión in striatal and cortical neurons in R6/2 transgenic mice. *Journal of Comparative Neurology* 449, 241-269

Meyerhardt JA, Caca K, Eckstrand BC, Hu G, Lengauer C, Banavali S, Look AT y Fearon ER. (1999). Netrin-1: Interaction with deleted in colorectal cancer (DCC) and alterations in brain tumors and neuroblastomas, *Cell Growth Differentiation*, 10: 35-42.

Ming G, Henley J, Tessier-Lavinge M, Song H y Poo M. (2001). Electrical activity modulates growth cone guidance by diffusible factors. *Neuron* 29, 441-452.

Miyata S, Khan AM y Hatton GI. (1998). Colocalitation of calretin and calbindin-D 28k with oxytocin and vasopressin in rat supraoptic nucleus neurons: A quantitative study. *Brain Research* 785, 178-182.

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 Journal* 16, 1258-1267.

Nakamura F, Tanaka M, Takahashi T, Kalb RG y Strittmatter SM. (1998). Neuropilin-1 extracellular domains mediate semaphorin D/III-induced growth cone collapse, *Neuron* 21, 1093-1100.

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

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.

Palczewska M, Groves P, Ambrus A, Kaleta A, Kover KE, Batta G y Kuznicki J. (2001). Structural and Biochemical characterization of neuronal calretinin domain I-II (residues 1-100). Comparison to homologous calbindin D28k domain I-II (residues 1-93). *European Journal of Biochemistry* 268, 6229-6237.

Plump AS, Erskine L, Sabatier C, Brose K, Epstein C, Goodman CS, Mason CA y Tessier-Lavigne M. (2002). Slit1 and Slit2 cooperate to prevent premature midline crossing of retinal axons in the mouse visual system. *Neuron* 33, 219-232.

Puelles L, Amat JA y Martínez-de-la-Torre M. (1987). Segmented-related mosaic neurogenetic pattern in the forebrain and mesencephalon of early chick embryos: I. topography of AchE-positive neuroblast up to stage HH18. *Journal of Comparative Neurology* 266, 247-268.

Pujol N, Torregrossa P, Ewbank JJ y Brunet JF. (2000). The homeodomain protein CePHOX2/CEH-17 controls antero-posterior axonal growth in *C. elegans*. *Development* 127, 3361-3371.

Püschel AW, Adams RH y Betz h. (1995). Murine semaphoring D/collapsin is a member of a diverse gene family and creates domains inhibitory for axonal extension. *Neuron* 14, 941-948.

Rajnicek AM, Robinson KR y McCaig CD. (1998). The direction of neurite growth in a weak DC electric field depends on the substratum: Contributions of adhesivity and net surface charge. *Developmental Biology* 203, 412-423.

Raper JA. (2000). Semaphorins and their receptors in vertebrates and invertebrates, *Current Opinion in Neurobiology* 10, 88-94.

Riedel A, Hartig W, Seeger G, Gartner U, Brauer K y Arendt T. (2002) Principles of rat subcortical forebrain organization: a study using histological techniques and multiple fluorescence labeling. *Journal of Chemistry and Neuroanatomy* 23, 75-104

Ringstedt T, Braisted J, Brose K, Kidd T, Goodman C, Tessier-Lavigne M y O'Leary DDM. (2000). Slit inhibition of retinal axon growth and its role in retinal axon pathfinding and innervation patterns in the diencephalon, *Journal of Neuroscience* 20(13): 4983-4991

Rubenstein JLR y Beachy PA. (1998). Patterning of the embryonic forebrain, *Current Opinion in Neurobiology* 8, 18-26.

Rubenstein JLR, Martinez S, Shimamura K y Pulles L. (1994). The embryonic vertebrate forebrain: The prosomeric model. *Science* 266, 578-580.

Rubenstein JLR y Shimamura K. (1997). Regulation of patterning and differentiation in the embryonic vertebrate forebrain. (capítulo 10, pág. 356-390) C. Maxwell, J. Thomas y Z. Lawrence (Eds.) *Molecular and cellular approaches to neural development*, Oxford University Press.

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

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

Serafini T, Kennedy TE, Galko MJ, Mirzayan C, Jessell TM y Tessier-Lavigne M. (1994). The netrins define a family of axon outgrowth-promoting proteins homologous to *C. elegans* UNC-6. *Cell* 78, 409-424.

Shimamura K, Hartigan DJ, Martínez S, Pulles L y Rubenstein JLR. (1995). Longitudinal organization of the anterior neural plate and neural tube. *Development* 121, 3923-3933.

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.

Stein E y Tessier-Lavigne M. (2001). Hierarchical organization of guidance receptors: silencing of netrin attraction by slit through Robo/DCC receptor complex. *Science* 291, 1928-1938

Stoeckli ET y Landmesser LT. (1995). Axonin-1, Nr-CAM and Ng-CAM play different roles in the in vivo guidance of chick commissural neurons. *Neuron* 14, 1165-1179.

Tagmanone L y Comoglio PM. (2000). Signalling by semaphorin receptors: Cell guidance and beyond. *Trends in Cell Biology* 10, 377-383.

Takahashi T, Fournier A, Nakamura F, Wang LH, Murakami Y, Kalb RG, Fujisawa H y Strittmatter SM. (1999). Plexin-neuropilin-1 complexes form functional semaphoring 3A receptors. *Cell* 99, 59-69

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

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

Varela-Echavarría A, Tucker A, Püschel AW y Guthrie S. (1997). Motor axon subpopulations respond differentially to the chemorepellents netrin-1 and semaphorin D. *Neuron* 18, 193-207.

Wang H, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA y Tessier-Lavigne M. (1999). Netrin-3, a mouse homolog of human NTN2L, is highly expressed in sensory ganglia and shows differential binding to netrin receptors. *Journal of Neuroscience* 19, 4938-4947.

Warren N y Price DJ. (1997). Roles of Pax-6 in murine diencephalic development. *Development* 12, 1573-1582.

Wightman B, Clark SG, Taskar AM, Forrester WC, Mariq AV, Bargman CI y Garriga G. (1996). The *C. elegans* gene *vab-8* guides posteriorly directed axons outgrowth and cell migrations. *Development* 122, 671-682.

Winberg ML, Noordermeer JN, Tamagnone L, Comoglio PM, Springg MK, Tessier-Lavigne M y Goodman CS. (1998). Plexin A is a neuronal semaphorin receptor that controls axon guidance. *Cell* 95: 903-916.

Yin Y, Sanes JR y Miner JH. (2000). Identification and expression of mouse *netrin-4*. *Mechanisms of Development* 96, 115-119.

Zinn K y Sun Q. (1999). Slit branches out: A secreted protein mediates both attractive and repulsive axon guidance. *Cell* 97, 1-4.

XIII. INDICICE DE FIGURAS Y TABLAS

		Página
Figura 1	Mecanismos involucrados en la navegación axonal	3
Figura 2	Descripción esquemática de las Semaforinas y sus receptores	6
Figura 3	Estructura de los dominios de las familias de moléculas quimiotrópicas revisadas.	11
Figura 4	Estructura de las receptores de las neurotrofinas	13
Figura 5	Modelo porsomérico de la división del prosencéfalo	18
Figura 6	Esquema de la proyección del TPOC e inmunotinción con calbindina	28
Figura 7	Corte del neuroepitelio utilizado para realizar cultivos bilaterales en geles de colágena	34
Figura 8	Inmunotinción con calbindina, embriones E11.5 y E12.5	49
Figura 9	Inmunotinción con calbindina embriones E13.5 y E14.5	49
Figura 10	Cultivo bilateral y unilateral del nTPOC en geles de colágena	51
Figura 11	Cultivos del nTPOC	52
Figura 12	Cocultivo de la zona retroquiasmática y el nTPOC	53

Figura 13	Inmunotinciones contra Npn-1	54
Figura 14	Hibridación <i>in situ</i> de Sema 3C	55
Figura 15	Hibridaciones <i>in situ</i> de Sema 3A	55
Figura 16	Esquema del patrón de expresión de Sema 3A y Sema 3C	56
Figura 17	Hibridaciones <i>in situ</i> de los receptores Robo	57
Figura 18	Hibridación <i>in situ</i> de Slit 1 y Slit 2	57
Figura 19	Hibridación <i>in situ</i> de Slit 3	58
Figura 20	Esquema del patrón de expresión para las Slits	59
Figura 21	Esquema general de los patrones de expresión	60
Tabla 1	Moléculas con acción quimiotrópica en el SNC	14
Tabla 2	Ejemplos de efectos quimiotrópicos sobre la proyección longitudinal	23
Tabla 3	Moléculas que pudieran estar participando en la regulación de la proyección del TPOC	27
Tabla 4	Enzimas de restricción utilizadas para la linearización del DNA	41

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA