



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

**CONTROL MOLECULAR DE LA
PROYECCIÓN AXONAL EN EL
PROSENCÉFALO EN DESARROLLO**

T E S I S

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

PRESENTA

M. en C. ITZEL RICAÑO CORNEJO

DIRECTOR DE TESIS:
DR. ALFREDO VARELA ECHAVARRIA

JURIQUILLA, QRO., MEX. 2011



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.

AGRADECIMIENTOS

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 todos estos años que ha durado esta aventura.

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

A los miembros de mi jurado de examen la Dra. Diana Escalante, la Dra. Sofía Díaz, el Dr. Enrique Salas, por los comentarios realizados a la redacción de la tesis.

A la Dra Anaid Antaramián, la Dra. Ofelia Mora y a la M. en C. Adriana González por el apoyo en los trabajos de Biología Molecular.

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

Al M en C. Alberto Lara Ruvalcaba y a la Psic. Ma. de Lourdes Lara Ayala por el apoyo técnico en computo y videoconferencias.

A la M. en C. Leonor Casanova Rico, Jefa de la unidad de enseñanza, por su apoyo y organización de mi historial académico.

Al CONACyT por su apoyo económico con la beca número 159568.

Al CONACYT por el apoyo económico del proyecto 101433 y al programa IMPULSA-02 UNAM.

INDICE

	Página
I. Introducción	4
Desarrollo de los principales tractos longitudinales del SNC	5
Mecanismos generales que guían el crecimiento axonal	7
Control molecular de la proyección axonal longitudinal	9
II. Antecedentes	12
El tracto de la comisura postóptica, el TPOC	12
Control molecular de la proyección axonal del TPOC	13
Las proteínas Slit y sus receptores Robo	14
III. Planteamiento del problema	16
IV. Hipótesis	17
V. Objetivo general	17
VI. Objetivos específicos	17
VII. Material y Métodos	19
VIII. Resultados	25
IX. Discusión	41
X. Conclusión General	48
XI. Referencias	49
Apéndice	55

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 proyectan a través de grandes distancias dentro del SNC y la periferia hasta hacer contacto con sus blancos. Estas proyecciones axonales muestran patrones altamente estereotípicos por lo que resulta importante 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. Actualmente se sabe que en el establecimiento de los patrones de proyección axonal se involucra la acción conjunta de diversas moléculas moduladoras las cuales se encuentran conservadas evolutivamente (Goodman, 1994). Entre los factores más conocidos se encuentran el efecto de moléculas quimiotrópicas (Tessier-Lavigne y Goodman, 1996) y el efecto de factores neurotróficos (Davies, 2000). Asimismo, los estudios de las relaciones entre dos o más de estos factores, sugieren que éstos trabajan en conjunto para dirigir a los axones durante su trayectoria en el neuroepitelio hasta su blanco final (Erskine y McCaig, 1997; Ming et al., 2001).

Procesos inductivos crean diferencias moleculares regionales que inician distintos programas de proliferación, migración y diferenciación en diferentes regiones del tubo neural, que dan 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: el rombencéfalo se divide en ocho rombómeras (r1 a r8), el mesencéfalo no sufre divisiones posteriores y

el prosencéfalo se divide en telencéfalo y el diencefalo, que a su vez se dividirá en el hipotálamo y el tálamo.

Durante las primeras etapas del desarrollo embrionario el tubo neural adquiere regionalizaciones moleculares que permiten a las células neuroepiteliales diferenciarse en los distintos tipos celulares nerviosos y de sostén. La especificación de las células en el eje D/V es iniciada por la expresión diferencial de dos factores: la proteína Sonic Hedgehog (Shh) que se secreta en la notocorda y posteriormente en la placa del piso; y proteínas de la superfamilia de los TGF- β , en particular las proteínas morfogenéticas del hueso (BMP's, por sus siglas en inglés) que se expresan en el ectodermo dorsal al tubo neural, y posteriormente en la placa del techo. Estos dos factores se expresan en forma de gradiente e interactúan para instruir la síntesis de diferentes factores de transcripción a lo largo del eje dorso-ventral. A lo largo del eje rostro-caudal se han identificado organizadores transversos que secretan factores morfogenéticos tales como Shh, Wnt-1, y Fgf8 que permiten al tubo neuronal subregionalizarse y así especificar los subtipos celulares. Una vez determinada la identidad celular, las células diferenciadas proyectan sus neuritas a sus blancos y reciben inervación de sus aferencias, iniciando así la formación de la red neuronal característica del cerebro adulto.

Desarrollo de los principales tractos longitudinales del SNC

Se usa el término de "axones pioneros" para los primeros tractos neuronales que inician su proyección axonal abriéndose camino a través del neuroepitelio en estadios muy tempranos en el desarrollo embrionario. Este conjunto de tractos pioneros sirven de andamio o de estructura básica sobre la cual otros tractos neuronales, llamados tardíos, envían sus proyecciones axonales y establecen así su patrón de proyección (Easter y Taylor, 1989; Wilson et al., 1990). En el ratón entre los días gestacionales 8.5 y 9.5 (E8.5 y E9.0) se observan ya los primeros axones inmunoteñidos con anticuerpos anti β -tubulina en la región de la placa alar del mesencéfalo. Sólo un día después, el SNC se ha vuelto un complejo circuito de axones que dificulta su estudio de forma global (Easter et al., 1993),

por lo que esta ventana de tiempo resulta vital durante el estudio de la proyección axonal pionera.

En el ratón se consideran tractos longitudinales pioneros al tracto mesencefálico del nervio trigémino (tmesV, por sus siglas en inglés), al fascículo longitudinal medio (mlf), al tracto de la comisura postóptica (tpoc) y al tracto mamilotegmental (mtt). Aún cuando el tmesV y el mlf inician su proyección en sentido ventral, la elongación principal de sus axones se realiza en dirección longitudinal, por lo que se les clasifica dentro de este rubro. A continuación se presenta una descripción detallada de los tractos pioneros descritos en el ratón.

Durante el estadio E9.0 se encuentran presentes sólo algunos axones del tmesV el cual tiene su núcleo neuronal en la frontera rostral del mesencéfalo. El tracto proyecta en dirección caudal alejándose de la flexura cefálica, creando un tracto dorsomedial. Para el estadio E9.5 se observan proyecciones neuronales del que será el fascículo longitudinal medio (mlf), que tiene su origen neuronal en la región rostral del mesencéfalo. El núcleo neuronal del mlf así como sus axones, se localizan siempre ventral a la proyección del tmesV. En este mismo estadio es posible observar las primeras proyecciones axonales en sentido caudal del tracto de la comisura postóptica (tpoc), cuyo núcleo neuronal se localiza en la base del tallo óptico en la región hipotalámica rostral (Easter et al., 1993).

Para E10.0, el tmesV se encuentra llegando al rombencéfalo a la altura de la rombómera 1. El tpoc se encuentra proyectando en sentido caudal con un patrón curvado paralelo a la flexura cefálica siempre en la región alar del tubo neural. El tracto mamilotegmental (mtt) inicia su proyección en dirección al mesencéfalo y tiene su origen neuronal en la futura región del cuerpo mamilar. Sus proyecciones se establecen en dirección caudal y son siempre ventrales al tpoc. Por ello, se puede concluir que existen dos tractos pioneros longitudinales en el prosencéfalo, el tpoc y el mtt (Easter et al., 1993).

Así para E11.5 se han establecido dos grandes tractos longitudinales en el tubo neural del ratón. El tpoc se ha unido al tmesV en la región mesencefálica formando en conjunto un tracto axonal longitudinal que va de la región más rostral del tubo neural hasta el rombencéfalo. De forma paralela el mtt se une en el mesencéfalo al tracto mlf

estableciendo un camino longitudinal desde la futura región del cuerpo mamilar hasta el rombencéfalo siempre de forma ventral al tracto formado por el tpoC-tmesV (Easter et al., 1993).

Los axones pioneros poseen un papel fundamental en el establecimiento de la arquitectura neuronal del cerebro adulto. En el pez cebra se ha observado que tres tractos envían proyecciones que convergen con el tpoC: (i) el tracto supra óptico (SOT) cuyo origen está situado en el núcleo telencefálico, (ii) el tracto dorsodiencefálico (DVDT) cuyo origen está situado en la epífisis, y (iii) el tracto de la comisura posterior (TPC) que se origina en el núcleo dorsal. En la ausencia del tpoC, estos tractos fallan en establecer su proyección longitudinal normal (Anderson y Key, 1996). En el pollo existe evidencia de que la proyección retículo-espinal se ve afectada cuando se alteran las señales ancladas al sustrato localizadas en el fascículo longitudinal medio (mlf) (Hernández-Montiel et al., 2003), un tracto pionero.

Diversos estudios han revelado que los axones pioneros exhiben una relación espacio-temporal dinámica en relación a las poblaciones de células neuroepiteliales que expresan diferentes agentes reguladores. Se postula que los axones en crecimiento no son guiados por un camino continuo, definido por un solo dominio de células que expresen una molécula reguladora específica, sino que son guiados por diversas señales clave independientes y reguladas por una red compleja de sustratos (Hjorth y Key, 2001; Hernandez-Montiel et al., 2003). 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 determinado que los mecanismos de elongación de las proyecciones axonales se pueden agrupar en 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).

Mecanismos generales que guían el crecimiento axonal

Los factores que guían el crecimiento axonal son diversos. Actúan en conjunto y en etapas precisas del desarrollo estableciendo la arquitectura propia del cerebro adulto.

Entre los factores más conocidos se encuentran el efecto de moléculas guía sobre los conos de crecimiento (Tessier-Lavigne y Goodman, 1996; Davies, 2000; Erskine et al., 2000; Bagri et al., 2002; Hernandez-Montiel et al., 2003; Hernandez-Montiel et al., 2008).

Actualmente se sabe que estas moléculas están involucradas en cuatro tipos generales de señalización: 1) la quimiorrepulsión y 2) la quimioatracción por moléculas secretadas que difunden en el cerebro y cuyo efecto es de largo alcance; y la señalización de corto alcance 3) permisiva o 4) inhibitoria mediada por proteínas ancladas al sustrato como las proteínas de membrana o de matriz extracelular. Ejemplos de moduladores de corto alcance son las moléculas de adhesión celular (CAMs), las efrinas, las semaforinas transmembranales y las moléculas de la matriz extracelular (ECM). Entre los moduladores de largo alcance están las semaforinas secretadas, las Slit, las Netrinas y las BMP's (Tessier-Lavigne y Goodman, 1996; Augsburger et al., 1999). 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-Echavarria et al., 1997; Chisholm y Tessier-Lavigne, 1999).

En la Figura 1 se presentan de forma esquemática las respuestas de una neurita hipotética durante su proyección axonal a estímulos de corto y largo alcance. Tanto las regiones rojas como azules son señales quimiodifusibles que forman gradientes decrecientes de expresión desde su sitio de síntesis, los cuales son detectados por los conos de crecimiento de las neuritas (verde). El axón crece alejándose de la señal quimiorrepelente (azul) y orienta su crecimiento hacia la señal quimioatrayente (rojo). La señal puede ser de corto alcance e inhibitoria para el axón en crecimiento o bien puede constituir una ruta que permita el crecimiento axonal.

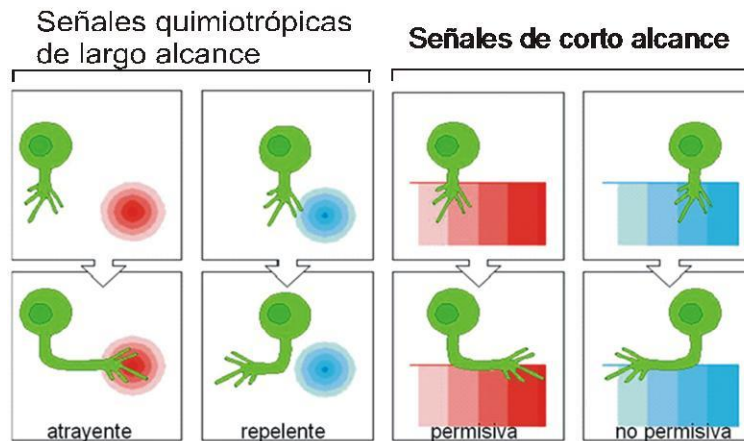


Figura 1. Mecanismos involucrados en la navegación axonal. Los diagramas resumen las señales de largo y de corto alcance que guían a los axones hasta encontrar sus blancos.

Muchos de los mecanismos de señalización involucrados en la guía de los axones en crecimiento se encuentran conservados en 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 génica 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 que presentan patrones de expresión espacio-temporal característicos, y que finalmente permiten a los axones llegar hasta sus células blanco.

Control molecular de la proyección axonal longitudinal

Durante las etapas tempranas del desarrollo embrionario del sistema nervioso central, los axones en crecimiento proyectan en dos direcciones principalmente: una a lo largo del eje dorso-ventral (D/V) del embrión, que corresponde a las proyecciones circunferenciales; y la otra a lo largo del eje anterior-posterior (A/P), y que 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 tubo neural de las diversas especies que se utilizan como modelo en la biología del desarrollo, 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 (Rubenstein et al., 1994; Hjorth y Key, 2001). Este hecho hace que el estudio de los

factores moleculares que guían el crecimiento longitudinal de los axones sea complejo y por ello de relevancia.

El SNC 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 neuritas durante su proyección circunferencial, los mecanismos de proyección axonal a lo largo del eje longitudinal, así como la determinación de la polaridad rostro-caudal de los tractos, han sido poco estudiados. Aún no se entiende en detalle cómo subpoblaciones específicas de axones son guiadas selectivamente a través de puntos críticos recorriendo largas distancias, lo que les permite establecer los primeros tractos durante el desarrollo.

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*, la *zona limitans* y el anillo neural anterior son ejemplos de este tipo de organizadores (Rubenstein et al., 1994; Shimamura et al., 1997; Garda et al., 2001). Por otro lado, basados en experimentos *in vitro* e *in vivo*, diversos grupos de investigación han obtenido evidencia que sugiere la existencia de otras señales localizadas en el substrato de crecimiento, distintas a los organizadores transversos, que brindan direccionalidad y que guían a los axones de distintas poblaciones neuronales a proyectar a lo largo del eje longitudinal. Ejemplos de este proceso son las células dopaminérgicas situadas en el mesencéfalo (Nakamura et al., 2000), las neuronas de la epífisis situadas en la región dorsal también del mesencéfalo (Kanki y Kuwada, 2000) y la región del *istmo* que actúa guiando la proyección de la neuronas reticulares (Hernandez-Montiel et al., 2003).

Asimismo, se han identificado en el ratón factores morfogenéticos que muestran también un rol importante en guiar a diversos grupos neuronales en su camino hasta sus células blanco. Tal es el caso de los genes *Shh* y *Wnt-1* en las neuronas dopaminérgicas en el mesencéfalo (Hammond, Vivancos et al. 2005), *Pax-6* con las neuronas de tracto de la comisura postóptica (Andrews y Mastick, 2003; Nural y Mastick, 2004) y de *Fgf8* sobre las inervaciones talámicas en el área cortical (Shimogori y Grove, 2005).

Sumando a lo anterior existe evidencia de la presencia de señales quimiodifusibles que guían activamente a los axones a lo largo del eje longitudinal. Ejemplos de este tipo de acción en el rombencéfalo son la expresión de las Efrinas que brindan dirección a la proyección longitudinal de los axones longitudinales a lo largo de la médula espinal (Imondi et al., 2000), la expresión del sistema Slit-Robo en la placa del piso, que guía a los axones longitudinales pioneros en el tallo cerebral y los mantiene lejos de la línea media ventral (Mastick et al., 2010) y la acción similar de las Semaforinas que previenen el recruzamiento de los axones en la región ventral de la médula espinal (Zou et al., 2000).

En el mesencéfalo se ha demostrado el papel de la placa del piso guiar a los axones longitudinales a través de las proteínas Slit y sus receptores Robo. La eliminación de la placa del piso altera los patrones de expresión de las Slit en el mesencéfalo y modifica las trayectorias longitudinales, sugiriendo un papel de las Slit en el control de la proyección longitudinal de estos tractos (Farmer et al., 2008).

En el prosencéfalo o cerebro anterior existen pocos trabajos que identifiquen moléculas guía en la proyección de los axones longitudinales de la zona. Uno de ellos es el trabajo realizado por Kasthuber y colaboradores (2009) en el cual mostraron evidencia de la participación de los sistemas de señalización Netrina-DCC, Robo-Slit, y los sulfatos de heparina en el posicionamiento lateral de los axones longitudinales de las neuronas dopaminérgicas diencefálicas. Por otro lado, se ha demostrado la participación del sistema Slit-Robo en el control de la proyección longitudinal de los tractos cortico-fugal, tálamo-cortical y del cuerpo calloso en el prosencéfalo (Bagri et al., 2002; López-Bendito et al., 2007). Sin embargo, aún queda mucho por analizar del papel de las moléculas quimiodifusibles o de las regiones neuroepiteliales en esta área del cerebro.

El reconocimiento de regiones neuroepiteliales del prosencéfalo así como de moléculas guía que estén involucrados en el establecimiento de los patrones de proyección A/P, permitirá tener un mayor conocimiento de los mecanismos moleculares involucrados en el proceso de guía axonal, los cuales hasta ahora no están del todo comprendidos.

II. ANTECEDENTES

El tracto de la comisura postóptica, el TPOC

El 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 (*Mus musculus*) las células que dan origen al tracto, el nTPOC, situadas en la base del tallo óptico, empiezan a proyectar en el estadio E9.5 siguiendo una proyección alrededor de la frontera ventrocaudal del tallo óptico en dirección a la flexura cefálica dando origen así al TPOC. Para E10 los axones del nTPOC pasan el cuerpo mamilar y llegan a la flexura cefálica, extendiéndose hasta la región ventral de la placa alar diencefálica (Nural y Mastick, 2004). Para E11.5, el tracto se ha curvado y proyecta paralelo a la flexura cefálica estableciendo un camino dorsal longitudinal que se extiende desde la región más anterior del embrión hasta el romboencéfalo. En este mismo estadio, el TPOC confluye con el tracto del nervio trigémino (tmesV) en el mesencéfalo (Mastick y Easter, 1996). Por lo anterior el TPOC en el ratón es un tracto dorsal longitudinal que se extiende desde la región más rostral del tubo neural hasta el rombencéfalo (Easter et al., 1993; Mastick y Easter, 1996).

El TPOC es también uno de los primeros tractos que se forma durante el desarrollo del prosencéfalo en otras especies. Está conservado durante la evolución de los vertebrados ya que se presenta en las especies vertebradas estudiadas hasta ahora incluyendo el ratón, el *Xenopus* (Anderson y Key, 1999), el pez cebra (Ross et al., 1992) y el pollo (Chedotal et al., 1995). 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 el *Xenopus* proyecta siempre por la placa basal del embrión (Anderson y Key, 1999); no así en el ratón donde todos los axones pasan dorsalmente al fascículo longitudinal medio (mlf) y se unen con el tracto tmesV en la región alar del embrión (Mastick y Easter 1996). Sin embargo, en todas estas especies el tracto se origina en la región más rostral de la *lámina terminalis* del prosencéfalo y se extiende en dirección longitudinal-caudal hasta el mesencéfalo.

La relevancia del TPOC como un tracto pionero se ha demostrado en *Xenopus* cuando en su ausencia, la proyección del tracto supra óptico (Anderson y Key, 1996) así como de los axones retinales (Taylor, 1991) resulta aberrante. Asimismo, en el pez zebra su ausencia afecta la proyección y elongación de los axones provenientes del núcleo de la comisura posterior en distintos puntos de decisión (Chitnis et al., 1992).

Control molecular de la proyección axonal del TPOC

Se sabe poco sobre los mecanismos moleculares que controlan la proyección longitudinal del TPOC durante el desarrollo embrionario. En *Xenopus* se han descrito los efectos de un exceso de sulfatos de condroitina asociados a proteoglicanos (SPG chondroitin sulfate proteoglycans), en la proyección de los axones del TPOC a través de la línea media ventral. En cultivo, un exceso de los SPG provoca proyecciones dorsales del tracto o que éste continúe proyectando longitudinalmente sin llegar a formar la comisura ventral (Anderson et al., 1998). En esta misma especie, se ha observado que un aumento en los niveles de expresión del receptor Neuropilina-1 (Npn-1) en el TPOC genera errores en este tracto y le impide alcanzar la línea media ventral estableciendo patrones de proyección anormales (Anderson et al., 2000). Sumado a lo anterior, existe evidencia de que la pérdida de las interacciones dependientes de DCC (receptor de las Netrininas) tanto *in vitro* como *in vivo* evita que los axones del TPOC crucen la línea media ventral en el mesencéfalo (Anderson et al., 2000).

En el pez cebra (*Danio rerio*) se ha realizado un estudio extenso sobre la posible correlación entre los patrones de expresión de varios genes de desarrollo temprano y la proyección inicial de los tractos pioneros en el prosencéfalo. En el caso específico del TPOC, al inicio de su proyección cruza dominios celulares que expresan los genes *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). Por otro lado, también en

esta especie se demostró que las interacciones del sistema Slit-Robo son necesarias para un desarrollo normal de los axones longitudinales, incluyendo el TPOC. Mediante experimentos de falta de función de los tres receptores Robo, se encontró que éstos poseen funciones complementarias en la localización dorso-ventral del TPOC (Devine y Key, 2008).

Los patrones de expresión en otros vertebrados de las Slits y Robos en etapas tempranas del desarrollo del prosencéfalo, sugieren también su participación en el control de la proyección del TPOC. En el pollo (*Gallus gallus*), la proteína Slit1 se localiza en la región ventral de prosencéfalo en una región rostral al tallo óptico y a la región que da origen al TPOC (Li et al., 1999). En murinos también se ha caracterizado la expresión de estas moléculas guía en el prosencéfalo pero en estadios posteriores al desarrollo del TPOC (Bagri et al., 2002; Marillat et al., 2002).

Hasta el momento, los estudios realizados con el fin de determinar cuáles son las moléculas que regulan la proyección caudal del TPOC no dejan claro cuál es el mecanismo que controla la proyección de este tracto. Aún son necesarios más estudios con el objetivo de tener un mejor conocimiento de los factores que regulan su proyección principalmente en sus primeras etapas.

Las proteínas Slit y sus receptores Robo

Las proteínas Slit han sido descritas como moléculas quimiorreplentes en una gran variedad de grupos neuronales y de sus axones incluyendo varias poblaciones en el SNC (Brose et al., 1999; Nguyen Ba-Charvet et al., 1999; Erskine et al., 2000; Bagri et al., 2002; Nguyen-Ba-Charvet et al., 2004). Las 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-Lavigne, 1999). En *D. melanogaster*, *C. elegans* y *D. rerio* se conoce sólo una molécula Slit, mientras que tres genes distintos *Slit* han sido identificados en mamíferos expresándose en distintas regiones del SNC (Holmes et al., 1998; Itoh et al., 1998; Brose et al., 1999; Li et al., 1999; Marillat et al., 2002).

Asimismo, se han identificado la expresión de los receptores para las moléculas Slit, los receptores Robo (Lee et al., 2001; Marillat et al., 2002; Camurri et al., 2004; Sundaresan et al., 2004; Lopez-Bendito et al., 2007). Esta familia de receptores muestra una alta conservación en diversas especies ya que se les han encontrado en invertebrados y en vertebrados (Brose et al., 1999; Kidd et al., 1999).

El papel del sistema Slit-Robo como moléculas guía se encuentra bien documentado. 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 (Ypsilanti et al., 2010 ; Chisholm y Tessier-Lavigne, 1999; Zinn y Sun, 1999). La acción repelente de las Slits en la línea media ventral se ha visto conservada evolutivamente ya que este mismo fenómeno se observa en embriones de pollo (Reeber et al., 2008) y de ratón (Zou et al., 2000; Long et al., 2004). Asimismo, su acción como moléculas quimiotrópicas ha sido reportada en diversos grupos axonales como en los axones del bulbo olfatorio (Li et al., 1999), los axones craneales motores (Hammond et al., 2005), y los axones de las neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo ventral (Bagri et al., 2002; Dugan et al., 2011).

Existe evidencia también de la participación de las Slits y los Robo en el cerebro anterior. 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 (Nguyen Ba-Charvet et al., 1999). En el sistema visual se ha caracterizado la función de las proteínas Slits en el posicionamiento y formación del quiasma óptico (Plump et al., 2002). Estudios de pérdida de función de los receptores Robo han proporcionado evidencia de que son necesarios para la proyección correcta de los tractos cortico-espinales y talámo-corticales (Lopez-Bendito et al., 2007); confirmando que la función de estas moléculas guía se encuentra conservada a lo largo del SNC y no sólo está confinada a la médula espinal.

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Debido a que los mecanismos que regulan la proyección axonal longitudinal aún no se encuentran del todo descritos, es necesario identificar modelos de trabajo que nos permitan su estudio. Tomando en consideración que se cuenta con una descripción detallada de la proyección longitudinal del TPOC (Figura 2), a lo largo del desarrollo de varias especies, y que se tienen herramientas metodológicas específicas para su estudio *in vitro*, 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.

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 por investigar al respecto. En este trabajo se estudió la proyección del TPOC enfocándonos en las primeras etapas del desarrollo embrionario del ratón con el objetivo de identificar si el sistema Slit y Robo actúa directamente en el control de la proyección del tracto y establecer si las señales mediadas por Slit y Robo son necesarias para guiar su trayectoria *in vivo*.

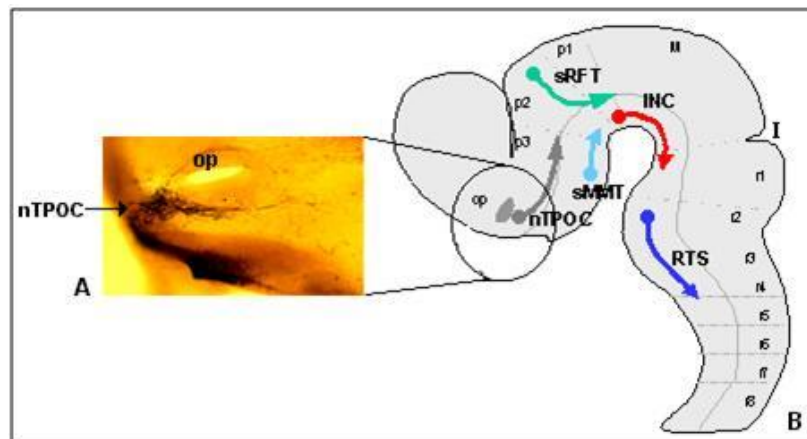


Figura 2. Descripción del sistema de estudio A) Inmunotinción con calbindina D-28K del nTPOC (B) Proyección longitudinal de los primeros núcleos neuronales en el desarrollo embrionario. Abreviaciones: p, prosómeras; r, rombómeros; M, mesencéfalo; op, tallo óptico; I, istmo; RTS, neuronas reticuloespinales; sMMT neuronas del tracto mamilotegmental; INC, neuronas del núcleo intersticial de Cajal; sRFT neuronas del fascículo reticular.

IV. HIPÓTESIS

La señalización mediada por las moléculas quimiotrópicas del sistema Slit-Robo participa en el control de la proyección caudal a lo largo de la ruta longitudinal del tracto de la comisura postóptica, TPOC.

V. OBJETIVOS

Objetivo General

Analizar el papel de las regiones neuroepiteliales del prosencéfalo que controlan la dirección del crecimiento longitudinal del TPOC durante el desarrollo embrionario del ratón a través del estudio del efecto del sistema Slit/Robo sobre la proyección longitudinal del tracto.

Objetivos particulares:

1. Caracterizar la proyección del TPOC durante el desarrollo embrionario del ratón por medio de tinción inmunohistoquímica.
2. Describir los patrones de expresión las de las moléculas quimiotrópicas Slits y Robos en los estadios E9.5 a E11.5 de ratón.
3. Establecer la técnica de cultivo *in vitro* de cerebros completos de embriones de ratón.

4. Estudiar el efecto de la expresión ectópica de las moléculas Slit en la regulación de la proyección del TPOC, mediante electroporación del tejido neural de cerebros completos de embriones de ratón.

5. Evaluar la proyección del TPOC en ausencia de la función de los receptores Robo *in vitro*.

6. Evaluar el efecto de la pérdida de función de *Slit* y *Robo*, sobre la proyección longitudinal del TPOC, mediante el estudio de embriones de ratones nulos (knockout) para estos genes.

VII. MATERIAL Y MÉTODOS

Animales. Se utilizaron ratones CD-1 (*Mus musculus*) de 9.5, 10.5 y 11.5 días de gestación, E9.5, E10 y E11.5 respectivamente. La mañana del día del tapón vaginal se considera como el día embrionario o estadio E0.5 que equivale a 12 horas *post coito*. Los ratones fueron sacrificados mediante dislocación cervical e inmediatamente se realizaron incisiones abdominales para extraer todos los embriones y colocarlos en solución Salina Ringer (Ver apéndice) para mantener el tejido vivo.

La dislocación cervical de los animales se llevó a cabo de acuerdo a 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). Así mismo se tomó en cuenta el documento titulado “The Guide for the Care and Use of Laboratory Animals”, avalado por el Institute of Laboratory Animal Resources, NRC, USA, institución que guía el tratamiento que se les da a los animales de laboratorio.

Inmunohistoquímica de embriones completos. Se utilizaron embriones de ratón E9.5, E10.5 y E11.5 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, St. Louis, MO, EUA) al 3.5%, por al menos dos horas a 37°C, o bien se fijaron toda la noche a 4°C. Las muestras se lavaron durante 24 horas en PBS (ver apéndice I) / Tritón X-100 (JT Baker, 198-07, Deventer, Holanda) al 1% a 4°C, con un mínimo de cuatro cambios, para quitar los residuos de PFA. Después se cambió la solución de lavado por PBS/ Tritón 1% X-100 / H₂O₂ al 0.1% (JT Baker, 2186-01, Deventer, Holanda) y se dejaron en esta solución durante dos horas a temperatura ambiente. Al finalizar se lavaron con PBS/ Tritón 1% X-100 por una hora.

Se preincubaron los embriones en la solución PBS /Tritón 1% X-100/ suero de cabra (Gibco BRL, 2481, Carlsbad, CA, EUA) al 10%, durante tres horas a temperatura ambiente. Al finalizar la preincubación se colocó el anticuerpo primario anti-Calbindina

(conejo, 1:1000; CHEMICON, Millipore, AB1778, Billerica, MA, EUA) durante 72 horas a 4°C, en PBS / Tritón al 1% X-100 / suero de cabra 10%. Al finalizar la incubación con el anticuerpo primario se lavaron los embriones con PBS / Tritón 1% X-100 durante 24 horas a 4°C, con un mínimo de cuatro cambios. Posteriormente se incubaron durante 48 horas a 4°C con el anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa (Jackson ImmunoResearch, 111-036-003, Pensilvania, Philadelphia, EUA), diluido 1:1000 en PBS / Tritón 1% X-100 / suero de cabra 10%. Al finalizar la incubación con el anticuerpo secundario, se lavaron los embriones con PBS /Tritón 1% durante 24 horas a 4°C, con un mínimo de cuatro cambios.

Doble inmunofluorescencia. Se utilizaron embriones de ratón completos E10.5 preservados en PFA al 3.5%, por al menos dos horas a 37°C, o bien se fijaron toda la noche a 4°C. Los embriones fijados se lavaron extensivamente y se crioprotegieron en sacarosa (JT Baker, 4842-07, Deventer, Holanda). Se realizaron cortes transversales secuenciales de 12 µm de grosor que fueron colectados en laminillas. Se marcaron con anticuerpos primarios anti β-tubulina III (ratón, 1:1000, E7, del Developmental Studies Hybridoma Bank, Iowa, IA, EUA) y anti Robo1 policlonal (Long, Sabatier et al., 2004). La detección se llevó a cabo con anticuerpos secundarios marcados con Cy3 y Alexa 483 (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA).

Sistema de cultivo *in vitro* de cerebros de ratón. Se implementó en el laboratorio la técnica de cultivo del tubo neural de embriones de ratón, tomando como base al trabajo reportado por Echevarría et al, 2001. En resumen, las ratonas preñadas fueron sacrificadas por dislocación cervical, los embriones fueron retirados del vientre y colocados en Ringer estéril durante todo el proceso de disección de los tejidos extraembrionarios. Al embrión limpio se le retiraron los arcos branquiales y se cortó coronalmente a la altura de las vesículas óticas. Posteriormente, se abrió a lo largo de la placa del techo y se realizó una incisión en la placa del piso a la altura de la flexura cefálica, de tal forma que el embrión adquiere la forma de un libro abierto.

Finalmente, se colocaron dos embriones en una membrana de policarbonato con la región ventricular hacia arriba. Las membranas fueron colocadas en cajas de cuatro

pozos (una membrana por pozo) con 700 μ l de medio neurobasal suplementado con suero de caballo (GIBCO, 16050-122, Carlsbad, CA, EUA) y con ampicilina (Roche, 835-242, Basel, Suiza), de tal forma que quedaran flotando sobre el medio de cultivo. Las cajas se colocaron en una incubadora a 37°C, en una atmósfera húmeda con 5% de CO₂. Esta técnica muestra alta viabilidad y mantiene a los axones pioneros tales como el fascículo longitudinal medio (mlf) y el tracto mesencefálico del nervio del trigémino (TmesV), proyectando en trayectorias similares a las mostradas *in vivo* (Echevarria et al., 2001).

Hibridación *in situ*. Los patrones de expresión de *Slit1*, *Slit2*, *Robo1* y *Robo2* se determinaron en embriones de ratón CD1 usando sondas marcadas con digoxigenina, obtenidas del laboratorio del Dr. Marc Tessier-Lavigne de la división de Investigación de la compañía Genentech Inc., en el Sur de San Francisco, California, EUA. Para la hibridación se utilizó la técnica modificada de (Wilkinson, 1992).

Se fijaron los embriones de 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 las membranas que recubren el tubo neural. Se realizaron dos lavados con PBT durante 10 minutos cada uno. Después se deshidrató el tejido con lavados en metanol (JT Baker, 9093-03, Deventer, Holanda) al 50% y metanol al 100% durante 10 minutos cada uno. La rehidratación se realizó mediante lavados consecutivos con gradientes descendientes de metanol en PBT al 66%, 50% y 33%. Se realizaron dos lavados con PBT de 10 minutos cada uno para eliminar el metanol. Después se les agregó Proteinasa K (Roche, 1413783, Basel, Suiza) a una concentración final de 10 μ g/ml en PBT durante 20 minutos. Inmediatamente los embriones se postfijaron durante 20 minutos en PFA al 3.5% con glutaraldehído (GTH, Electron Microscopy Sciences, 16310 Hatfield, PA, EUA) al 0.1% en PBT. Se realizaron dos lavados de 10 minutos con PBT, seguidos de un lavado con una solución 1:1 de PBT: mezcla de hibridación durante 10 minutos para después colocarlos en la mezcla de hibridación sola hasta que los embriones se hundieron.

La incubación se realizó en una cámara húmeda con una solución de formamida al 50% (JT Baker; M520-07, Deventer, Holanda) en agua destilada. Finalmente, se añadió

1ml más de la mezcla de hibridación precalentada el cual contenía la sonda (el mRNA antisentido) en un volumen tal que la solución de la sonda fuera 1/20 parte de la reacción de hibridación (8 μ l de la sonda para 2 ml de volumen final). Se dejaron los embriones incubando en la cámara húmeda a 70°C por 3 días. Al término de este tiempo, se realizaron dos lavados con la mezcla de hibridación a 70°C durante 10 minutos seguidos de tres lavados de 1 hora c/u con la mezcla de hibridación a 70°C. Se lavaron los embriones durante 10 minutos con una solución 1:1 de la Mezcla de hibridación y TBST (ver soluciones) a 70°C, seguidos de dos lavados de 10 minutos cada uno y luego dos de 15 minutos cada uno con TBST a temperatura ambiente. Se bloquearon los embriones con una solución de TBST / suero de cabra inactivado al 10% (GIBCO, 1621-0072, Carlsbad, CA, EUA). Se cambió esta solución y se reemplazó por la solución que contiene el anticuerpo anti-digoxigenina 1:2000 y se dejó incubar a 4°C toda la noche.

Se realizaron dos lavados con TBST de 10 minutos cada uno seguidos de cuatro lavados de 1 hora cada uno con 6 ml de TBST. Se reemplazó el TSBT por TBST nuevo y se dejó lavando toda la noche. Al día siguiente se lavó dos veces con NTMT (ver soluciones) durante 10 minutos. Se dejó incubando con una solución que contiene la siguiente mezcla: 1.5 ml de NTMT, 4.5 μ l de NBT (Roche, 1383 213, Basel, Suiza) y 3,5 μ l de BCIP (Roche, 1383 211, Basel, Suiza). Los embriones así tratados se almacenaron en una solución 1:1 de PFA al 3.5% y PBS, a 4°C.

Electroporación ectópica de las moléculas Slit y de delta Robo1. Los embriones de ratón estadio E9.5 fueron retirados del vientre y colocados en solución Ringer estéril durante todo el proceso de disección de los tejidos extraembrionarios y durante la electroporación. Al embrión limpio se le retiraron los arcos branquiales y el exceso de tejido no neural, se le realizó una incisión en la región más caudal del tubo neural para permitir el flujo de líquido en el interior del tubo. El proceso de electroporación se realizó introduciendo el ADN al tubo neural del embrión mediante una microinyección hasta cubrir el prosencéfalo por completo. Después se colocaron los electrodos, el cátodo en el lado derecho y el ánodo en el lado izquierdo del cerebro del ratón en una región caudal al tallo óptico para asegurar la introducción del vector en el tejido neural en la zona de interés. Posteriormente se administraron tres pulsos eléctricos (de 30 V y 50 ms cada uno), con un intervalo de 1s entre cada pulso.

La concentración de ADN utilizada para cada vector fue de 4µg/µl. Se utilizó un colorante verde/azul para visualizar la inyección del ADN al tubo neural (Fast Green, SIGMA, St. Louis, MO, EUA). Después de la electroporación el embrión se cultivó por 48 horas como se ha descrito anteriormente con una incisión en la placa del piso a la altura de la flexura cefálica, de tal forma que el embrión adquiere la forma de un libro abierto. Finalmente, el cultivo se inmunotizó con anticuerpos anti-calbindina para visualizar la proyección del TPOC. Se tomaron fotografías digitales de los cultivos y las distancias de elongación se midieron mediante el programa computacional Corel Draw, tomando como inicio del tracto las primeras neuronas positivas a calbindina y como el final la región más distal del mayor fascículo de las neuritas del TPOC. El análisis matemático de los resultados se realizó con el programa computacional MiniTab (Minitab Inc., State College, PA, EUA). A las muestras se les aplicó un análisis de homogeneidad de varianza y la prueba t-student para determinar si la diferencia de las medias era significativa.

Los vectores de expresión fueron obtenidos del laboratorio del Dr. Yi Rao del Departamento de Anatomía y Neurobiología de la Escuela de Medicina de la Universidad de Washington, EUA. Se trabajó como grupo control un conjunto de embriones electroporados con el vector de expresión para la proteína verde fluorescente (GFP), mientras que el grupo experimental fue electroporado con una mezcla 1:2 de los vectores de expresión.

Estudios de ratones nulos para *Slits/Robo*. Se utilizaron ratones dobles mutantes para *slit1/2* que se obtuvieron de la cruce de heterocigotos *Slit1*^{-/-}; *Slit2*^{+/-} o *Slit1*^{+/-}*Slit2*^{+/-} que se han mantenido mediante cruces de 6 a 10 generaciones. Los ratones mutantes para *Robo1*, *Robo2* y *Robo1/2* se mantuvieron mediante cruces con ratones silvestres CD1. Los embriones fueron genotipados mediante PCR. Los homocigotos silvestres o los heterocigotos obtenidos de las cruces fueron utilizados como controles para el análisis de la proyección. Los embriones fueron sacrificados en el estadio E10.5 y fijados en paraformaldehído al 4% en PBS 0.1 M a 4°C. Las ratones nulos fueron obtenidos con la colaboración del Dr. Marc Tessier-Lavigne de la división de Investigación de la compañía Genentech Inc., en el Sur de San Francisco, California, EUA (Grieshammer et al. 2004;

Long et al. 2004; Lopez-Bendito et al. 2007) y analizados en colaboración con Amy L. Altick del laboratorio del Dr. Grant S. Mastick del Departamento de Biología de la Universidad de Nevada en Reno, EUA.

Para analizar las proyecciones del tracto se utilizó un marcador lipofílico fluorescente Dil, tanto en los embriones mutantes como en los embriones control, como ya se había reportado (Mastick y Easter 1996; Nural y Mastick 2004). Se analizaron el siguiente número de embriones mutantes: *Slit1*^{+/+}; *Slit2*^{+/+}, n=2. *Slit1*^{+/+}; *Slit2*^{+/-}, n=1. *Slit1*^{+/+}; *Slit2*^{-/-}, n=3. *Slit1*^{+/-}; *Slit2*^{+/+}, n=2. *Slit1*^{+/-}; *Slit2*^{+/-}, n=6. *Slit1*^{+/-}; *Slit2*^{-/-}, n=4. *Slit1*^{-/-}; *Slit2*^{+/+}, n=3. *Slit1*^{-/-}; *Slit2*^{+/-}, n=6. *Slit1*^{-/-}; *Slit2*^{-/-}, n=5. *Robo1*^{+/+}; *Robo2*^{+/-}, n=6. *Robo1*^{+/+}; *Robo2*^{-/-}, n=5. *Robo1*^{+/-}; *Robo2*^{+/+}, n=4. *Robo1*^{+/-}; *Robo2*^{+/-}, n=3. *Robo1*^{-/-}; *Robo2*^{+/+}, n=6. *Robo1*^{-/-}; *Robo2*^{-/-}, n=5.

VIII. RESULTADOS

Caracterización de la proyección del TPOC durante el desarrollo embrionario del ratón por medio de tinción inmunohistoquímica

Se realizaron inmunotinciones con anticuerpos anti calbindina en embriones de ratón (*Mus musculus*) en estadios de E9.5 a E11.5. En E9.5 se puede observar la aparición del núcleo neuronal que da origen al TPOC, el nTPOC, en una región rostral y ventral al tallo óptico (datos no mostrados). En E10.0 los axones prosiguen su proyección alrededor de la frontera ventrocaudal del tallo óptico en dirección caudal siguiendo la región alar del tubo neural y han llegado al inicio de la flexura cefálica (Fig. 3A). Para E11.5 el tracto se ha curvado proyectando de forma paralela a la flexura cefálica y se encuentra en el mesencéfalo (Fig. 3B). Estos resultados concuerdan con los ya reportados mediante inmunitinción con anticuerpos anti β -tubulina III y marcadores lipofílicos (Easter et al., 1993; Mastick y Easter, 1996). Estos resultados indican que los anticuerpos para calbindina son un marcador viable de los axones del TPOC en embriones de ratón en los primeros estadios de su proyección.

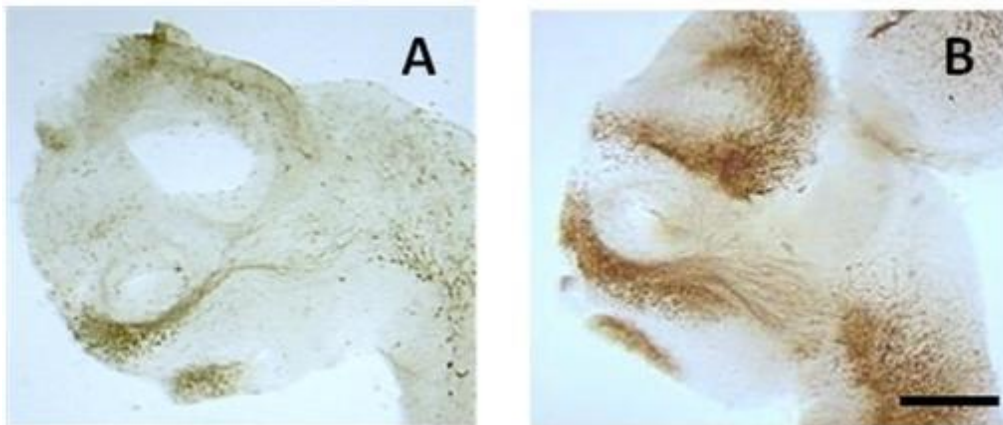


Figura 3. Embriones de ratón inmunoteñidos con anticuerpos anti calbindina. A) Embrión del E10.5, B) Embrión de E11.5. Barra de escala 200 μ m.

Identificación regiones del neuroepitelio que generen moléculas quimiotrópicas capaces de controlar la proyección caudal de los axones del TPOC

Tomando en cuenta el patrón de proyección del TPOC y enfatizando que los axones del mismo nunca invaden regiones basales del tubo neural, se realizaron una serie de experimentos para identificar regiones del neuroepitelio que estuvieran secretando moléculas con efectos quimiotrópicos sobre los axones del TPOC y que su acción en conjunto determinen su patrón de proyección. Con este objetivo se estudiaron los patrones de expresión de moléculas quimiotrópicas involucradas en las proyecciones longitudinales axonales pioneras como las semaforinas, las netrinas y las moléculas Slit.

El primer paso para cumplir este objetivo fue identificar qué receptores a moléculas quimiotrópicas expresa el nTPOC. En la literatura se encuentra reportado que durante los estadios tempranos de desarrollo del ratón (E9.5 a E10.5), no se observa expresión de las netrinas1 y 2 en el prosencéfalo, ni de sus receptores DCC y UNC-5 en la región donde se encuentra el nTPOC (Funato et al., 2000). Por lo que se ha descartado la participación de estas moléculas en el control de la proyección del TPOC en los primeros estadios de desarrollo del ratón.

En *Xenopus*, se ha documentado que 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, sus axones entran a la comisura ventral, pero fallan en cruzar la línea media. Los autores sugieren que los niveles de expresión de Npn-1 de las neuronas del TPOC, son críticos para determinar el lugar dónde estos axones alcanzan la línea media (Anderson, Jackson et al., 2000). Debido a lo anterior realizamos una serie de hibridaciones *in situ* para definir los patrones de expresión de las proteínas de la familia de las Semaforinas solubles (Semas3) ligandos conocidos para las Neuropilinas (Chen et al., 1997; Varela-Echavarria et al., 1997; Nakamura et al., 1998; Raper, 2000; Tamagnone y Comoglio, 2000). Encontramos que ninguna de las Semas se expresa en la región del tallo óptico, salvo Sema3A que se expresa en el estadio E11.5 alrededor del tallo óptico; sin embargo, para este estadio la proyección del TPOC ya ha alcanzado regiones más caudales, por lo que

el patrón de expresión de Sema3A no coincide con el estadio en el cual inicia la proyección del tracto en la rata (datos no mostrados).

Posteriormente se estudiaron los patrones de expresión de los receptores Robo y sus ligandos las Slit, ya que forman parte de un sistema que participa en el control de la proyección de tractos neuronales en el prosencéfalo (Nguyen Ba-Charvet et al., 1999; Erskine et al., 2000; Ringstedt et al., 2000; Bagri et al., 2002). Tres distintos genes *Slit* (*Slit1*, *Slit2*, *Slit3*) y tres distintos genes *Robo* (*Robo1*, *Robo2*, *Robo3*) han sido clonados en mamíferos, pero a la fecha sólo Robo1 y Robo2 han demostrado ser receptores para las Slit en estas especies (Marillat et al. 2002). En las hibridaciones *in situ* para los receptores *Robo*, es posible observar la expresión de ambos genes en los estadios E9.5-E11.5 en la región rostral donde se localiza el tallo óptico (ver Figura 4, cabeza de flecha), la cual co-localiza con la región que da origen al TPOC. Debido a que en etapas iniciales en esa área del prosencéfalo sólo se encuentra el nTPOC en ratón (Easter et al., 1993) podemos sugerir fuertemente que las neuronas del TPOC están expresando los receptores *Robo* (comparar la Figura 3A con la Figuras 4H y 4K).

Para comprobar si los axones del TPOC expresan los receptores Robo se realizó una doble inmunotinción con anticuerpos anti β -tubulina para detectar a los axones (Figura 5A) y anticuerpos anti Robo1 (Figura 5B), en cortes transversales de embriones de ratón E10.5. Obtuvimos una co-localización de ambos anticuerpos en esta región del prosencéfalo en particular en la región donde se localiza el nTPOC (Figura 5C). Lo anterior indica que las neuronas del TPOC expresan los receptores Robo1 y sugiere que responden a la señalización mediada por las proteínas Slits.

Debido a que se encontró que el nTPOC expresa los receptores Robo, se realizaron hibridaciones *in situ* de los genes *Slit1*, *Slit2* y *Slit3* en embriones de ratón. Encontramos que tanto *Slit1*, *Slit2* pero no *Slit3* se expresan en regiones ventrales del prosencéfalo en desarrollo en estadios desde E.9.5 hasta E11.5, con patrones que sugieren su participación en la formación del TPOC (Figura 4). A continuación se brinda una descripción más detallada de los patrones de expresión de estas moléculas:

Slit1. En E9.5 *Slit1* se detecta en regiones ventrales y rostrales del tallo óptico y en un camino continuo desde la región ventral del diencefalo hasta el rombencéfalo (Figura 4A). A lo largo de E10.5 y E11.5 *Slit1* muestra un patrón de expresión que delimita dorsalmente la ruta por la cual proyecta el tracto (Figura 4B y 4C).

Slit2. En E9.5 la expresión de *Slit2* es similar a la de *Slit1* pero ocupando una región más estrecha del neuroepitelio y en una región más ventral. También se puede observar en la región preóptica rostral y dorsal al tallo óptico. Para E10.5 y hasta E11.5 *Slit2* se expresa además en un dominio ventral a lo largo de toda la extensión rostro-caudal del diencefalo. En E11.5 se observa una expresión fuerte alrededor del tallo óptico (Figura 4D-F).

En E9.5 y E10.5 existe una región libre de *Slit2* que coincide con la localización del nTPOC (Figura 4E, cabeza de flecha) entre los dominios preópticos y del diencefalo ventral de este gen. Por lo que este ligando podría estar participando en evitar la proyección del TPOC hacia regiones ventrales del embrión en estadios posteriores del desarrollo, cuando las neuritas del TPOC ya han elongado hasta la flexura cefálica.

Slit3. Desde E9.5 hasta E11.5 *Slit3* no muestra un patrón de expresión en la región del prosencéfalo. Pero fue detectado en una región ventral desde el mesencéfalo hasta la médula espinal (datos no mostrados) como ha sido reportado con anterioridad (Yuan et al., 1999).

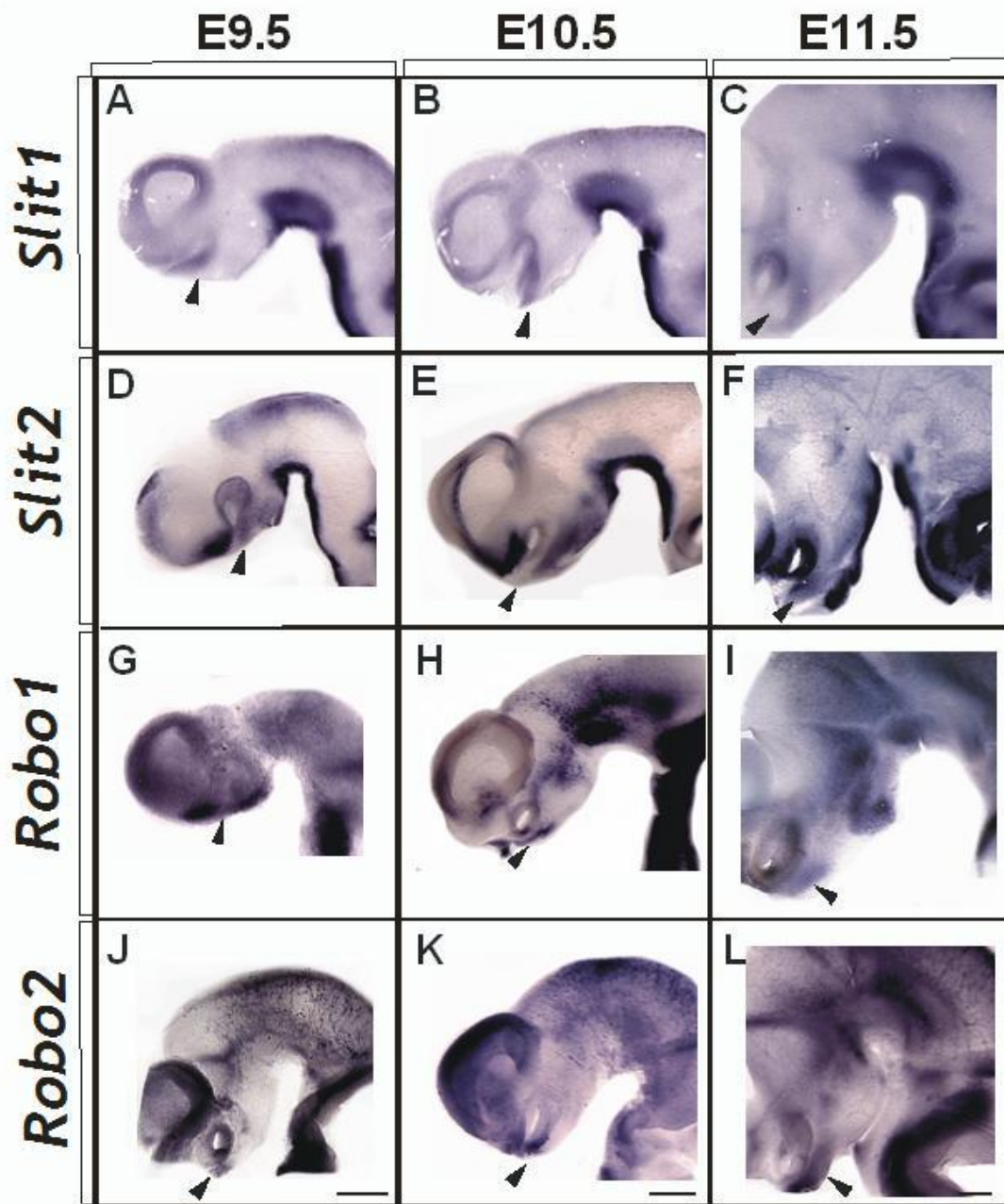


Figura 4. Patrones de expresión de *Slit1*, *Slit2*, *Robo1* y *Robo2* en embriones de ratón. Vista lateral de los embriones. Barra de escala 100 μ m. Cabeza de flecha: región donde se localiza el nTPOC.

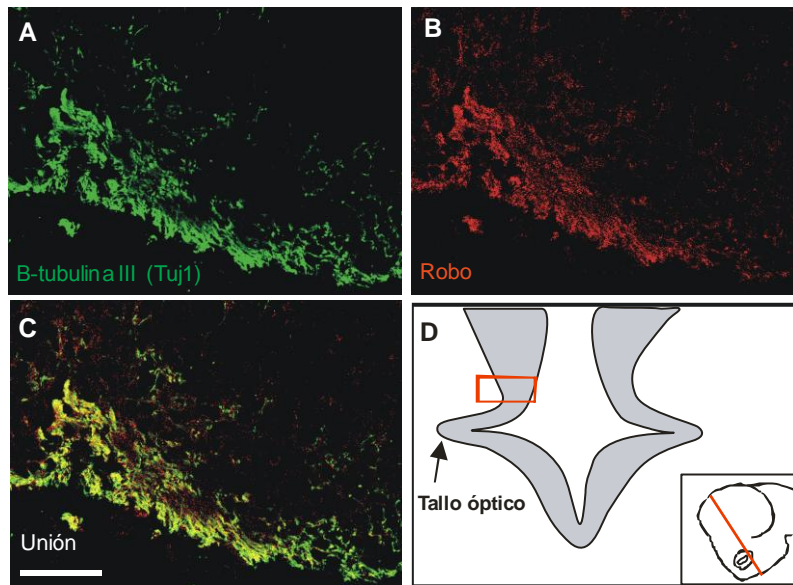


Figura 5. Doble inmunotinción del TPOC en un corte trasversal de embrión de ratón E10.5. A) Tinción con β -tubulina III en verde. B) Tinción con Robo1 en rojo. Barra de escala 50 μ m.

Considerando los patrones de expresión obtenidos para Slit1 y Slit2 propusimos que el papel de estas moléculas sobre las neuritas del TPOC, era el de evitar la proyección ventral y dorsal del tracto en el prosencéfalo, mientras que en específico Slit2 prevendría el crecimiento ventral del tracto en regiones basales del neuroepitelio. Lo anterior sería consistente con el trabajo reportado por Bagri y colaboradores (2002), en el cual proponen que las moléculas Slit participan en evitar que otros tractos en el prosencéfalo, los tractos córtico-fugal y tálamo cortical, crucen la línea media ventral, manteniendo así su posición dorsal.

Desarrollo de un sistema de cultivo *in vitro* de cerebros completos de embriones de ratón

Esta técnica consiste en realizar cultivos del tubo neural completo de embriones de ratón (*Mus musculus*), en membranas de policarbonato por 48 horas. Estos cultivos permiten la visualización del neuroepitelio completo, así como un seguimiento de la dependencia temporal de los cambios que sufre el embrión durante el desarrollo. Asimismo, 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 (Echevarria et al., 2001). Las 48 horas durante las cuales el sistema de cultivo es viable son suficientes para realizar los experimentos que nos lleven a evaluar el papel de las proteínas Slit1 y Slit2 en el control de la proyección del TPOC.

Hemos comprobado que a las 24 y 48 horas de cultivo, se mantiene de forma aceptable la morfología de las principales regiones en las cuales se divide el tubo neural durante su desarrollo, a saber el prosencéfalo, el mesencéfalo y el rombencéfalo. Asimismo, hemos encontrado que la proyección del TPOC en el cultivo sigue una patrón de proyección que es representativo de la reportada durante los primeros estadios del desarrollo del ratón *in vivo* (Easter et al., 1993; Mastick y Easter, 1996). Mediante tinciones inmunohistoquímicas con anticuerpos anti-calbindina hemos observado que la proyección del TPOC mantiene su dirección caudal y que la proyección elonga conforme transcurre el tiempo de cultivo, obteniendo una distancia mayor en los cultivos de 48 horas (Figura 6).

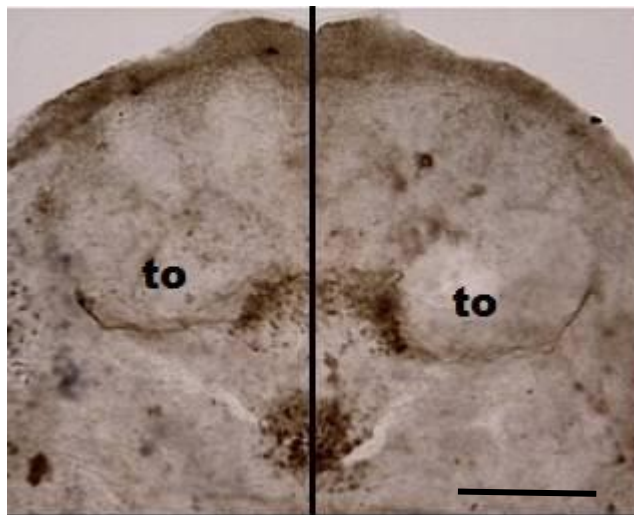


Figura 6. Inmunotinción de un cultivo de 48 horas de un embrión de ratón E9.5. Inmunotinción con anticuerpos anti-calbindina. To, tallo óptico. Barra de escala 200 μ m.

Para comprobar si los patrones de expresión de las *Slit*, en particular *Slit1*, se ven alterados por la manipulación que sufren los embriones al colocarlos en cultivo, y con el fin de establecer si la expresión sigue un patrón similar al que encontramos *in vivo*, se realizaron hibridaciones *in situ* para este gen a las 24 y a las 48 horas de cultivo (Figura 7). Observamos que los patrones de expresión de *Slit1* se conservan en los cultivos de forma

similar a la que encontramos en el embrión completo. A las 48 horas de cultivo aún es posible observar el patrón de expresión de *Slit1* en la región ventral del prosencéfalo, aunque ya se ha perdido un poco la expresión dorsal al tallo óptico. Estos resultados concuerdan con los reportados por Echevarría y colaboradores (2001), quienes analizaron el patrón de expresión de varios genes en este sistema de cultivo y demostraron que mantienen sus patrones de expresión espacio-temporales, indicando que los ejes anterior-posterior y dorso-ventral se mantienen en este tipo de explantes.

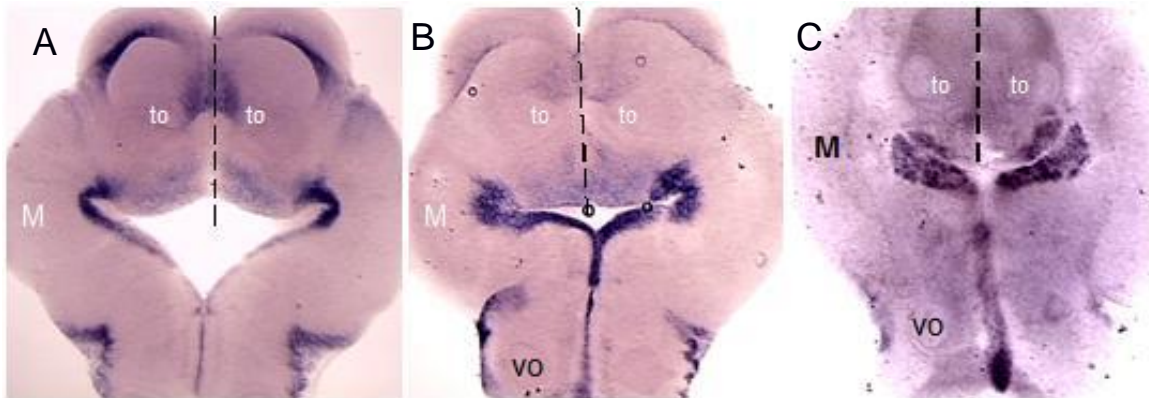


Figura 7. Patrón de expresión de *slit1* en cultivos de encéfalo completo. A) Tiempo cero ratón de E9.5, B) Embrión con 24 horas. de cultivo, C) Embrión con 48 horas de cultivo. La línea punteada indica la línea media ventral del embrión; to, tallo óptico; M, mesencéfalo; vo, vesícula óptica.

Con base en estos datos, podemos concluir que los cultivos de cerebro completo de embriones de ratón, son una técnica viable para el estudio *in vitro* de la proyección inicial de TPOC.

Análisis del efecto de la expresión ectópica de *Slit1* y *Slit2*, en la regulación de la proyección del TPOC en cultivo

Expresión ectópica de *Slit1*. Se realizaron electroporaciones para evaluar el papel de la expresión ectópica de *Slit1* sobre el patrón de proyección del TPOC. Tomando como base los cultivos de tubo neural se electroporó un vector de expresión para la proteína *Slit1* en una región caudal al tallo óptico en la región alar a la altura del hipotálamo ventral donde no hay expresión endógena de este ligando. Así, al iniciar su elongación las neuritas del TPOC, se encontrarán con una región que expresa *Slit1*, y que de acuerdo a su efecto

quimiorrepelente, desviará la dirección de proyección del TPOC o bien detendrá su elongación. Los cultivos se dejaron incubando por 48 horas y posteriormente se inmunotñieron con anticuerpos anti-calbindina para visualizar la proyección del tracto. Se tomaron imágenes de los cultivos y se midió la distancia de elongación mediante un programa computacional.

En una descripción cualitativa de los cultivos control (n=30), no se observan diferencias entre los patrones de proyección del TPOC en el lado no electroporado (izquierdo) en comparación con el lado electroporado solo con GFP (derecho), por lo que la elongación del tracto parece ser simétrica en este grupo. Al medir la distancia de proyección del TPOC entre ambos lados del embrión, encontramos que la media de elongación de las neuritas entre los dos lados no es estadísticamente diferente ($p=0.892$), por lo que concluimos que la manipulación experimental así como la electroporación con GFP no altera la proyección del TPOC en el lado derecho.

En los cultivos experimentales (n=30), aquellos electroporados en el lado derecho con Slit1 y GFP, encontramos que las medias de elongación del TPOC entre el lado derecho (electroporado) y el lado izquierdo, no son estadísticamente diferentes ($p=0.155$). Esto nos indica que la expresión ectópica de Slit1 no altera la elongación de las neuritas del TPOC (Figura 8). Resultados similares se obtuvieron al comparar las medias de elongación del TPOC entre el lado derecho del grupo control (electroporado sólo con GFP) y ese mismo lado pero del grupo experimental (electroporado con Slit1 y GFP).

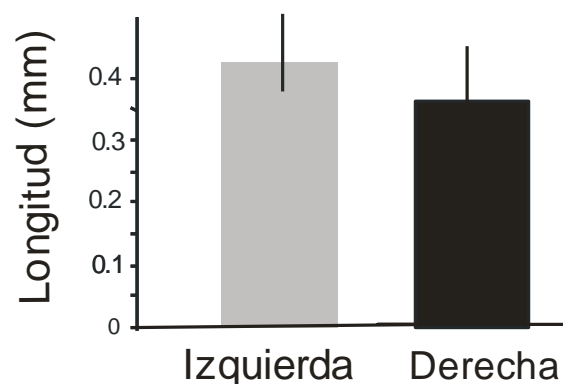


Figura 8. Valor de la media obtenida de la elongación del TPOC en electroporaciones con Slit1. Cultivos experimentales, electroporados en el lado derecho con Slit1:GFP.

Sin embargo, encontramos que en el 20% de los casos (6 embriones de 30), el TPOC proyecta de forma aberrante, extendiendo sus neuritas hacia regiones del neuroepitelio que *in vivo* no invade (Figura 9). Lo anterior muestra evidencia de que si bien Slit1 no afecta la elongación del TPOC, sí afecta en algunos casos el patrón de proyección del tracto.

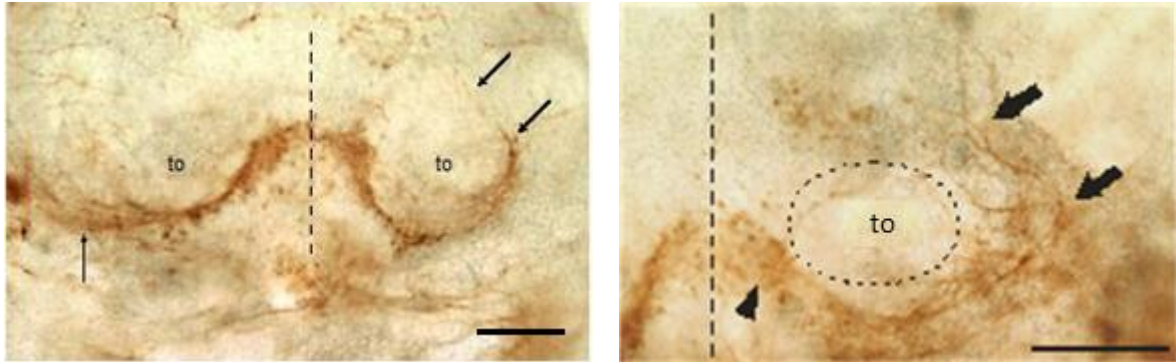


Figura 9. Cultivos electroporados con Slit1 e inmunoteñidos con anticuerpos anti-calbindina. Cultivos electroporados con Slit1 y GFP en el lado derecho. Lado izquierdo grupo control sin electroporación. Las flechas muestran las elongaciones de las neuritas del TPOC, mientras que la línea punteada muestra la localización de la línea media frontal; to, tallo óptico. Barra de escala 200 μ m.

Expresión ectópica de Slit2. Tomando en cuenta que el TPOC expresa los mensajeros para los receptores Robo1 y Robo2 los cuales se unen de manera similar a Slit1 y a Slit2, realizamos electroporaciones también con un vector de expresión de Slit2 en una región ectópica, equivalente a la descrita para Slit1.

En los cultivos control ($n=27$) el TPOC proyecta de forma simétrica a cada lado del tubo neural ($p=0.659$). En los cultivos experimentales se observa una reducción en la elongación de las neuritas del TPOC en el lado derecho electroporado con Slit2, en comparación con las neuritas del lado izquierdo no electroporado. Comparando estadísticamente ambos lados del embrión, encontramos que esta diferencia es significativa ($p=0.02$, Figura 10). Asimismo, al comparar las distancias de la proyección del TPOC entre los lados derechos de los cultivos controles (electroporados sólo con GFP) con respecto a los cultivos experimentales (electroporados con Slit2), encontramos que hay una reducción estadísticamente diferente ($p=0.031$) de la elongación de las neuritas en los cultivos experimentales (no se muestra la gráfica).

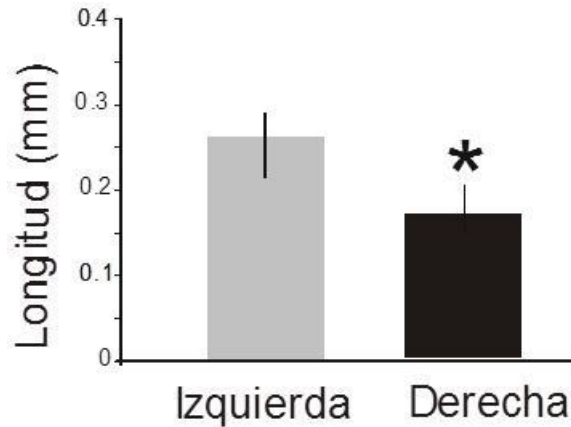


Figura 10. Valor de la media obtenida de la elongación del TPOC en electroporaciones con Slit2. Cultivos experimentales electroporados en el lado derecho con Slit2:GFP.

También hemos observado proyecciones aberrantes en regiones por las que el TPOC no proyecta *in vivo* en un total de 7 de 27 experimentos (Figura 11), lo que sugiere que Slit2 está actuando sobre las neuritas del TPOC reduciendo su elongación y en algunos casos induciendo proyecciones aberrantes del tracto.

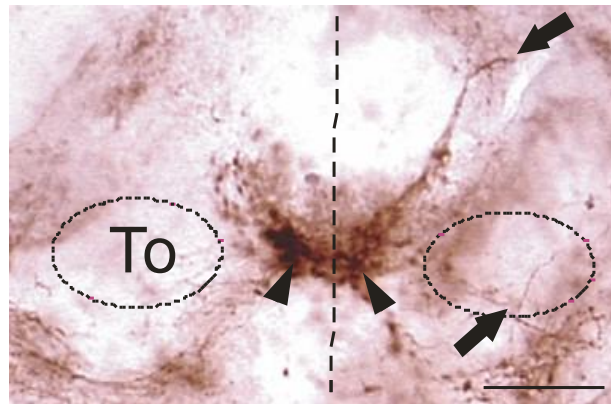


Figura 11. Inmunotinción con calbindina de un cultivo electroporado con Slit1. Las flechas indican la elongación de las neuritas y la línea punteada indica la línea media ventral; To; tallo óptico. La cabeza de flecha indica al nTPOC y las flechas indican la elongación de las neuritas del TPOC. Barra de escala 200 μ m.

Evaluación de la proyección del TPOC en ausencia de la función de los receptores Robo *in vitro*

Para profundizar el estudio del papel del sistema Slit/Robo en el proceso de guiar al TPOC, analizamos el efecto de la expresión de un dominante negativo para el receptor Robo1 (dnRobo1), el cual carece del dominio de transducción de señales. Así, además de evitar la transducción de la señal mediada por Slit, secuestra estas moléculas en los tejidos que rodean la región donde se expresan, evitando su acción sobre las neuritas del TPOC (Liu et al., 2004; Hammond et al., 2005). Este vector de expresión se electroporó en embriones de ratón E9.0 en la región donde se localiza el nTPOC. Cuando comparamos la longitud del TPOC de los cultivos electroporados con dnRobo1 y con GFP no se observaron diferencias significativas en la elongación de las neuritas ($p=0.28$, $n=30$, Figura 12).

Sin embargo, pudimos observar errores de proyección en 6 de los 30 cultivos realizados, similares a los observados con las electroporaciones exógenas de las proteínas Slit1 y Slit2. De forma sorprendente, se encontró que en 9 de los 30 cultivos se puede observar un desplazamiento en sentido dorsal de los cuerpos neuronales del nTPOC y en cuatro de estos cultivos se pueden observar también efectos de errores en la proyección axonal del tracto, un fenotipo nunca observado en el neuroepitelio de los cultivos control (Figura 13).

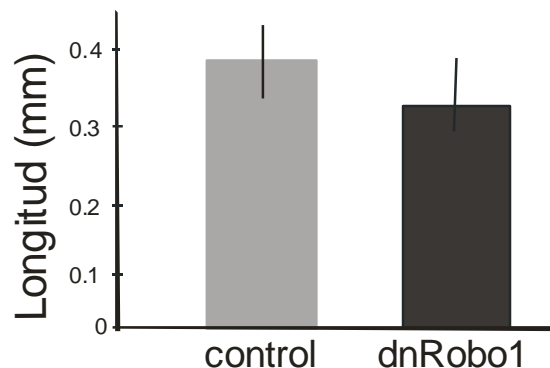


Figura 12. Medias obtenidas de la elongación del TPOC. En cultivos experimentales, electroporados en el lado derecho con dnRobo1: GFP.

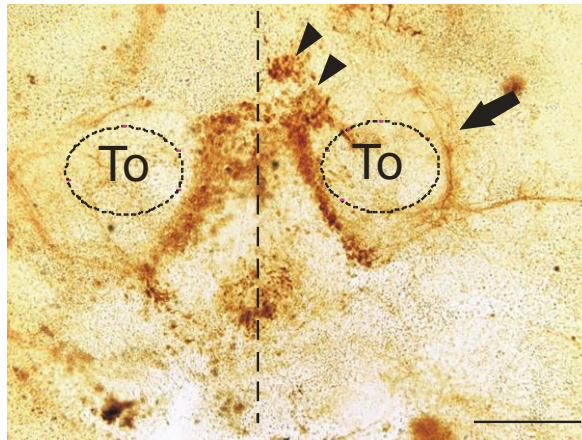


Figura 13. Inmunotinción con calbindina de un cultivo electroporado con dnRobo1 en el nTPOC. Las células del nTPOC se desplazaron en sentido dorsal en el lado electroporado indicadas en con a cabeza de flecha. La elongación aberrante del TPOC está indicada por la flecha completa, la línea punteada indica la línea media ventral To, tallo óptico Barra de escala a 200 μ m.

Evaluación el efecto de la pérdida de función de *Slits* y *Robo*, sobre la proyección longitudinal del TPOC, mediante el estudio de embriones de ratones nulos (knockout) para estos genes.

Este análisis lo llevó a cabo Amy L. Altick del laboratorio del Dr. Grant S. Mastick del Departamento de Biología de la Universidad de Nevada en Reno, EUA. Para evaluar la pérdida de función del sistema Slit-Robo en la proyección del TPOC, se estudiaron embriones de ratones E9.5 a E11 nulos para *Slit1*, *Slit2*, *Robo1* y *Robo2*. Se utilizó un marcado lipofílico Dil en el nTPOC para marcar de forma anterógrada los axones en crecimiento en estos embriones.

Los embriones dobles mutantes homocigotos, que carecen de los cuatro alelos para los receptores Robo, muestran defectos de proyección severos (Figura 14B-F). Las proyecciones iniciales se asemejan a las encontradas en los ratones silvestres, con fibras proyectando en un fascículo compacto a lo largo de la región ventral del tallo óptico y abriéndose un poco conforme proyectan a través del diencéfalo a la altura del tálamo. En los dobles mutantes un subgrupo de axones diverge de forma anormal alrededor del tallo óptico y gira dorsalmente en la región preóptica, como los observados en los cultivos

neuronaes (Figura 14F). Muchos axones del TPOC proyectan en direcció del diencéfalo pero se abren perdiendo la fasciculació del tracto y muestran proyecciones aberrantes en sentido dorsal y ventral (Figura 14D). Otro subgrupo proyecta ventralmente hacia y a través la línea media del hipotálamo (Figura 14E), un fenotipo nunca visto en los ratones silvestres.

Para estudiar la posible acción redundante entre los receptores Robo, mutantes sencillas para cada uno de estos receptores también fueron examinadas. Mientras que la pérdida de *Robo1* genera un patrón similar al del ratón silvestre (Figura 14B), la pérdida de *Robo2* afecta a una fracción de los embriones estudiados (2 de 5) en los cuales el tracto se abre conforme los axones pasan a través del tálamo (Figura 14C). El fenotipo *Robo2*^{-/-} fue menos severo que el observado en los dobles mutantes, ya que no se observaron errores drásticos de proyección alrededor del tallo óptico y hacia la línea media ventral.

También se realizaron marcajes del TPOC en embriones con combinatorias de los alelos para *Robo1* y *Robo2* (n=24), la mayoría de estos embriones muestran un fenotipo similar al del ratón silvestre. Pero en 5 de los 25 individuos, algunos de los axones realizaron proyecciones dorsales alrededor del tallo óptico, sin embargo cabe resaltar que los errores no fueron tan drásticos como los observados en los doble mutantes. Este análisis sugiere que tanto el receptor Robo1 como el Robo2 son suficientes para guiar la proyección del TPOC en su trayectoria más rostral a través del diencéfalo (no se muestran figuras).

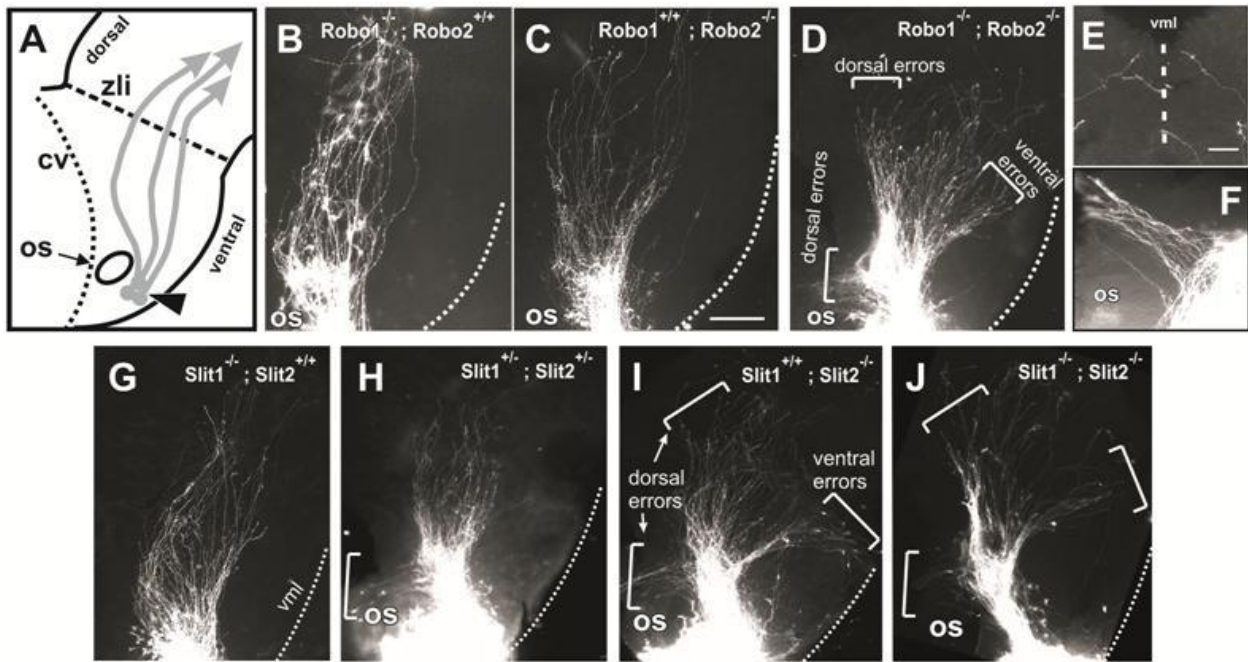


Figura 14. Patrones de proyección del TPOC en ratones nulos para *robo1*, *robo2*, *slit1* y *slit2*. Marcaje con Dil del TPOC en embriones de ratón E10.5-E11. **A)** Diagrama del prosencéfalo anterior (rostral a la izquierda) mostrando la trayectoria del TPOC así como la localización de los cristales del Dil. **B y C)** Mutantes sencillos para *Robo1* y *Robo2*. **D)** Doble mutante para *Robo1/2* mostrando errores en la proyección del TPOC (corchetes) y una proyección menos angosta. **E)** vista de la línea media ventral de un doble mutante para *Robo1/2* donde el TPOC invade la línea media ventral. **F)** vista aumentada de un embrión mostrando proyecciones dorsales alrededor del tallo óptico. **G)** Homocigoto mutante para *Slit1*. **H)** Heterocigoto mutante para *Slit1/2* mostrando proyecciones alrededor del tallo óptico (corchete). **I)** Mutante para *Slit2* que muestra una proyección del TPOC más ancha (corchetes) y se observa de forma bilateral en 2 de los 3 embriones estudiados. **J)** Mutante doble para *Slit1/2* que muestra errores graves de proyección. Os, tallo óptico; vml, línea media ventral. Barra de escala a B-D y G-J a 100 μ m y en E y F a 50 μ m.

Para probar la función de las moléculas Slits en el control de la proyección del TPOC se analizaron embriones nulos de ratón para *Slit1* y *Slit2*, así como un conjunto de ratones con varias combinatorias de estos dos alelos. En general, los mutantes nulos para *Slit1* presentan una proyección normal del TPOC (Figura 14G), mientras que *Slit2* tiene un papel más importante ya que ratones homocigotos con alelos nulos presentan errores de proyección del TPOC (Figura 14I). De forma sinérgica estos errores son más evidentes en ratones doble mutantes para estas proteínas (Fig. 14I, J), donde los axones del TPOC muestran errores de proyección severos proyectando ventral y dorsal a su habitual trayecto de tal forma que el tracto se abre y pierde su fasciculación. En 5/5 mutantes los errores de proyección son similares a los que presentan los ratones dobles mutantes de *Robo1/2*. Asimismo y debido probablemente a los cambio de dirección que presentan estos axones el tracto parece ser más corto en los mutantes dobles de *Slit* que en los

embriones control. En los ratones con combinatorias de los alelos nulos, la penetrancia del fenotipo se reduce y es posible observar estadios intermedios en los errores de proyección, incluyendo proyecciones aberrantes en las regiones dorsales y ventrales (Figura 14H).

IX. DISCUSIÓN

En este estudio se ha presentado evidencia de la expresión y la función de las proteínas Slit y Robo que muestra su participación en el control de la proyección del TPOC en el prosencéfalo. Asimismo mostramos evidencia de que el sistema Sli-Robo determina la posición dorso-ventral de las neuronas que dan origen al TPOC, nTPOC, situadas en la región rostral del tallo óptico. Caracterizamos el patrón de expresión de Slit1 y Slit2 (E9.5-E11.5) en el prosencéfalo rostral del ratón y encontramos que limita la trayectoria del TPOC en regiones alares del diencefalo, evitando la elongación de las neuritas en sentido ventral. Por otro lado se comprobó la expresión de los receptores Robo1 y Robo2 por las neuritas del TPOC mediante hibridación *in situ* e inmunohistoquímica.

Para estudiar el efecto de la acción endógena del sistema Slit-Robo se realizaron electroporaciones de vectores de expresión de Slit1 y Slit2 en embriones de ratón E9.5, encontrando que la expresión ectópica en una región caudal a la proyección del TPOC produce proyecciones aberrantes del tracto en sentido dorsal al tallo óptico así como una disminución en la elongación de las neuritas para el caso de Slit2. Por otro lado, la expresión ectópica de un dominante negativo para el receptor Robo1 (*dnRobo1*) en la región donde se localiza el nTPOC genera errores de proyección, similares a los observados con las electroporaciones exógenas de las proteínas Slit1 y 2. De forma sorprendente, se observó un desplazamiento en sentido dorsal de los cuerpos neuronales del nTPOC un fenotipo nunca observado en el neuroepitelio de los cultivos control.

Mediante la colaboración con Amy L. Altick del laboratorio del Dr. Grant S. Mastick del Departamento de Biología de la Universidad de Nevada en Reno, EUA, se estudió la proyección del TPOC en embriones de ratones E9.5 a E11 nulos para *Slit1*, *Slit2*, *Robo1* y *Robo2*. Se encontró que en los embriones dobles mutantes homocigotos para las *Slits* muestran defectos de proyección en el TPOC el cual va perdiendo su fasciculación. En el caso del doble mutante de los *Robo*, un subgrupo de axones gira dorsalmente en la región preóptica, el resto proyecta en dirección del diencefalo pero se abren mucho perdiendo la fasciculación del tracto.

Patrones de expresión de Slits y Robos en el prosencéfalo y su relación con la proyección longitudinal del TPOC.

Se han realizado esfuerzos por encontrar una correlación entre dominios de expresión de genes de desarrollo temprano y los patrones de proyección de tractos pioneros. Hjorth y Key (2001), obtuvieron patrones de expresión espacio-temporales de diversos genes en la zona del prosencéfalo del pez cebra en desarrollo, con el fin de comparar los dominios de expresión con las rutas por las cuales proyectaban los tractos pioneros en esta especie. No hay evidencia de una relación clara entre los dominios de expresión y las trayectorias de los tractos.

Está reportado que durante los estadios tempranos de desarrollo del ratón (E9.5 a E10.5), no se observan patrones de expresión de las Netrinas, ni de sus receptores (Funato et al., 2000). Por otro lado en experimentos previos hechos en el laboratorio, encontramos que las Semaforinas solubles no muestran patrones de expresión que coincidan en tiempo en la región del prosencéfalo donde se encuentra el nTPOC. Por lo que estas familias de moléculas quimiotrópicas se descartaron para estudios posteriores.

Marillat y colaboradores (2002), estudiaron los patrones de expresión del sistema de señalización Slit-Robo moléculas Slit identificadas en mamíferos, Slit1, Slit2 y Slit3, y los receptores Robo1 y Robo2, encontrando 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, se sabe que el sistema Slit-Robo participa activamente en el desarrollo correcto del sistema visual y olfativo en mamíferos (Li et al., 1999; Erskine et al., 2000; Plump et al., 2002). Este patrón de expresión parece estar conservado ya que *Robo1* y *Robo2* se localiza en estas mismas regiones en etapas iniciales del desarrollo del prosencéfalo del pez cebra (Lee et al., 2001). Asimismo, se ha caracterizado la expresión de este sistema para regular la proyección axonal en el lado ipsilateral del *cerebro embrionario* antes de que crucen la línea media en *D. melanogaster* (Kidd et al., 1998; Guthrie, 2001).

Con los datos de los patrones de expresión *in situ* de las proteínas Slit y Robo encontramos que los dominios de expresión de Slit1 y Slit2 delimitan la trayectoria del

TPOC durante su proyección a lo largo de esta región en E9.5-E11. Asimismo, *Slit2* se expresa en la región ventral del diencéfalo limitando la proyección de las neuritas en este dominio de expresión. Estos hechos concuerdan de forma general con los reportados en el ratón y en el pollo (Holmes et al., 1998; Li et al., 1999). Los mRNAs de *Robo1* y *Robo2* se detectaron en embriones de ratón en la región del neuroepitelio que contienen a nTPOC, patrón que se observa también en el pez cebra (Lee et al., 2001). Así, las proteínas Slit estarían limitando la proyección del TPOC en el prosencéfalo de ratón en desarrollo, impidiendo la proyección ventral de éste, mecanismo similar al que se ha descrito para Slit1 en el tálamo en desarrollo (Bagri et al., 2002).

Existe evidencia en la literatura de la participación de otras moléculas en el proceso de guiar al TPOC por su trayectoria en el prosencéfalo. El patrón de proyección del TPOC depende de otras moléculas como el gen morfogenético *Pax6* y la proteína R-caderina. En los embriones de ratón mutantes para *Pax6*, el TPOC proyecta hacia el tálamo ventral y falla en establecer su trayectoria normal. La parte proximal del tracto se observa muy fasciculada y se va abriendo en la región caudal del tallo óptico. Sin embargo, se observan algunos errores de proyección en sentido dorsal alrededor del tallo óptico e incluso dentro de la vesícula cerebral. Muchos de estos axones formaron horquillas y vueltas inesperadas. Más aun, en algunos casos axones entraron en territorios ventrales (Mastick et al. 1997).

Debido a que *Pax6* es un gen morfogenético importante para el establecimiento de esta zona, se analizó su efecto sobre a la expresión de proteínas quimiotrópicas. Se encontró que la expresión alterada de las R-caderinas en ratones mutantes para *Pax6* parece ser la responsable de algunos de los errores de proyección del TPOC descritos anteriormente (Andrews y Mastick, 2003; Nural y Mastick, 2004). Así, además de regular la expresión de las R-caderinas y otros miembros de la misma familia que han sido relacionados con la función de los receptores Robo (Rhee et al., 2002), *Pax6* podría estar regulando algunos aspectos de la señalización Slit-Robo, en particular en regiones caudales de la proyección del tracto.

En etapas posteriores del desarrollo del ratón, en particular en el estadio E15, el TPOC expresa las moléculas de adhesión celular L1 y PSA-NCAM, las cuales participan

en la fasciculación de axones provenientes de las fibras ópticas al TPOC (Chung et al., 2004). 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 (Varela-Echavarría et al., 1997; Zou et al., 2000; Plump et al., 2002; Hernández-Montiel et al., 2008). Lo anterior no es de sorprenderse, ya que es necesaria la acción de varios sistemas redundantes con el fin de asegurar la correcta proyección de los tractos neuronales durante el desarrollo.

Modificación *in vitro* de la expresión *Slit1* y *Slit2*, en la regulación de la proyección del TPOC en cultivo

Sumado a los patrones de expresión del sistema Slit y Robo que sugieren su participación en el control de la proyección del TPOC, en el laboratorio se ha demostrado que las neuritas del nTPOC responden a la proteína Slit1 y Slit2 en cultivos de colágena. Tomando en cuenta lo anterior, realizamos modificaciones de los patrones de expresión de los genes *Slit1* y *Slit2* en cultivo. Lo que observamos fue que la expresión ectópica de *Slit1* y *Slit2* en un dominio perpendicular a la proyección del TPOC induce errores de proyección de las neuritas alejándose de la fuente de expresión de las Slits alrededor de la región caudal del tallo óptico, fenómeno no visto en los cultivos control. Asimismo, en el caso de los cultivos con *Slit2* exógeno, se observó una disminución de la elongación de las neuritas.

Estos hallazgos son evidencia de que los axones del TPOC son capaces de responder a la señalización mediada por *Slit1* y *Slit2*. Los resultados muestran que Slit1 y Slit2 participan en el posicionamiento dorso-ventral del TPOC durante su proyección inicial, delimitando la región por la cual puede elongar e impidiendo la proyección hacia regiones ventrales y dorsales. Un mecanismo similar de posicionamiento dorso-ventral se ha descrito para otros tractos longitudinales principales del prosencéfalo en desarrollo tales como el tracto-corticofugal, cortico-talámico, el cuerpo calloso, el tracto cortico-espinal, el tálamo-cortical, el tracto lateral olfatorio, así como algunos tractos hipocampales (Nguyen Ba-Charvet et al., 1999; Bagri et al., 2002; Nguyen-Ba-Charvet et al., 2002; Lopez-Bendito et al., 2007).

Algunos de estos tractos como el cortico-talámico, cortico-espinal y el tálamo-cortical se enciman y siguen al TPOC en su trayectoria, sugiriendo que el TPOC funciona como un andamio para ellos. Algunos de los defectos de proyección que se observan en los estudios de estos tractos pueden ser secundarios a errores en la trayectoria del TPOC, pero que no fueron analizados en los artículos mencionados.

Tomando en cuenta que el patrón de expresión de las proteínas Slit delimita la región por donde proyecta el TPOC, que las neuronas del nTPOC expresan el receptor Robo1, que el nTPOC reacciona a las proteínas Slit y que la electroporación ectópica de los ligandos Slit produce proyecciones aberrantes del TPOC, proponemos un modelo en el cual las moléculas Slit participan en evitar que las neuritas del TPOC proyecten en sentido ventral y dorsal en relación al nTPOC, estableciendo así la proyección característica de este tracto en las prosómeras más rostrales. Este hallazgo es congruente con la idea propuesta por Bagri y colaboradores (2002), respecto a que las moléculas Slit participan en evitar la proyección en dirección ventral de tractos tardíos en el prosencéfalo, haciendo que éstos siempre mantengan sus proyecciones por las regiones dorsales del encéfalo.

Proyección del TPOC en ausencia de la función de los receptores Robo

La expresión de un dominante negativo del receptor Robo1, dnRobo1, en la región del nTPOC causa proyecciones aberrantes del tracto hacia regiones dorsales en el extremo caudal del tallo óptico. Este efecto es similar al encontrado en el desarrollo del rombencéfalo del pollo donde la expresión de dominantes negativos para *Robo* generó que en las neuronas motoras craneales proyectaran hacia la línea media ventral (Hammond et al., 2005). Cabe mencionar, que en los cultivos estudiados no se observaron proyecciones de las neuritas en dirección ventral en el diencéfalo. Esto podría deberse a la presencia de una actividad residual del receptor Robo1 y a la presencia del receptor Robo2, el cual no fue manipulado en estos experimentos. Sumado a lo anterior, en los cultivos de embriones completos de ratón en presencia de quimeras Robo1/2-Fc para bloquear la señalización Robo/Slit, se observó que los axones del TPOC proyectan de

forma anormal alrededor del tallo óptico dirigiéndose en dirección dorsal. Así, los resultados obtenidos por la M. en C. Claudia García Peña en el laboratorio confirman la acción de las Slit directamente sobre el control de la proyección del TPOC.

De forma sorprendente la expresión del dnRobo1 causó un desplazamiento del nTPOC en dirección dorsal al tallo óptico en un tercio de los cultivos analizados. Esa región muestra una expresión fuerte de Slit2 en el estadio E9.5 (Figura 4D,E). Esto sugiere que la expresión del receptor y la acción de Slit2 permiten el posicionamiento dorso-ventral del nTPOC en el tallo óptico. Consistente con estos resultados se ha encontrado que las moléculas Slit y Robo participan en el posicionamiento de las neuronas colinérgicas en el telencéfalo basal del ratón (Marin et al. 2003) y en otros grupos neuronales de embriones de *Drosophila* (Kraut y Zinn, 2004; Santiago-Martínez et al., 2006).

El sistema Slit1 y Slit2 son necesarios para guiar la proyección del TPOC

El análisis de la proyección del TPOC en embriones mutantes para el sistema Slit/Robo realizada por Amy L. Altick del laboratorio del Dr. Grant S. Mastick del Departamento de Biología de la Universidad de Nevada en Reno, muestra que en los embriones mutantes para *Robo1* y *Robo2* el tracto se desfascicula de forma amplia. Asimismo, se observan proyecciones aberrantes hacia la región del hipotálamo ventral que incluso llegan a cruzar la línea media ventral. También se observa que algunos de los axones proyectan de forma dorsal alrededor de la región caudal del tallo óptico, fenotipos que nunca se presentan en los embriones silvestres.

El estudio de los embriones mutantes para *Slit1* y *Slit2* reveló fenotipos similares a los observados en los mutantes *Robo*. De hecho, estos fenotipos se observan incluso en los ratones nulos para Slit2, aunque con un nivel de penetrancia menor. Lo anterior sugiere un papel predominante de Slit2 sobre el control de la proyección del TPOC. Debido a que no se observan anomalías en la proyección del tracto en los ratones nulos simples para *Robo1* o *Robo2*, concluimos que la actividad de los receptores es redundante. Estos resultados van de acuerdo con los estudios realizados por Devine y Key (2008), en el pez cebra en el cual analizan el papel de la señalización mediada por Slit-

Robo sobre el control de la proyección axonal longitudinal. En este estudio se demuestra que los receptores Robo son necesarios para mantener la proyección fasciculada del TPOC y que el sistema Slit-robo participa en el posicionamiento dorso-ventral del tracto.

X. CONCLUSIÓN GENERAL

En conclusión se ha presentado evidencia que relaciona a las proteínas Slit1 y Slit2 y a los receptores Robo1 y Robo2 en el control de la proyección del TPOC. Los datos aquí presentados sugieren que en el prosencéfalo rostral las proteínas Slit limitan la región por la cual pueden proyectar los axones del TPOC especificando una posición dorso ventral del tracto. Nuestros resultados muestran que tanto Slit1 como Slit2 participan en el posicionamiento dorso-ventral del TPOC durante su proyección inicial, canalizándolo en un camino muy definido y directo en sentido caudal e impidiendo su elongación a áreas dorsales y ventrales del prosencéfalo en desarrollo. Dado el carácter pionero de esta proyección, es probable que este mecanismo de guía axonal tenga relevancia en la proyección de otros grupos axonales que crecen sobre esta vía.

XI. REFERENCIAS

- Anderson, R. B., H. M. Cooper, et al. (2000). DCC plays a role in navigation of forebrain axons across the ventral midbrain commissure in embryonic xenopus. Dev Biol. **217**: 244-53.
- Anderson, R. B., S. C. Jackson, et al. (2000). "Expression and putative role of neuropilin-1 in the early scaffold of axon tracts in embryonic Xenopus brain." Dev Dyn **219**(1): 102-8.
- Anderson, R. B. y B. Key (1996). "Expression of a novel N-CAM glycoform (NOC-1) on axon tracts in embryonic Xenopus brain." Dev Dyn **207**(3): 263-9.
- Anderson, R. B. y B. Key (1999). "Novel guidance cues during neuronal pathfinding in the early scaffold of axon tracts in the rostral brain." Development **126**(9): 1859-68.
- Anderson, R. B., A. Walz, et al. (1998). "Chondroitin sulfates modulate axon guidance in embryonic Xenopus brain." Dev Biol **202**(2): 235-43.
- Andrews, G. L. y G. S. Mastick (2003). "R-cadherin is a Pax6-regulated, growth-promoting cue for pioneer axons." J Neurosci **23**(30): 9873-80.
- Augsburger, A., A. Schuchardt, et al. (1999). "BMPs as mediators of roof plate repulsion of commissural neurons." Neuron **24**(1): 127-41.
- Bagri, A., O. Marin, et al. (2002). "Slit proteins prevent midline crossing and determine the dorsoventral position of major axonal pathways in the mammalian forebrain." Neuron **33**(2): 233-48.
- Brose, K., K. S. Bland, et al. (1999). "Slit proteins bind Robo receptors and have an evolutionarily conserved role in repulsive axon guidance." Cell **96**(6): 795-806.
- Camurri, L., E. Mambetisaeva, et al. (2004). "Rig-1 a new member of Robo family genes exhibits distinct pattern of expression during mouse development." Gene Expr Patterns **4**(1): 99-103.
- Chedotal, A., O. Pourquie, et al. (1995). "Initial tract formation in the brain of the chick embryo: selective expression of the BEN/SC1/DM-GRASP cell adhesion molecule." Eur J Neurosci **7**(2): 198-212.
- Chen, H., A. Chedotal, et al. (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**(3): 547-59.
- Chisholm, A. y M. Tessier-Lavigne (1999). "Conservation and divergence of axon guidance mechanisms." Curr Opin Neurobiol **9**(5): 603-15.

- Chitnis, A. B., C. K. Patel, et al. (1992). "A specific brain tract guides follower growth cones in two regions of the zebrafish brain." J Neurobiol **23**(7): 845-54.
- Chung, K. Y., K. M. Leung, et al. (2004). "Regionally specific expression of L1 and sialylated NCAM in the retinofugal pathway of mouse embryos." J Comp Neurol **471**(4): 482-98.
- Davies, A. M. (2000). "Neurotrophins: neurotrophic modulation of neurite growth." Curr Biol **10**(5): R198-200.
- Devine, C. A. y B. Key (2008). "Robo-Slit interactions regulate longitudinal axon pathfinding in the embryonic vertebrate brain." Dev Biol **313**(1): 371-83.
- Dugan, J. P., A. Stratton, et al. (2011). "Midbrain dopaminergic axons are guided longitudinally through the diencephalon by Slit/Robo signals." Mol Cell Neurosci **46**(1): 347-56.
- Easter, S. S., Jr., L. S. Ross, et al. (1993). "Initial tract formation in the mouse brain." J Neurosci **13**(1): 285-99.
- Easter, S. S., Jr. y J. S. Taylor (1989). "The development of the Xenopus retinofugal pathway: optic fibers join a pre-existing tract." Development **107**(3): 553-73.
- Echevarria, D., C. Vieira, et al. (2001). "Mammalian neural tube grafting experiments: an in vitro system for mouse experimental embryology." Int J Dev Biol **45**(8): 895-902.
- Erskine, L. y C. D. McCaig (1997). "Integrated interactions between chondroitin sulphate proteoglycans and weak dc electric fields regulate nerve growth cone guidance in vitro." J Cell Sci **110 (Pt 16)**: 1957-65.
- Erskine, L., S. E. Williams, et al. (2000). "Retinal ganglion cell axon guidance in the mouse optic chiasm: expression and function of robos and slits." J Neurosci **20**(13): 4975-82.
- Farmer, W. T., A. L. Altick, et al. (2008). "Pioneer longitudinal axons navigate using floor plate and Slit/Robo signals." Development **135**(22): 3643-53.
- Funato, H., Y. Saito-Nakazato, et al. (2000). "Axonal growth from the habenular nucleus along the neuromere boundary region of the diencephalon is regulated by semaphorin 3F and netrin-1." Mol Cell Neurosci **16**(3): 206-20.
- Garda, A. L., D. Echevarria, et al. (2001). "Neuroepithelial co-expression of Gbx2 and Otx2 precedes Fgf8 expression in the isthmic organizer." Mech Dev **101**(1-2): 111-8.
- Goodman, C. S. (1994). "The likeness of being: phylogenetically conserved molecular mechanisms of growth cone guidance." Cell **78**(3): 353-6.
- Grieshammer, U., M. Le, et al. (2004). "SLIT2-mediated ROBO2 signaling restricts kidney induction to a single site." Dev Cell **6**(5): 709-17.

- Guthrie, S. (2001). "Axon guidance: Robos make the rules." Curr Biol **11**(8): R300-3.
- Hammond, R., V. Vivancos, et al. (2005). "Slit-mediated repulsion is a key regulator of motor axon pathfinding in the hindbrain." Development **132**(20): 4483-95.
- Hernandez-Montiel, H. L., E. Melendez-Herrera, et al. (2003). "Diffusible signals and fasciculated growth in reticulospinal axon pathfinding in the hindbrain." Dev Biol **255**(1): 99-112.
- Hernandez-Montiel, H. L., E. Tamariz, et al. (2008). "Semaphorins 3A, 3C, and 3F in mesencephalic dopaminergic axon pathfinding." J Comp Neurol **506**(3): 387-97.
- Hjorth, J. T. y B. Key (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." Dev Biol **229**(2): 271-86.
- Holmes, G. P., K. Negus, et al. (1998). "Distinct but overlapping expression patterns of two vertebrate slit homologs implies functional roles in CNS development and organogenesis." Mech Dev **79**(1-2): 57-72.
- Imondi, R., C. Wideman, et al. (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**(7): 1397-410.
- Itoh, A., T. Miyabayashi, et al. (1998). "Cloning and expressions of three mammalian homologues of Drosophila slit suggest possible roles for Slit in the formation and maintenance of the nervous system." Brain Res Mol Brain Res **62**(2): 175-86.
- Kanki, J. P. y J. Y. Kuwada (2000). "Growth cones utilize both widespread and local directional cues in the zebrafish brain." Dev Biol **219**(2): 364-72.
- Kastenhuber, E., U. Kern, et al. (2009). "Netrin-DCC, Robo-Slit, and heparan sulfate proteoglycans coordinate lateral positioning of longitudinal dopaminergic diencephalospinal axons." J Neurosci **29**(28): 8914-26.
- Kidd, T., K. S. Bland, et al. (1999). "Slit is the midline repellent for the robo receptor in Drosophila." Cell **96**(6): 785-94.
- Kidd, T., K. Brose, et al. (1998). "Roundabout controls axon crossing of the CNS midline and defines a novel subfamily of evolutionarily conserved guidance receptors." Cell **92**(2): 205-15.
- Kraut, R. y K. Zinn (2004). "Roundabout 2 regulates migration of sensory neurons by signaling in trans." Curr Biol **14**(15): 1319-29.
- Lee, J. S., R. Ray, et al. (2001). "Cloning and expression of three zebrafish roundabout homologs suggest roles in axon guidance and cell migration." Dev Dyn **221**(2): 216-30.

Li, H. S., J. H. Chen, et al. (1999). "Vertebrate slit, a secreted ligand for the transmembrane protein roundabout, is a repellent for olfactory bulb axons." Cell **96**(6): 807-18.

Liu, Z., K. Patel, et al. (2004). "Extracellular Ig domains 1 and 2 of Robo are important for ligand (Slit) binding." Mol Cell Neurosci **26**(2): 232-40.

Long, H., C. Sabatier, et al. (2004). "Conserved roles for Slit and Robo proteins in midline commissural axon guidance." Neuron **42**(2): 213-23.

Lopez-Bendito, G., N. Flames, et al. (2007). "Robo1 and Robo2 cooperate to control the guidance of major axonal tracts in the mammalian forebrain." J Neurosci **27**(13): 3395-407.

Marillat, V., O. Cases, et al. (2002). "Spatiotemporal expression patterns of slit and robo genes in the rat brain." J Comp Neurol **442**(2): 130-55.

Marin, O., A. S. Plump, et al. (2003). "Directional guidance of interneuron migration to the cerebral cortex relies on subcortical Slit1/2-independent repulsion and cortical attraction." Development **130**(9): 1889-901.

Mastick, G. S., N. M. Davis, et al. (1997). "Pax-6 functions in boundary formation and axon guidance in the embryonic mouse forebrain." Development **124**(10): 1985-97.

Mastick, G. S. y S. S. Easter, Jr. (1996). "Initial organization of neurons and tracts in the embryonic mouse fore- and midbrain." Dev Biol **173**(1): 79-94.

Mastick, G. S., W. T. Farmer, et al. (2010). "Longitudinal axons are guided by Slit/Robo signals from the floor plate." Cell Adh Migr **4**(3): 337-41.

Ming, G., J. Henley, et al. (2001). "Electrical activity modulates growth cone guidance by diffusible factors." Neuron **29**(2): 441-52.

Nakamura, F., M. Tanaka, et al. (1998). "Neuropilin-1 extracellular domains mediate semaphorin D/III-induced growth cone collapse." Neuron **21**(5): 1093-100.

Nakamura, S., Y. Ito, et al. (2000). "Local directional cues control growth polarity of dopaminergic axons along the rostrocaudal axis." J Neurosci **20**(11): 4112-9.

Nguyen-Ba-Charvet, K. T., N. Picard-Riera, et al. (2004). "Multiple roles for slits in the control of cell migration in the rostral migratory stream." J Neurosci **24**(6): 1497-506.

Nguyen-Ba-Charvet, K. T., A. S. Plump, et al. (2002). "Slit1 and slit2 proteins control the development of the lateral olfactory tract." J Neurosci **22**(13): 5473-80.

Nguyen Ba-Charvet, K. T., K. Brose, et al. (1999). "Slit2-Mediated chemorepulsion and collapse of developing forebrain axons." Neuron **22**(3): 463-73.

Nural, H. F. y G. S. Mastick (2004). "Pax6 guides a relay of pioneer longitudinal axons in the embryonic mouse forebrain." J Comp Neurol **479**(4): 399-409.

Plump, A. S., L. Erskine, et al. (2002). "Slit1 and Slit2 cooperate to prevent premature midline crossing of retinal axons in the mouse visual system." Neuron **33**(2): 219-32.

Raper, J. A. (2000). "Semaphorins and their receptors in vertebrates and invertebrates." Curr Opin Neurobiol **10**(1): 88-94.

Reeber, S. L., N. Sakai, et al. (2008). "Manipulating Robo expression in vivo perturbs commissural axon pathfinding in the chick spinal cord." J Neurosci **28**(35): 8698-708.

Rhee, J., N. S. Mahfooz, et al. (2002). "Activation of the repulsive receptor Roundabout inhibits N-cadherin-mediated cell adhesion." Nat Cell Biol **4**(10): 798-805.

Ringstedt, T., J. E. Braisted, et al. (2000). "Slit inhibition of retinal axon growth and its role in retinal axon pathfinding and innervation patterns in the diencephalon." J Neurosci **20**(13): 4983-91.

Ross, L. S., T. Parrett, et al. (1992). "Axonogenesis and morphogenesis in the embryonic zebrafish brain." J Neurosci **12**(2): 467-82.

Rubenstein, J. L., S. Martinez, et al. (1994). "The embryonic vertebrate forebrain: the prosomeric model." Science **266**(5185): 578-80.

Santiago-Martinez, E., N. H. Soplop, et al. (2006). "Lateral positioning at the dorsal midline: Slit and Roundabout receptors guide Drosophila heart cell migration." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(33): 12441-6.

Shimamura, K., S. Martinez, et al. (1997). "Patterns of gene expression in the neural plate and neural tube subdivide the embryonic forebrain into transverse and longitudinal domains." Dev Neurosci **19**(1): 88-96.

Shimogori, T. y E. A. Grove (2005). "Fibroblast growth factor 8 regulates neocortical guidance of area-specific thalamic innervation." J Neurosci **25**(28): 6550-60.

Sundaresan, V., E. Mambetisaeva, et al. (2004). "Dynamic expression patterns of Robo (Robo1 and Robo2) in the developing murine central nervous system." J Comp Neurol **468**(4): 467-81.

Tamagnone, L. and P. M. Comoglio (2000). "Signalling by semaphorin receptors: cell guidance and beyond." Trends Cell Biol **10**(9): 377-83.

Taylor, J. S. (1991). "The early development of the frog retinotectal projection." Development Suppl **2**: 95-104.

Tessier-Lavigne, M. y C. S. Goodman (1996). "The molecular biology of axon guidance." Science **274**(5290): 1123-33.

Varela-Echavarria, A., A. Tucker, et al. (1997). "Motor axon subpopulations respond differentially to the chemorepellents netrin-1 and semaphorin D." Neuron **18**(2): 193-207.

Wilkinson, D. (1992). In situ hybridization. Oxford, IRL, Press.

Wilson, S. W., L. S. Ross, et al. (1990). "The development of a simple scaffold of axon tracts in the brain of the embryonic zebrafish, *Brachydanio rerio*." Development **108**(1): 121-45.

Ypsilanti, A. R., Y. Zagar, et al. (2010) . "Moving away from the midline: new developments for Slit and Robo." Development **137**(12): 1939-52.

Yuan, W., L. Zhou, et al. (1999). "The mouse SLIT family: secreted ligands for ROBO expressed in patterns that suggest a role in morphogenesis and axon guidance." Dev Biol **212**(2): 290-306.

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

Zou, Y., E. Stoeckli, et al. (2000). "Squeezing axons out of the gray matter: a role for slit and semaphorin proteins from midline and ventral spinal cord." Cell **102**(3): 363-75.

APÉNDICE DE SOLUCIONES

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.

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.

PBT = PBS + Tween 20 al 0.1%,

Mezcla de hibridación 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

TBST

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

NTMT

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

Slit-Robo Signals Regulate Pioneer Axon Pathfinding of the Tract of the Postoptic Commissure in the Mammalian Forebrain

Itzel Ricaño-Cornejo,¹ Amy L. Altick,² Claudia M. García-Peña,¹ Hikmet Feyza Nural,² Diego Echevarría,³ Amaya Miquejáuregui,¹ Grant S. Mastick,² and Alfredo Varela-Echavarría^{1*}

¹Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México, Querétaro, México

²Department of Biology, University of Nevada, Reno, Nevada

³Instituto de Neurociencias, Universidad Miguel Hernández, Alicante, Spain

During early vertebrate forebrain development, pioneer axons establish a symmetrical scaffold descending longitudinally through the rostral forebrain, thus forming the tract of the postoptic commissure (TPOC). In mouse embryos, this tract begins to appear at embryonic day 9.5 (E9.5) as a bundle of axons tightly constrained at a specific dorsoventral level. We have characterized the participation of the Slit chemorepellants and their Robo receptors in the control of TPOC axon projection. In E9.5–E11.5 mouse embryos, Robo1 and Robo2 are expressed in the nucleus origin of the TPOC (nTPOC), and Slit expression domains flank the TPOC trajectory. These findings suggested that these proteins are important factors in the dorsoventral positioning of the TPOC axons. Consistently with this role, Slit2 inhibited TPOC axon growth in collagen gel cultures, and interfering with Robo function in cultured embryos induced projection errors in TPOC axons. Moreover, absence of both Slit1 and Slit2 or Robo1 and Robo2 in mutant mouse embryos revealed aberrant TPOC trajectories, resulting in abnormal spreading of the tract and misprojections into both ventral and dorsal tissues. These results reveal that Slit-Robo signaling regulates the dorsoventral position of this pioneer tract in the developing forebrain. © 2011 Wiley-Liss, Inc.

Key words: knockout mouse; axonal projections; brain development; calbindin; axonal growth

Discrete sources of guidance cues in the developing brain control axon growth along longitudinal routes and orchestrate the formation of complex pathways (Erskine et al., 2000; Bagri et al., 2002; Hernandez-Montiel et al., 2003, 2008). In vertebrates, the earliest scaffold of longitudinal axons to form during forebrain development is the tract of the postoptic commissure (TPOC). The relevance of this tract as a pioneer pathway has been revealed by its ablation in *Xenopus* embryos, which causes aberrant projection of the supraoptic tract (Anderson and Key, 1996) and of retinal axons (Taylor, 1991). Moreover, in zebrafish, its absence affects the pathfinding of axons from the

nucleus of the posterior commissure at two different choice points (Chitnis et al., 1992).

As in other vertebrate embryos, the TPOC is the earliest tract to form in the mouse diencephalon. On E9.5, TPOC axons emerge from a neuronal nucleus located rostral and ventral to the optic stalk (Easter et al., 1993; Mastick and Easter, 1996). By E10, the tract has extended through the ventral aspect of the diencephalic alar plate, where it merges with other early longitudinal axon bundles (Nural and Mastick, 2004). By E11.5, the tract reaches the midbrain and merges with the tract of the mesencephalic nucleus of the trigeminal nerve. The TPOC is conserved in vertebrate evolution; in all vertebrate embryos examined, including mouse, *Xenopus* (Anderson and Key, 1999), zebrafish (Ross et al., 1992), and chick (Chedotal et al., 1995), the tract originates and extends longitudinally from the rostralmost part of the lamina terminalis in the forebrain to the hindbrain.

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article.

I. Ricaño-Cornejo and A.L. Altick contributed equally to this work.

Contract grant sponsor: The Wellcome Trust; Contract grant number: GR.071174; Contract grant sponsor: CONACYT; Contract grant number: 101433 (to A.V.-E.); Contract grant sponsor: CONACYT (to I.R.-C. and C.M.G.-P.); Contract grant sponsor: Program Ramón y Cajal-2004, Spanish Ministry of Health, Instituto de Salud Carlos III-CIBERSAM; Contract grant sponsor: MEC; Contract grant number: SAF2008-01004; Contract grant sponsor: NIH; Contract grant number: P20 RR-016464; Contract grant sponsor: INBRE Program of the National Center for Research Resources; Contract grant number: HD38069; Contract grant number: NS054740; Contract grant sponsor: March of Dimes; Contract grant number: 1-PY06-387 (to G.S.M.); Contract grant sponsor: DGAPA-UNAM (to A.M.).

*Correspondence to: Alfredo Varela-Echavarría, Instituto de Neurobiología-UNAM, Blvd. Juriquilla 3001, Querétaro, Qro., México 76230. E-mail: avarela@unam.mx or Grant S. Mastick, Department of Biology, University of Nevada, Reno NV 89557. E-mail: gmastick@unr.edu

Received 14 September 2010; Revised 7 March 2011; Accepted 4 April 2011

Published online 17 June 2011 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com). DOI: 10.1002/jnr.22684