



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMEDICAS

SEDE

INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

**ANÁLISIS DE LA INTERACCIÓN AXONAL DE LAS
NEURONAS DOPAMINÉRGICAS MESENFÁLICAS CON
OTRAS POBLACIONES AXONALES DURANTE LA
FORMACIÓN DE LA VÍA NEGRO-ESTRIAL**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

Alumna: Claudia Marcela García Peña Acosta

Tutor: Dr. Alfredo Varela Echavarría, Instituto de Neurobiología

Comité tutor:

Dr. Iván Velasco Velázquez, Instituto de Fisiología Celular

Dra. Magda Giordano Noyola, Instituto de Neurobiología

México; Mayo, 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

A mis padres: Marcela Acosta Hernández y Héctor Guillermo García Peña Gutiérrez por su comprensión y paciencia con su hija que tanto los quiere y que espera se sientan orgullosos de ella por esta nueva etapa que concluye al terminar el Doctorado en Ciencia Biomédicas.

A mi esposo Harbinn Sebastian Solares Mejía quien inició conmigo este camino del Doctorado y en mi vida hace seis años. Espero siempre me tenga la paciencia suficiente para apoyar mi anhelo de ser investigadora. Te amo y te amaré por siempre.

A mis tutores:

Al Dr. Alfredo Varela-Echavarría por haber logrado junto conmigo una publicación que llevó muchos años de experimentación y horas de discusiones productivas, para al fin, dar al mundo entero esa idea en la que trabajamos desde mi llegada a su laboratorio. Obviamente, por sus consejos personales y profesionales que siempre tomo en cuenta y que me han llevado también a triunfos personales y profesionales.

A la Dra. Elisa Tamariz Domínguez, quien inició mi camino en el laboratorio y me dió entrada en la ciencia, dándome su confianza y regaños necesarios para concentrarme en la terminación de mis estudios tanto de Maestría como de Doctorado.

A mi comité tutor:

Al Dr. Iván Velasco Velásquez por permitirme realizar experimentos en su laboratorio en el Instituto de Fisiología Celular, así como de fungir como mi tutor en los 4 años que llevó mi estancia en el Doctorado, en su participación como sinodal en mi candidatura y como revisor de esta tesis. Agradezco por todas la ideas que brindó en la realización de esta tesis.

A la Dra. María Magdalena Giordano Noyola por haber fungido como mi tutor durante el Doctorado, participar activamente con ideas en todos mis tutorales y por la revisión de esta tesis.

Un agradecimiento especial al Dr. Larry Swanson, por haberme permitido realizar experimentos para esta tesis y por su revisión del artículo derivado de ella.

Agradezco al Dr. Adrián H. Oskam del Centro de Física Aplicada y Tecnología Avanzada, UNAM por la construcción del sistema de cultivo de embriones

Un enorme agradecimiento al Dr. Grant Mastick y Mingyung Kim en la Universidad de Reno, Nevada por permitirme realizar experimentos en su laboratorio y participar en la realización de este trabajo.

Agradezco a mis compañeras del INB del laboratorio de Axogénesis Elisa Téllez, Daniela Ávila y Daniela Frade por su colaboración y realización de experimentos para este trabajo.

Agradezco al programa de Posgrado en Ciencias Biomédicas (PCB), al Instituto de Neurobiología (INB) y a la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), por el apoyo brindado para la realización de mis estudios de doctorado. También agradezco a CONACyT por haberme otorgado una beca de estudio (N° 173228) y por el apoyo de los proyectos de investigación DGAPA, UNAM, y PAPIIT 203713.

Agradezco a M. en C. Leonor Casanova Rico de la Unidad de Enseñanza del INB, a la M. en C. Ma. Laura González por su apoyo técnico, a la Ing. Nidia Hernández por su asistencia técnica en la Unidad de Microscopía, al M.V.Z. Martín García Servín del Bioterio del INB, a la Bib. Pilar Galarza Barrios y Bib. Rafael Silva Cruz de la Biblioteca del Campus Juriquilla, al Ing. Alberto Lara Ruvalcaba e Ing. Omar González Hernández de la Unidad de Cómputo del INB, y a la Psic. Lourdes Lara Ayala de la Unidad de

Videoconferencia. Así mismo agradezco a las secretarias de posgrado del Instituto de Neurobiología que tanto me ayudaron en mis trámites.

Agradezco a los participantes del Jurado de examen para obtener el Grado de Doctor en Ciencias, por sus comentarios finales a esta tesis para mejorarla: al Dr. Gonzalo Martínez de la Escalera Lorenzo, Dra. Sofía Yolanda Díaz Miranda, Dr. Jesús Chimal Monroy y a la Dra. Diana Escalante Alcalde.

ÍNDICE

Resumen	1
Abstract	2
Antecedentes.....	3
1.1 La vía negro-estrial.....	3
1.2 Las moléculas involucradas en formación de la vía negro-estrial	4
1.2.1 Estructura general de una neurona en desarrollo	4
1.2.2 Moléculas quimiotrópicas	6
1.2.3 Semaforinas Clase 3/Neuropilinas	2
1.2.4 Netrina 1/DCC	3
1.2.5 Slit/Robo	4
1.2.6. Efrinas/Eph.....	5
1.2.7 Sonic Hedgehog (Shh)	6
1.3 Las moléculas de adhesión y su participación en la formación de tractos axonales	7
1.3.1. NCAM.....	8
1.3.2. TAG-1	9
1.3.3. L1	9
1.4.1 Pregunta de investigación	12
1.4.2 Objetivo General	12
1.4.2.1 Objetivos Particulares:.....	12
1.5 Material y Métodos	13
2. Resultados.....	19
2.1 Formación de la vía negro-estrial y tractos adyacentes	19
2.2 Análisis de las vías axonales ascendentes y descendentes que se encuentran adyacentes a la vía negro-estrial	26
2.3 Análisis de la expresión de proteínas de adhesión de la superfamilia Ig NCAM, Robo1 y Robo2 en los fascículos TH ⁺ y GAD65 ⁺	28
2.4 Efecto de NCAM y Robo 1/2 en la proyección negro-estrial en embriones en cultivo.....	31
2.5 Análisis del efecto de NCAM y Robo 1/2 en neuronas dopaminérgicas en cultivo provenientes del cerebro medio de embriones de rata	34
2.6 Análisis de tractos GAD65 y TH en embriones de rata que carecen de las proteínas Slit1/2 y Robo1/2.....	36
2.7 Análisis de la proyección dopaminérgica en embriones con disminución selectiva de neuronas GAD65	38
3. Discusión	43
4. Perspectivas	48
5. Referencias	50

Resumen

Durante el desarrollo embrionario, los axones de las neuronas dopaminérgicas (nDA) del área A9, denominada sustancia Nigra pars compacta (SNpc), proyectan principalmente al estriado en el cerebro anterior. A esta vía se le denomina vía negro-estrial (VNE) que en el cerebro adulto forma parte del haz de fibras mediales del cerebro anterior (MFB por sus siglas en inglés). Estudios previos han implicado a proteínas quimiótropas en la proyección de los axones que forman la VNE durante el desarrollo embrionario. Sin embargo, poco se sabe de la relevancia de su interacción con otros fascículos axonales y de las moléculas ancladas al sustrato involucradas.

Para estudiar el mecanismo de fasciculación en la formación de la VNE, se analizaron cerebros de embriones de rata y ratón en los que por medio de inmunotinciones se observó que los axones que expresan el marcador dopaminérgico TH, ascienden en estrecha relación a axones GABAérgicos (GAD65⁺) descendentes. Para poner a prueba la relevancia de la cercanía entre estos dos tipos de axones en la proyección dopaminérgica, se analizaron embriones transgénicos en los que el haz de fibras GAD65 se encontraba reducido por la expresión condicional de la toxina de la difteria.

Se encontró una alteración de los axones TH⁺ en su trayectoria en la región hipotalámica así como una proyección anormal en su entrada al estriado. Posteriormente, en embriones en cultivo, se observó que los ectodominios de las proteínas de adhesión NCAM y Robo producen alteraciones en el inicio de la proyección de los axones TH⁺. Además, en neuronas dopaminérgicas en cultivo, los mismos ectodominios causaron una disminución en la longitud de sus axones. Se analizaron entonces ratones “knockout” carentes de las proteínas Robo1/2 y sus ligandos Slit 1/2 en los que se observó que, además de la proyección dopaminérgica aberrante ya conocida, las fibras GAD65 se encontraron dramáticamente alteradas.

Estos resultados sugieren que la interacción entre los axones descendentes GAD65 y los axones ascendentes dopaminérgicos es relevante para la formación de la VNE y que NCAM y las proteínas Robo podrían estar involucradas en la interacción de los axones de esta vía con el sustrato.

Abstract

During brain development, the axons from dopaminergic neurons of the A9 nucleus, the Substantia Nigra pars compacta, grow until they reach the striatum in the forebrain. This via is denominated the nigro-striatal pathway (NSP), which forms part of the medial forebrain bundle in the adult brain. Previous studies have been implicated chemotropic molecules in the formation of the NSP, but little is known about the role of the interaction with other fascicles and of molecules anchored in the formation of this tract.

With the aim of studying the role of axon fasciculation in the formation of the NSP we analyzed rat and mouse embryonic brains by immunostaining for TH⁺ (marker of dopaminergic neurons) and GAD65 (marker of one subtype of GABAergic neurons). We found that the TH⁺ axons grow in close apposition to descending GAD65 axons which precede them. To test the relevance of this closeness, we analyzed transgenic mouse embryos in which GAD65 neurons had been partially ablated by the conditional expression of diphtheria toxin. In these embryos we found alterations in the trajectory of TH⁺ axons to the striatum, particularly in the hypothalamic region, and an abnormal entrance to the striatum. Since fasciculation requires the presence of adhesion molecules, we tested the role of NCAM and Robo, adding their ecto-domains to cultured embryos, finding an alteration of TH⁺ axons at the beginning of their projection.

Moreover, NCAM on the substrate enhanced TH axon growth which was inhibited by soluble NCAM and Robo. We also analyzed double knockouts for Robo 1/2 and Slit 1/2 (ligands of Robo) in which, in addition to the already known TH misprojections, we found a dramatic alteration of GAD65 projection. These findings suggest that fasciculation with GAD65 axons is an important mechanism in the formation of the NSP and that NCAM and Robo participate as adhesive molecules.

Antecedentes

1.1 La vía negro-estrial

Las neuronas dopaminérgicas (nDA) de la Sustancia Nigra pars compacta (SNpc) o del núcleo A9 (Dahlstroem and Fuxe, 1964), que pueden ser visualizados con anticuerpos para la hidroxilasa de tirosina (TH), son esenciales en el control del movimiento por la regulación que ejercen sobre el estriado dorso-lateral a donde proyectan sus axones.

Según evidencias de Gates et al., (2004), durante el desarrollo embrionario los axones dopaminérgicos del área ventral del mesencéfalo (MBv) de ratas inician su proyección en el día gestacional 12 (E12) proyectando a la parte dorsal del mesencéfalo y por señales diversas tanto difusibles como ancladas al sustrato (Nakamura et al., 2000; Gates et al., 2004) viran hacia el tálamo ventral en E13; continúan navegando a través del diencefalo en E14 hasta llegar a la entrada del telencefalo virando dorsalmente hacia el estriado en E15 y estableciendo sus conexiones formando la vía negro-estrial (VNE).

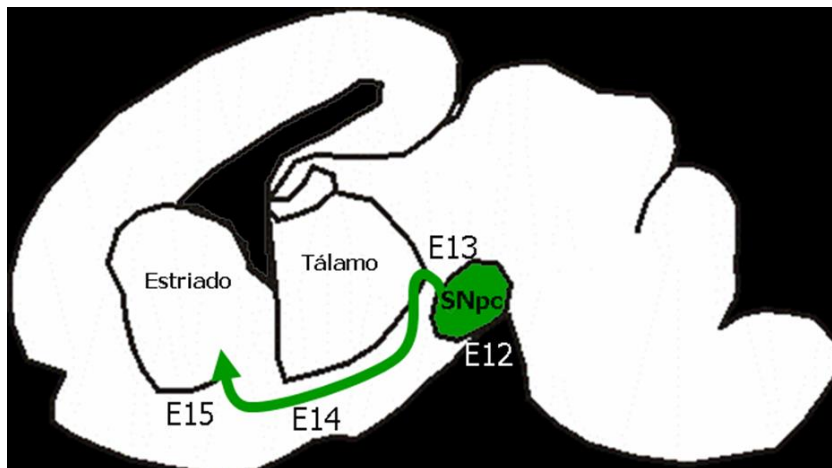


Figura 1. Representación esquemática de un cerebro de rata adulta en una vista lateral donde se muestra la trayectoria de las neuronas dopaminérgicas. En el día gestacional E12 inicia la proyección dopaminérgica (SNpc), en E13 vira hacia la zona rostral del cerebro medio hasta llegar al hipotálamo ventral, en E14 navega a través del diencefalo ventral virando rostralmente hacia el telencefalo en E15 hasta alcanzar el estriado. Modificado de Gates et al., (2004)

Diversas señales han sido identificadas que guían a los axones dopaminérgicos hasta su blanco en el estriado. Entre estas señales, se incluyen señales ancladas al sustrato como proteínas que interactúan con la matriz extracelular, proteínas transmembrana y

proteínas secretadas que difunden desde su lugar de síntesis (Tessier-Lavigne and Goodman, 1996).

1.2 Las moléculas involucradas en formación de la vía negro-estrial

1.2.1 Estructura general de una neurona en desarrollo

En el cerebro en desarrollo, las neuronas extienden sus axones de manera estereotípica hasta conectarse con sus células blanco. En el extremo distal del axón se localiza una estructura esencial para tal proyección axonal, el cono de crecimiento. Este cono contiene estructuras secundarias llamadas filopodios y lamelopodios compuestos de filamentos de actina (Figura 2). Las proteínas de unión a actina (actin binding proteins) regulan la polimerización o despolimerización de actina al reclutar diversas enzimas como Rho-GTPasa, Kinasas, fosfatasas, nucleótidos cíclicos y causar cambios en el flujo de calcio lo que resulta en contracción, giros o cambios de dirección en el axón (Huber et al., 2003; Gomez and Letourneau, 2014). Los cambios de dirección del cono de crecimiento dependen de moléculas secretadas con propiedades quimotrópicas, que se unen a receptores ubicados en la membrana celular del cono de crecimiento. Dependiendo de la concentración, de la expresión de receptores en la membrana celular y del tipo de moléculas, el cono remodela la actina alejándose de (repulsión) o creciendo hacia la fuente de las mismas (atracción) (Huber et al., 2003; Gomez and Letourneau, 2014).

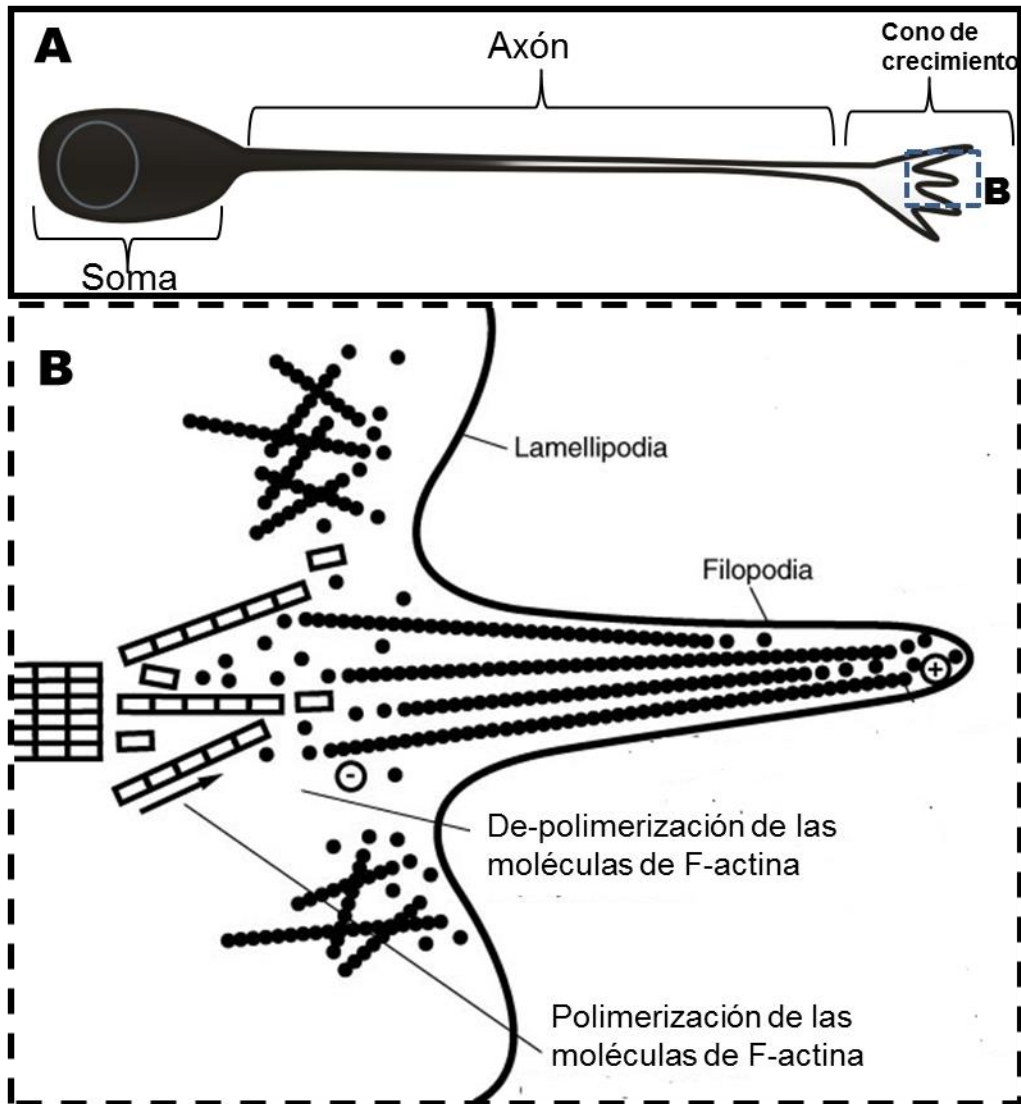


Figura 2. Estructura general de una neurona en desarrollo. A. Muestra las partes de una neurona en desarrollo, en donde del soma, se elonga un axón y en la parte más distal del axón se encuentra el cono de crecimiento. En B se muestran las estructuras de los conos de crecimiento en una magnificación y la formación de los filopodios y los lamelopodios. Los lamelopodios se forman por la polimerización de actina, como se representa por el signo positivo (+) y la de-polimerización es representada por el signo negativo (-), donde la actina no se agrupa de forma organizada y se forman los lamelopodios (modificado de Huber et al., (2003).

1.2.2 Moléculas quimiotrópicas

Las moléculas quimiotrópicas son moléculas secretadas que difunden desde su lugar de origen formando gradientes decrecientes que pueden generar respuestas como: atractantes, hacia la fuente de mayor concentración de molécula; permisivas, que permiten el crecimiento o lo estimulan; repelentes que a mayor concentración de una molécula el cono de crecimiento se aleja de la fuente de secreción y colapso, en el que el crecimiento de los axones se detiene (Figura 3) (Huber et al., 2003).

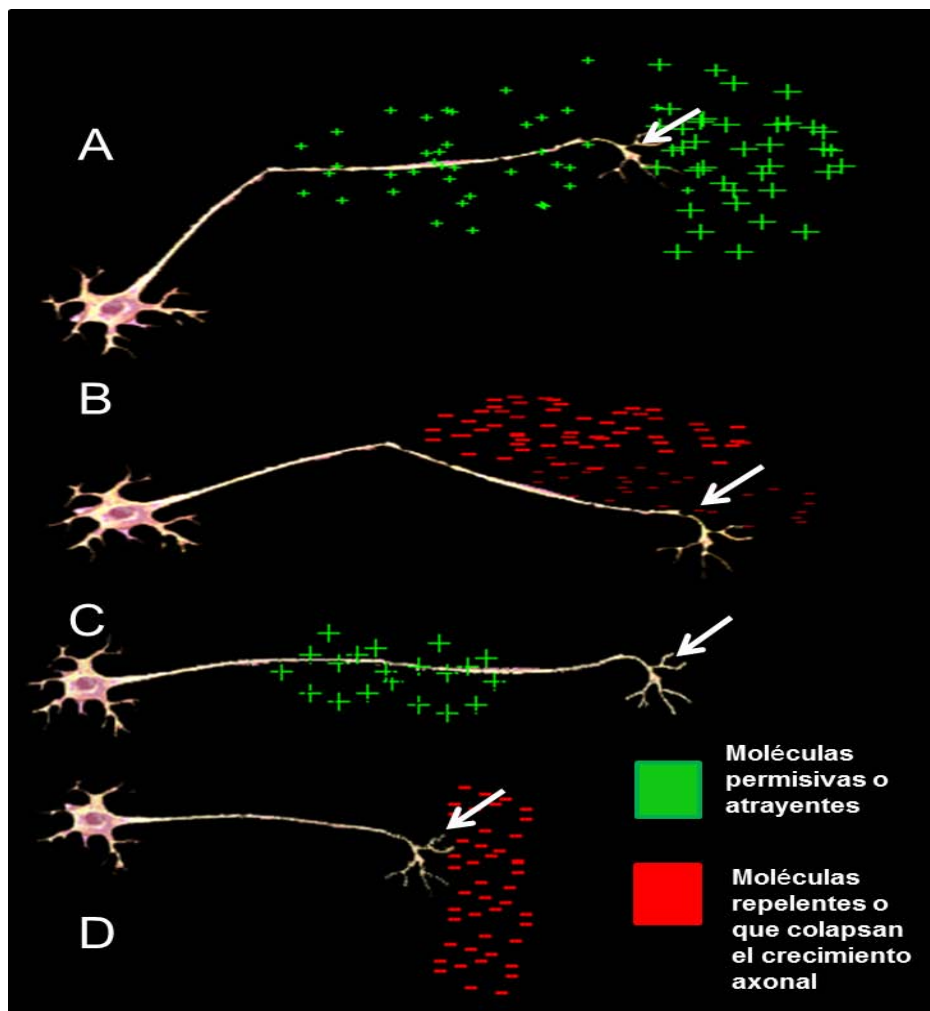


Figura 3. Neuronas respondiendo a diversas moléculas quimiotrópicas. Observamos el avance o retroceso de los conos de crecimiento (flechas) dependiendo de la presencia de moléculas quimiotrópicas. A y C muestran neuronas respondiendo a moléculas atrayentes o permisivas [signos (+) verde]. B y D Neuronas respondiendo a moléculas repelentes o que colapsan el cono de crecimiento [signos (-) en rojo].

Particularmente, en la formación la vía negro-estrial, se han involucrado una variedad de moléculas como las Semaforinas clase 3, Netrinas, Efrinas, Wnt, Shh y Slit cuyos efectos se describen a continuación.

1.2.3 Semaforinas Clase 3/Neuropilinas

Las Semaforinas son una familia de proteínas que comparten un dominio Sema (o Semaforina) N-terminal rico en cisteínas, están conservadas filogenéticamente y pueden ser transmembranales, secretadas o ancladas a la membrana por GPI (“glycosyl fosfatidyl inositol”). Existen ocho familias hasta ahora descritas cuya expresión ha sido estudiada en el sistema nervioso, aunque se han encontrado en prácticamente todos los tejidos (Yazdani y Terman, 2006). Se han descrito diversas funciones de estas proteínas en los sistemas inmune, endocrino, gastrointestinal, hepático, musculo-esquelético, renal, respiratorio, reproductivo, en tumoraciones y angiogénesis así como en la metástasis de células cancerosas (revisado en Huber et al., 2003; Yazdani y Terman, 2006; Bielenberg and Klagsbrun, 2007). Una respuesta común a las Semaforinas es que, al unirse con su receptor en la membrana celular, producen un reacomodo en el citoesqueleto, la organización de los filamentos de actina y la red de microtúbulos (Yazdani y Terman, 2006) asociado a procesos como la migración celular y la guía axonal.

Particularmente las Semaforinas de clase 3 son moléculas que requieren el complejo de receptores Neuropilina (Npn1 ó 2)/L1 para ejercer un efecto en el cono de crecimiento (Huber et al., 2003). Hasta ahora se han involucrado a las Semaforinas 3A, 3C y 3F en la formación de la vía negro-estrial (Hernández-Montiel et al., 2008; Kolk et al., 2009; Yamauchi et al., 2009; Torre et al., 2010). Se ha descrito, por medio de hibridaciones *in situ* la expresión de Semaforinas en estadios tempranos y en zonas cercanas a la proyección dopaminérgica. En un trabajo hecho en nuestro laboratorio (Hernández-Montiel et al., 2008), se observó que la Semaforina 3F se expresa en el aspecto dorsal del mesencefalo embrionario, la Semaforina 3A se expresa en el tálamo dorsal, mientras que la 3C se encontró en el pretectum. Con la finalidad de observar si estas moléculas guía tienen un efecto en la dirección de los axones

dopaminérgicos, se utilizó un sistema de cultivo en geles de colágena en el que explantes del mesencéfalo embrionario fueron expuestos a agregados de células HEK293 expresando las semaforinas; la Semaforina 3C fue atrayente, Semaforina 3F fue repelente, mientras que Semaforina 3A fue sólo un promotor del crecimiento axonal.

Debido a los efectos encontrados, se sugirió que estas moléculas podrían estar participando en la formación y establecimiento de la VNE. Sin embargo, cuando se realizaron dobles inmunotinciones para TH y para Npn1 ó Npn2, se encontró que pocos axones dopaminérgicos expresan a estas proteínas de membrana en estadiso tempranos de su proyección.

En otro trabajo llevado a cabo por Kolk y colaboradores (Kolk et al., 2009), utilizando embriones de ratón “knock out” para Semaforinas 3F ó Npn-2, observaron que no había alteración en la proyección TH⁺ en su dirección hacia el estriado, pero sí en cuanto a la fasciculación de este tracto, sugiriendo que las Semaforinas no son esenciales para la dirección y trayectoria de las TH⁺, pero sí para la organización del tracto. Al igual que en nuestro estudio, se encontró muy poca expresión de los receptores a Semaforina en las neuronas TH⁺.

Estos antecedentes motivaron la pregunta ¿responden los axones TH⁺ de forma directa o indirecta (por fasciculación con otros axones) a las señales de las semaforinas?

1.2.4 Netrina 1/DCC

Las Netrinas son una pequeña familia de proteínas con miembros secretados (Netrina 1, 3, 4) y otros anclados a la membrana por GPI (Netrina G1 y G2). Hay otras Netrinas relacionadas a la laminina (Netrina 4), con un dominio laminina IV en el extremo N-terminal y un dominio Laminina en V en el extremo C-terminal (Larrieu-Lahargue et al., 2012). Netrina 1 ha sido la principalmente relacionada con guía axonal en el sistema nervioso o en la migración celular, actuando bifuncionalmente como repelente o atrayente dependiendo del tipo celular y el tipo de receptores presentes en la membrana celular (Huber et al., 2003; Lai Wing Sun et al., 2011). También se ha descrito el efecto de las Netrinas en la organogénesis fuera del sistema nervioso central

y como mediador de adhesión entre células del páncreas, glándulas mamarias, sistema vascular y músculo (Lai Wing Sun et al., 2011).

Las Netrinas-1 se unen a receptores de la familia DCC (deleted in colon cáncer, por sus siglas en inglés) y neogenina, así como a la familia Unc5 (A-D) (Huber et al., 2003; Larrieu-Lahargue et al., 2012). Si la unión de Netrina-1 es con DCC o Neogenina los axones pueden ser repelidos o atraídos a la fuente de Netrina-1, pero en ausencia de DCC, Unc5 sólo media repulsión en los axones (Moore et al., 2007).

En la formación de la VNE se ha estudiado *in vitro* la participación de Netrina 1. En el trabajo de Lin et al., (2005) en cultivos de explantes en geles de colágena se observó que los axones TH⁺ son atraídos por una fuente focal de Netrina 1, mientras que la misma proteína añadida al medio de cultivo estimuló el crecimiento de estos axones.

También encontraron la expresión del receptor DCC en neuronas que expresan TH⁺ y Girk-2⁺ (Canal de potasio expresado sólo por neuronas del grupo A9 dopamineérgico de la SNpc). Estas evidencias sugirieron la participación de Netrina 1 en la formación de la VNE en el estadio E14.

1.2.5 Slit/Robo

Los miembros de la familia Slit son proteínas secretadas que contienen dominios ricos en Leucina (LRR) y dominios del factor de crecimiento epidermal (EGF) repetidos. En vertebrados se han descrito hasta ahora tres proteínas Slit (1-3). Slit 1 y 2 parecen ser redundantes pues en ausencia de sólo una de ellas no se encuentran defectos en el SNC, mientras que en dobles mutantes Slit1/2 hay defectos severos en tractos talamocorticales, corticofugales, del cuerpo caloso, serotoninérgicos y dopaminérgicos (Bagri et al., 2002). Se ha descrito que para la función de Slit, éste debe asociarse a un receptor transmembranal llamado Robo. Robo es una proteína conservada filogenéticamente que pertenece a la superfamilia de las inmunoglobulinas (Ig) ya que contiene dominios Ig, así como repeticiones de fibronectina tipo III (FNIII) en la parte extracelular que son indispensables para la unión con Slit (Huber et al., 2003; Hohenester, 2008). En la parte intracelular, las proteínas Robo tienen el motivo CC, requerido para la función repelente de Slit (Huber et al., 2003). En vertebrados se han

descrito cuatro proteínas transmembranales Robo (1-4); Robo 1-3 se encuentran principalmente en el sistema nervioso central y Robo 4 se ha encontrado principalmente en el sistema vascular (London and Li, 2011).

En cuanto al papel de Slit 1 y 2 en axones dopaminérgicos de la VNE, se ha encontrado un efecto repelente al exponer neuronas TH⁺ de E14 a una fuente de Slit2 (Lin et al., 2005, 2005). Por otro lado, al exponer estas neuronas TH⁺ a Slit 1, se observó inhibición del crecimiento axonal. En estos mismos estudios, los receptores Robo 1 y Robo 2 se encontraron en neuronas TH⁺ disociadas del estadio E14. En otro estudio más reciente (Dugan et al., 2011) se analizaron dobles knock out para Robo1/2 ó Slit1/2 para estudiar si la ausencia de estas proteínas generaba un efecto en la VNE. Se encontró que para los mutantes de Slit1/2 había una diferencia en la organización del tracto dopaminérgico, pero no en la dirección de los axones TH mientras que en los mutantes de Robo1/2 había una proyección anormal hacia la parte dorsal del tálamo.

Además encontraron poca expresión de Robo 1 y 2 en neuronas TH⁺ en los estadios tempranos de la formación de la VNE. Este estudio sugiere que tanto Robo 1/2 como Slit 1/2 participan en la proyección longitudinal dopaminérgica.

Aunque estos estudios revelan un papel de la señalización Slit/Robo en la proyección dopaminérgica, los bajos niveles de expresión de Robo en estadios tempranos también sugieren que existen otros mecanismos de guía axonal de estos axones.

1.2.6. Efrinas/Eph

Las Efrinas son una familia de proteínas transmembranales asociadas a GPI las cuales se expresan en todas las capas germinales durante el desarrollo embrionario y se les han atribuido funciones como morfogénesis, segregación celular, posicionamiento, formación de límites entre tejidos, segmentación, migración celular, mapeo topográfico y guía axonal (Huber et al., 2003; Klein, 2012). Las Efrinas se unen a receptores Eph los cuales son también proteínas transmembranales de la familia de los receptores Tirosine Kinasas. Ambos, tanto las Eph como las Efrinas, se unen exclusivamente entre ellas cuando hay un contacto célula-célula, dando como resultado un efecto bidireccional en la cascada intracelular de señalización. Generalmente, el efecto en las

células que poseen los receptores Eph, genera un efecto repulsivo en las células que expresan el ligando Efrina; por otra parte, el efecto en las células expresando Efrinas puede ser igualmente repulsivo o generar adhesión celular (Revisado en Klein, 2012).

Las Efrinas se dividen en dos familias, las Efrinas A (A1-A5) que interaccionan con receptores Eph A (A1-A8) y las Efrinas B (B1-B3), que a su vez pueden unirse a receptores Eph B (B1-B6) (Revisado en Huber et al., 2003).

En cuanto a su participación en la formación de la VNE, se ha encontrado a partir de mRNA extraído de mesencefalo ventral de rata de diferentes estadios entre E18 a P7 que hay expresión de los receptores EphB2 en las neuronas de la SNpc y que su ligando EfrinaB2, se expresa en altos niveles en el estriado en desarrollo. Cuando se hicieron cultivos de neuronas dopaminérgicas extraídas de E18 y se añadió EfrinaB2 soluble, se encontró que solo aquellas neuronas provenientes de SNpc fueron inhibidas por EfrinaB2 y no aquellas provenientes del área tegmental ventral (VTA) (Yue et al., 1999). En este trabajo de Yue et al., (1999) se propone la hipótesis de que la alta expresión de EfrinaB2 podría impedir que la SNpc inerve la zona ventromedial del estriado, donde se encuentra el Núcleo acumbens. Por otra parte, en la zona dorsolateral del estriado, donde hay menor expresión de EfrinaB2, hay permisividad para la proyección de axones de la SNpc.

También se ha observado que la expresión de EphB1 está asociada a la expresión de Nurr 1 en neuronas del MBv de ratones de 11.5 a 15.5 de gestación (Calò et al., 2005). Nurr 1 es un factor de transcripción específico para neuronas dopaminérgicas del MBV y de acuerdo con los experimentos hechos con explantes MBv, al añadir una baja cantidad de EfrinaB2 (0.25mg/ml), se estimula la expresión de Nurr 1, lo que sugiere que esta proteína puede contribuir no sólo a la organización topográfica de los axones dopaminérgicos, sino también a la diferenciación de estas neuronas.

1.2.7 Sonic Hedeghog (Shh)

Sonic Hedeghog (Shh) es un morfógeno que tradicionalmente se ha relacionado con procesos de regionalización temprana del neuroepitelio embrionario donde su expresión

principal se ha encontrado en la parte ventral del tubo neural. Sin embargo, se ha encontrado la expresión de este morfógeno en otros estadios posteriores y se ha demostrado su función como guía axonal en diversas áreas del cerebro, como el cuerpo calloso, axones comisurales, tracto espinal del Rafe, neuronas dopaminérgicas del cerebro medio y neuronas serotoninérgicas (Hammond et al., 2009; Avilés et al., 2013; Blakely et al., 2013).

Particularmente en relación a la VNE, se ha encontrado que los axones dopaminérgicos son atraídos por fuentes de Shh en el hipotálamo, cuando las neuronas dopaminérgicas han terminado su proceso de diferenciación posterior a E12. En una línea transgénica de ratones en la que se disminuye de manera condicional la expresión de Shh, la proyección dopaminérgica se altera en regiones rostrales del hipotálamo (Hammond et al., 2009). Estos hallazgos revelan la función de Shh en la dirección y atracción de axones TH⁺ hacia regiones cercanas al estriado.

1.3 Las moléculas de adhesión y su participación en la formación de tractos axonales

Hallazgos de diversos grupos de investigación han dado lugar a la idea de la formación de tractos axonales usando otros haces de axones preexistentes como sustrato. Un ejemplo de ello lo constituyen los axones procedentes de neuronas de la corteza cingulada o de la neo-corteza rostrolateral que cruzan la línea media dando lugar al cuerpo calloso. Durante este cruce, estos axones contactan a otros axones pioneros usándolos como andamio lo que constituye un ejemplo del contacto o cercanía axón-axón en la formación de este tracto. Este contacto entre axones, fue visualizado por medio de los marcadores lipofílicos Dil y DiO que permitieron visualizar la cercanía de axones en un mismo lugar provenientes de sitios distantes. Sin embargo, en este estudio sólo se obtuvo evidencia de marcaje y no se estudiaron las moléculas de adhesión involucradas en el proceso (Rash and Richards, 2001). Un mecanismo similar de contacto entre axones se ha descrito recientemente en nuestro laboratorio entre axones de lados opuestos de la región caudal del romboencéfalo de embriones de rata E9.5-11.5 que facilita el cruce de los axones a través de la línea media al lado contralateral (Sandoval-Minero and Varela-Echavarría, 2008). Otros reportes recientes,

han propuesto mecanismos de interacción axón-axón en el tracto habenuar lateral (LHb) (Schmidt et al., 2014). En este estudio, encontraron que el núcleo LHb envía eferentes que expresan la molécula de adhesión LAMP y que posteriormente estos axones son usados como andamio para la entrada de aferentes dopaminérgicos; proponiendo con esto un mecanismo llamado subdominio mediador axón-axón (Schmidt et al., 2014). Revisiones recientes (Wang and Marquardt, 2012) han descrito que las interacciones axonales pueden ser descritas en varios subtipos: la fasciculación selectiva heterotípica, que refiere cuando tipos de axones de diferentes fenotipos generan señales que les permite interactuar entre ellos; la fasciculación homotípica, cuando esta fasciculación es con axones del mismo fenotipo; heterotípica y secuencial fasciculación, que implica que axones van tomando escalas de diversos axones longitudinalmente para llegar a sus blancos (Wang and Marquardt, 2012).

En los casos descritos arriba, es de esperar que moléculas de adhesión participen en la interacción entre axones, aunque los mecanismos moleculares involucrados han sido poco estudiados a la fecha. Se sabe, sin embargo, que durante el desarrollo del cerebro, los axones expresan moléculas de adhesión que permiten su interacción con el sustrato y que miembros de la Superfamilia Ig participan en mecanismos de fasciculación de axones. La familia de las IgCAM son proteínas transmembranales capaces de modular el contacto o la interacción entre axones, además de otras funciones. Las subfamilias son las NCAM (1.3.1), TAG-1 (1.3.2) y L1 (1.3.3) (NrCAM, Neurofascin y CHL1) que se describen a continuación (Heyden et al., 2008; Schmid and Maness, 2008).

1.3.1. NCAM

NCAM fue uno de los primeros miembros de la superfamilia descritos en el cerebro en desarrollo de la rata en 1982 (Finne, 1982). Desde entonces, se han descrito 3 isoformas que son NCAM de 120, 140 y 180 kilodaltones (KDa) las cuales comparten un dominio extracelular conservado que participa en diversos procesos celulares. NCAM puede participar en interacciones homofílicas y heterofílicas en *trans* y en *cis*;

particularmente, se ha descrito interacción con matriz extracelular (colágena), receptores de crecimiento fibroblástico (FGFr), factor neurotrófico de células gliales (GDNF), L1, TAG-1 y NrCAM. Esta interacción permite tanto el contacto y proliferación celular, como la adhesión a la matriz extracelular (Revisado en Nielsen et al., 2008)).

En cuanto la función de NCAM en la formación de tractos axonales, tanto en humanos como en ratas y ratones, se ha demostrado su participación en la formación de los ganglios trigéminos, tallo cerebral (Quartu et al., 2010), proyecciones talamo-corticales (Fujita et al., 2005) y, en neuronas dopaminérgicas, hasta ahora sólo en el proceso de diferenciación hacia el fenotipo dopaminérgico (Schiff et al., 2009).

1.3.2. TAG-1

TAG-1 se ha descrito como una subfamilia de proteínas de adhesión con seis variantes hasta ahora descrita que son: TAG-1, Contactina, BIG-1, BIG-2, NB-1 y NB-3; cada uno codificado por diferentes genes (Kamei et al., 2000). Estos genes, son expresados únicamente en el cerebro y sus productos génicos juegan un papel fundamental en el crecimiento axonal así como en la fasciculación en cerebros de rata y humanos (Wolfer et al., 1994).

Se ha descrito la participación de TAG-1 en la fasciculación de los tractos corticofugales (Denaxa et al., 2001), del tracto olfativo lateral, del tracto óptico, del fasciculus retroflexus, del tracto predorsal, del cuerpo caloso y de la comisura hipocámpica (Revisado en(Wolfer et al., 1994)). En otro estudio reciente se ha reportado en que los axones GABAérgicos que colocalizan con axones TAG⁺ de la corteza cerebral, median la proyección de axones de neuronas de la eminencia ganglionar medial (McManus et al., 2004)

1.3.3. L1

La subfamilia de proteínas transmembranales L1 está involucrada en el contacto axón-axón en la formación de tractos cerebrales de ratones, ratas y humanos (Schmid and Maness, 2008). Las proteínas de esta subfamilia son L1, CHL1, Neurofascin y NrNCAM, las cuales tiene cada una diferente distribución y función en el cerebro. L1 ha

sido detectada en los axones de la retina (Buhusi et al., 2008), en las células granulares cerebelares (Sakurai et al., 2001) y en las neuronas dopaminérgicas (Demyanenko et al., 2001), participando en la inducción del crecimiento de neuritas, fasciculación e interacción con la matriz extracelular (Thelen et al., 2002). También, estudios con animales “knock-out” han demostrado que la molécula de adhesión L1 participa en la fasciculación de axones tálamo-corticales (Ohyama et al., 1998). CHL1 ha sido descrito principalmente en tractos visuales y áreas somatosensoriales del cerebro en desarrollo (Demyanenko et al., 2001). NrCAM se ha descrito en células granulares del cerebelo y neuronas tectales, promoviendo el crecimiento de neuritas y la fasciculación entre axones (Volkmer et al., 1996; Sakurai et al., 2001). Neurofascin es una proteína que tiene claras diferencias con las otras de esta subfamilia, sobre todo en que presenta varias isoformas por procesamiento alternativo, en que posee un dominio PAT diferente en el tercer dominio y que se expresa particularmente en axones longitudinales durante el desarrollo embrionario (Volkmer et al., 1996).

1.4 Planteamiento del problema

En nuestro laboratorio se ha estudiado específicamente la vía negro-estriada, en la que hemos obtenido evidencia de que hay una población GABAérgica que podría estar creciendo en aposición cercana a los axones TH⁺ de este tracto. Se observó por medio de una doble inmunotinción en cortes horizontales de embrión de rata, que axones no dopaminérgicos y axones positivos a Neuropilina-1 (receptor de Semaforinas de clase 3) (Hernández-Montiel et al., 2008) crecían juntos al inicio de la proyección de la VNE.

Así mismo se realizaron inmunotinciones contra GABA y TH, con lo que se observó la cercanía entre los tipos axonales detectados por este método.

Por otro lado, al exponer *in vitro* explantes del área VM de embriones de rata E13 a explantes del pretectum, región en la que se expresan las semaforinas 3C y 3F, se observó una respuesta diferencial de los axones TH⁺ (Tamariz et al., 2010). Cuando éstos se encontraban interactuando con axones GABA⁺ presentaban una respuesta de atracción al pretectum mientras que aquellas TH⁺ que no interactuaban con las GABA⁺

eran repelidas (Figura 4C). También hemos observado en cultivos de explantes del área VM que un número importante de neuronas TH⁺ son inhibidas por Slit 1 aunque no poseen los receptores Robo 1 y 2 que median la respuesta a dicha molécula, encontrando otra población de axones que sí expresa estos receptores, pero que es inmunoreactiva a TH (Figura 4B) (García-Peña, Resultados sin publicar, 2007).

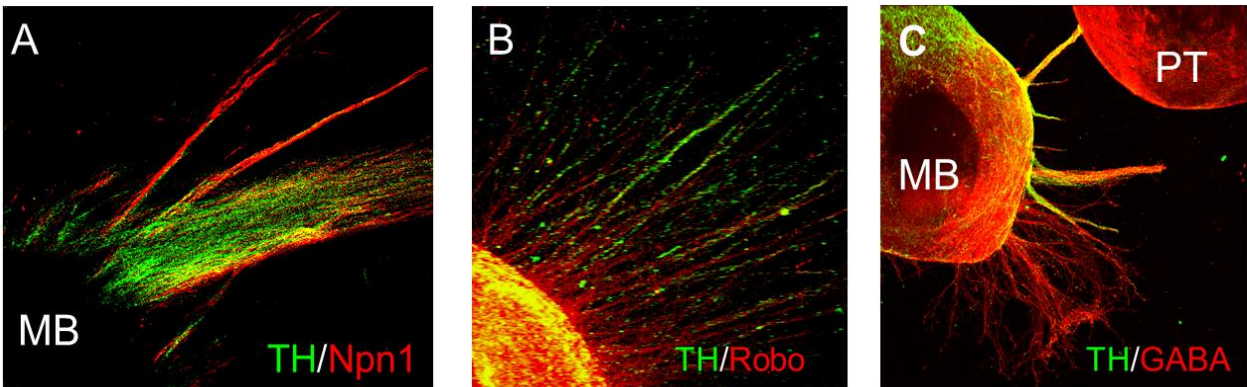


Figura 4. Explantes de mesencéfalo ventral de E14 cultivado por 24 hrs. En **A**. Se muestran algunos axones de mesencéfalo ventral (MB) donde axones TH⁺ (verde) que expresan Npn1 (rojo) (Hernández-Montiel, et al., 2008). **B**. Tinción contra TH (verde) y Robo 1/2 (Rojo) donde se pueden observar algunos axones dopaminérgicos expresando Robo, los receptores para Slit. **C**. Explante de mesencéfalo teñido contra GABA (rojo) y TH (verde) donde hay axones TH⁺ y GABA⁺ fasciculados siendo atraídos hacia un explante de pretektum (PT).

Las evidencias anteriores sugieren que la interacción de axones dopaminérgicos con otra población neuronal puede modular y modificar la respuesta ante las moléculas quimiotrópicas, por lo que la fasciculación entre axones puede ser un factor clave que permita la proyección de la VNE. Uno de los tipos neuronales propuestos para dicha interacción son las neuronas GABAérgicas debido a que mediante inmunotinciones de explantes del área VM embrionario hemos observado su presencia (Figura 1C).

Además se ha reportado en el adulto la presencia de axones GABA⁺ que forman parte de la VNE aunque en muy baja proporción (Rodríguez and González-Hernández, 1999).

En el presente trabajo se estudió esa interacción. Además de aportar información básica acerca de los mecanismos moleculares que participan en el establecimiento de la vía, este estudio arroja luz acerca de algunos problemas de guía axonal que podrían tener utilidad en protocolos de sustitución celular en modelos de la enfermedad de Parkinson en los que se transplantan células dopaminérgicas en el mesencéfalo ventral para permitir la proyección de axones dopaminérgicos al estriado.

1.4.1 Pregunta de investigación

¿Es la fasciculación entre las neuronas dopaminérgicas con otras poblaciones neuronales un mecanismo importante en la formación de la vía negro-estrial?

1.4.2 Objetivo General

Estudiar el papel de la fasciculación de axones dopaminérgicos mesencefálicos con otros tipos axonales durante la formación de la vía negro-estrial.

1.4.2.1 Objetivos Particulares:

- 1) Caracterizar por medio de inmuno-tinción la formación de la vía negro-estrial (VNE) en embriones de rata y ratón así como la presencia de otros tractos axonales en los mismos estadios.
- 2) Hacer marcajes retrógrados para determinar la procedencia de los diversos grupos axonales relacionados con la VNE.
- 3) Determinar la expresión de moléculas de adhesión en los axones de la VNE, así como en los otros tipos axonales adyacentes.
- 4) Inhibir el efecto de las diversas moléculas de adhesión en sistemas en cultivo para determinar su participación en la proyección de los axones dopaminérgicos.
- 5) Analizar la relevancia de la fasciculación entre axones dopaminérgicos y otros tipos axonales por medio de líneas transgénicas de ratones carentes de mecanismos guía de axones dopaminérgicos o en las que se disminuye selectivamente a los axones no dopaminérgicos que forman el MFB.

1.5 Material y Métodos

1.5.1 Animales:

Silvestres

Ratas de la cepa Wistar o ratones CD-1 ó C57BL preñadas fueron usadas. El día de detección del tapón vaginal fue considerado el día 0.5 de estadio embrionario (E 0.5).

Se usaron ratones y ratas en la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) manejados y sacrificados por dislocación cervical o usando CO₂ con el mínimo de estrés por personal calificado y de acuerdo a los regulaciones del gobierno mexicano al respecto del uso de animales de laboratorio por propósitos de investigación (NOM-062-ZOO-1999).

Se utilizaron también ratones en la Universidad de Nevada, Reno (UNR), que fueron mantenidos acorde a los protocolos de UNR IACUC, así como ratas de la University of Southern California (USC) regulados por los lineamientos del NIH (National Institutes of Health).

Ratones Knock out

Los embriones knock out para Slit1/2 y Robo 1/2 fueron donadas por Marc Tessier-Lavigne (Genentech Inc;, South San Francisco, CA) (Long et al., 2004; López-Bendito et al., 2007). Los dobles mutantes Slit1/2 fueron obtenidos de cruza entre Slit1^{-/-} y Slit2^{+/-} que se cruzaron entre ellos por más de diez generaciones. Los ratones mutantes para Robo1/2 fueron mantenidos como heterocigotos por retrocruzas con la cepa CD-1 por más de diez generaciones. Para la genotipificación de estos ratones se realizó PCR como se describe en Dugan et al., (2011).

Líneas de ratones para la eliminación selectiva de neuronas GAD65

Se usaron las siguientes líneas de ratones obtenidas de The Jackson Laboratories (Bar Harbor, MN): Gad2-IRES-Cre (GAD^{CRE} , $Gad2^{tm2(cre)Zjh/J}$, stock010802) en las que la recombinasa CRE se expresa bajo el promotor de GAD65 (Taniguchi et al., 2011); ROSA26-DTA (ROSA26DTA, B6. 129P2-Gt (ROSA)26Sor^{tm1/DTA-Lky/J}, stock 009669) en la que se expresa la toxina de la difteria por cruza con una línea que exprese la recombinasa CRE (Voehringer et al., 2008).

Los homocigotos Gad2-IRES-Cre fueron cruzados con ratones CD-1 y los heterocigotos resultantes fueron cruzados con homocigotos ROSA26-DTA para obtener ratones transgénicos portadores de ambos alelos o sólo el alelo ROSA26-DTA. En cada caso, se usó un total de cuatro pares de hembras/machos homocigotos que fueron analizados y se detectó el fenotipo en las camadas provenientes de estos cuatro pares cruzados entre ellos, con un total de cuatro camadas independientes por cruza.

Para la genotipificación de estos ratones se usaron los siguientes primers: GAD^{Cre} ; el tipo silvestre con el primer directo 9981 (5' CTT CTT CCG CAT GGT CAT CT), el primer directo para el mutante fue el 9983 (5' AAA GCA ATA GAC TCA CAA ATT TAC) y el primer reverso para ambos fue el 9982 (5' CAC CCC ACT GGT TTT GAT TT).

Para ROSA26^{DTA}; para el mutante se usó el primer directo 12211 (5' CCA AAG TCG CTC TGA GTT GTT ATC), el primer reverso para el mutante fue el 8824 (5' CTC GAG TTT GTC CAA TTA TGT CAC), el primer directo para el tipo silvestre fue el 0IMR3621 (5' CGT GAT CTG CAA CTC CAG TC) y el primer reverso para fue el 0IMR8546 (5' GGA GCG GGA GAA ATG GAT ATG).

1.5.2 Cultivo de embriones

Embriones de rata fueron obtenidos por Cesárea de ratas Sprague Dawley preñadas como se ha descrito anteriormente para embriones de ratón (de Carlos et al., 1996) e incubados en 5ml de suero de rata o en suero de cabra (69023, Sigma) conteniendo 1% de penicilina-estreptomina (15070-063, Gibco) siendo gasificados constantemente con carbógeno (95% de oxígeno/ 5% de dióxido de carbono). En cultivos control confirmamos que el crecimiento tanto en suero de rata como en suero de cabra era

similar. El medio de incubación fue siempre cambiado una vez después de 12 horas de cultivo. Después del cultivo por 24 horas los embriones fueron fijados en 4% de PFA en PBS seguido por la tinción del cerebro completo. Las siguientes proteínas recombinantes (todas obtenidas de R&D systems, Minneapolis, MN) fueron añadidas al medio de cultivo como se indica en la sección de resultados a una concentración de 40ng/ml cada uno: Recombinant rat ROBO 1/Fc Chimera (1749-RB-050), Recombinant human ROBO 2/Fc Chimera (3147-RB-050), NCAM-C56 Recombinant human NCAM-1/CD56 (2408-NC-050) o Ig-Fc Recombinant human IgG1 Fc, Human IgG1 (110-Hg-1-100).

1.5.3 Cultivo celular

La parte ventral del cerebro medio fue obtenido y disociado como se describió previamente (Tamariz et al., 2010). Las células disociadas fueron diluidas a una concentración de 1×10^3 por mililitro en DMEM (11995, Gibco) suplementado con 1% de penicilina-estreptomicina y L-glutamax (35050079, Gibco) y sembradas en cubreobjetos estériles (12mm, GG12, Knitell glass, Braunschweig, Alemania) previamente recubiertos con poly-D-Lisina (P4707, Sigma) y por las siguientes proteínas como se indica en la Figura 14: Fibronectin (F0895, Sigma), Recombinant rat ROBO 1/Fc Chimera, Recombinant human ROBO 2/ Fc Chimera, NCAM-C56 Recombinant human NCAM-1/CD56 o Recombinant human IgG1/Fc chimera. Los cubreobjetos fueron recubiertos por medio de una incubación en cajas de 24 pozos con poly-D Lisina (0.2mg/ml en PBS) en una incubadora a 37°C con 5% de CO₂, después fueron lavados tres veces por una hora con agua estéril, posteriormente incubados con las proteínas por cuatro horas (40ng/ml cada uno en PBS) en la incubadora a 37°C con 5% de CO₂ y lavados de nuevo tres veces y usados inmediatamente para cultivo. Las proteínas en solución fueron añadidas dos horas después de que el cultivo fue iniciado a una concentración de 40ng/ml como se indica en la Figura 14E. Después de 24 horas en cultivo a 37°C/5%CO₂, los cubreobjetos fueron fijados en 4% de PFA in en PBS e inmunoteñidas como se indica abajo.

1.5.4 Marcaje neuronal retrógrado

El marcaje fue realizado como se describió previamente (Auclair et al., 1999). Se empleó Dextran-fluoresceína o Dextrán-rhodamina (3,000 M.W., D3308, Molecular Probes). El Dextran fue diluido en agua estéril (5µl) hasta lograr una solución viscosa y se depositó en la punta de agujas de 0.05mm de diámetro (26002-10, Fine Science Tools, Foster City, CA) permitiendo su desecación. Los embriones se fijaron en cajas Petri con una cama de silicón en el fondo y conteniendo solución Ringer y se hicieron punciones con las agujas con el dextrán fluorescente en las zonas de interés. Después del marcaje, los embriones se incubaron a 35°C durante cuatro horas con flujo constante de carbógeno y se fijaron con PFA 3.5%. Posteriormente se extrajeron los cerebros que fueron inmuno-teñidos como se describe abajo.

1.5.5 Inmunotinciones

El procedimiento de inmunotinción fue igual para los embriones de rata o ratón usados. Los embriones fueron fijados con paraformaldehído al 4% (PFA) en buffer de sales de fosfato (PBS, 10010-0566, Molecular probes, Grand Island, NY) por 2 a 6 horas dependiendo del estadio de desarrollo. Se disecaron los embriones para obtener el cerebro completo que fue posteriormente lavado diez veces por 10 minutos cada una en PBS.

Cada cerebro fue incubado para bloqueo de tinción no específica en suero de cabra al 10% (16210072, Gibco, Life technologies, Grand Island, NY) en PBS por 30 minutos y lavado por 10 minutos en PBS. El anticuerpo primario fue diluido en la solución para incubación compuesta por PBS con 0.3% de Tritón X-100 (T8787, Sigma, St. Louis, MO) y 10% de suero de cabra. Los cerebros fueron incubados en los anticuerpos primarios (Ver Tabla 1) de 16 a 20 horas a 4°C con agitación suave.

Después de la incubación, las muestras fueron lavadas diez veces por 10 minutos en PBS a temperatura ambiente. Un segundo bloqueo fue realizado como se describe arriba, seguido de dos horas de incubación en el anticuerpo secundario diluido 1:1000

(ver Tabla 2) en solución para incubación. Después de diez lavados de 10 minutos cada uno en PBS a temperatura ambiente, los cerebros fueron hemidisecados cortándolos por la línea media dorsal y ventral y montados en láminas de vidrio con la cara pial hacia arriba en 10% de glicerol en PBS conteniendo 0.4mg/ml de DABCO (290734, Sigma).

Los cortes de embrión (30µm de grosor) fueron colectadas en laminillas SuperFrost plus (VWR, 48311-703, Randor, PA) y secadas a temperatura ambiente por 4 horas. Desde este punto, los cortes y las células cultivadas sobre cubreobjetos fueron sometidos al mismo procedimiento de inmunoteñido.

Las muestras ya secas fueron lavadas tres veces con PBS por 5 minutos cada una e inmuno-teñidas por incubación de la mezcla del anticuerpo primario y la solución de incubación de 12 a 16 horas a 4°C (Ver Tabla 1). Posteriormente, las muestras fueron lavadas tres veces por 10 minutos cada una en PBS, incubadas en la mezcla del anticuerpo secundario y la solución de incubación por 2 horas a temperatura ambiente; posteriormente se lavaron 3 veces por 10 minutos cada una en PBS y montadas con DABCO-glicerol.

Tabla 1. Anticuerpos primarios empleados.

anti-NCAM	Sigma, C9672
anti-NCAM	Sigma, SAB2501672
anti-GAD65	EMD Millipore, MAB351, Billerica, MA
anti-TH	Pelfreez, P40101-0
anti-GAD67	Chemicon MAB5406, Temecula, CA
anti-GABA	Sigma, A2052
anti-Robo 1 and 2	regalo de Elke Stein, Yale University
anti-Robo 1	Sigma, WH0006091M1
anti-Robo 2	Sigma, WH0006092M1
anti-TAG1	R&D, AF4439, R&D Systems, Minneapolis, MN
anti-L1	Millipore, CBL275

Tabla 2. Anticuerpos secundarios empleados.

Cy3 cabra anti-ratón	Molecular probes, A10521, Eugene, OR
Cy3 cabra anti-conejo	Molecular probes, A10520
Fluor Alexa 488 cabra anti-conejo	Invitrogen, A11034, Life Technologies, Grand Island, NY
Alexa fluor 488 cabra anti-raton	Invitrogen, A11029
Avidin Alexa fluor 488 conjugate	Invitrogen, A21370
Anti-cabra biotinylated	Invitrogen, A21370
ABC kit standard Vector	Jackson immuno research, PK6100, West Grove, PA

1.5.6 Análisis por microscopía

Los siguientes microscopios confocales fueron usados: Zeiss LAM510 META, Zeiss LSM 780 y NIKON Eclipse E600 PCM 2000. Estos microscopios facilitaron una visibilidad de los axones hasta un grosor de 0.5 a 2 μm por corte digital en Z eje Z.

1.5.7 Análisis estadístico

Para los resultados de medición de la longitud de los axones se analizaron muestras de forma aleatoria usando el modelo general lineal (SAS institute Inc., Cary, NC) con un nivel de significancia establecido de <0.05 . La prueba de mínimos cuadrados fue utilizada para analizar las diferencias entre cada tratamiento. Para los resultados de colocación de axones se utilizó un procedimiento de frecuencias por medio del coeficiente de correlación de Pearson (SAS institute Inc., Cary, NC).

2. Resultados

2.1 Formación de la vía negro-estrial y tractos adyacentes

Para el inicio del análisis, se realizaron inmunotinciones para hidroxilasa de tirosina (TH) y para el marcador temprano de axones β -III-Tubulina en embriones de rata de los estadios embrionarios más tempranos de la proyección dopaminérgica (E12 y E13). Se observó que en el estadio E12 (Figura 5A) las primeras proyecciones del núcleo ventral del cerebro medio (MBv) o núcleos A9 y A10 alcanzan la parte caudal del diencéfalo.

Paralelamente se observó que en la misma etapa el cerebro en desarrollo contenía ya fibras β -III-Tubulina⁺ en la región ventral y a todo lo largo de su eje longitudinal (1B). En una vista más cercana, es posible observar que los primeros axones TH⁺ crecen en una región que ya contiene el haz de fibras no-dopaminérgicas (Figura 5D-E).

TH / β -3-Tubulina

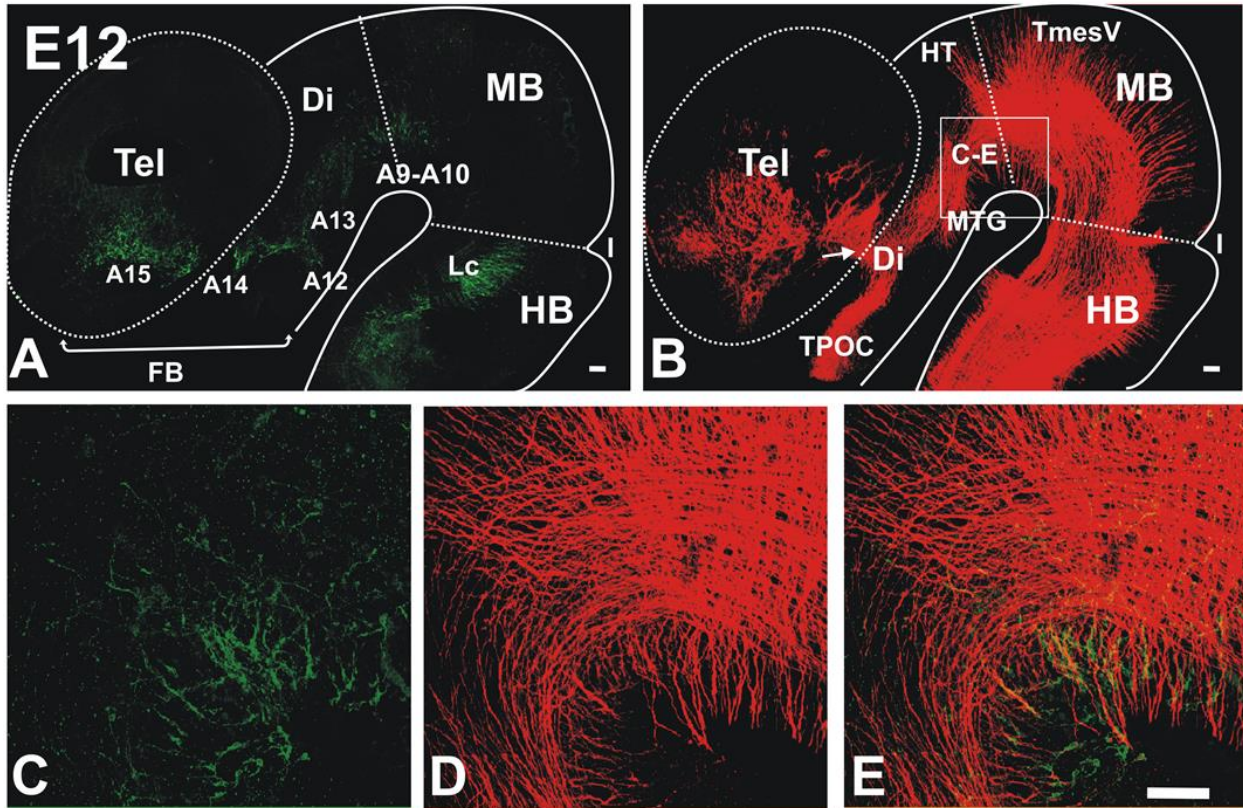


Figura 5. Crecimiento de axones dopaminérgicos mesencefálicos creciendo en territorio de axones pre-existent no-dopaminérgicos (E12). Cerebros completos de rata de E12 fueron inmunoteñidos (A-E) y cortados a lo largo de la línea dorsal y ventral; los hemisferios resultantes fueron montados en plano. Imágenes de confocal fueron colectadas y son presentadas en proyecciones en el plano Z (A-E). Inmunotinción contra hidroxilasa de tirosina (TH, verde). La localización aproximada de los núcleos dopaminérgicos está indicada como A9-A15. (B,D,E) Tinción contra β -III-tubulina para visualizar tractos axonales (rojo). (C-E) muestra magnificaciones de la zona ventral del mesencéfalo y parte del diencefalo (di) que se indica en (B). Abreviaturas: Telencéfalo (Tel), Diencefalo (Di), Istmo (I), cerebro posterior (HB), cerebro medio (MB), Locus Ceruleus (Lc), tracto de la comisura postóptica (TPOC), tracto habenular (HT), tracto mamilotegmental (MTG) núcleo mesencefálico del nervio trigémino (TmesV). Barra de calibración: 100 μ m.

En el estadio E13, los axones TH⁺ alcanzan la parte ventral del diencefalo en ruta hacia el estriado en desarrollo, donde se ve claramente una gran haz de fibras no-dopaminérgicas (Figura 6). En la parte rostral del cerebro este haz de fibras corresponde a las fibras mediales del cerebro anterior (MFB) que en el adulto lleva las fibras ascendentes dopaminérgicas del MBV (Nieuwenhuys et al., 1982; Geeraedts et al., 1990).

TH / β -3-Tubulina

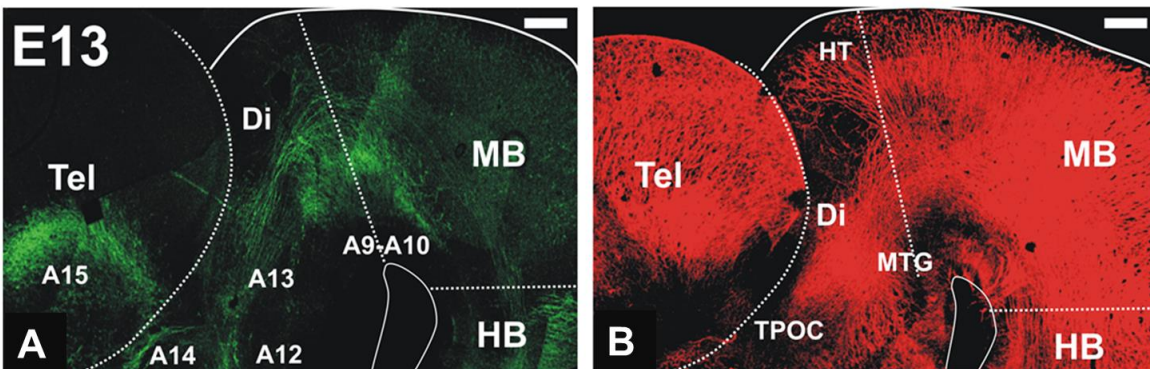


Figura 6. Los axones dopaminérgicos mesencefálicos crecen en territorios que contienen axones pre-existent no-dopaminérgicos (E13). Cerebros completos de rata de E13 fueron inmunoteñidos (A,B) y cortados a lo largo de la línea dorsal y ventral; los hemisferios resultantes fueron montados en plano. Imágenes de confocal fueron colectadas y son presentadas en proyecciones en el plano Z. Inmunotinción contra hidroxilasa de tirosina (TH^+ , verde). La localización aproximada de los núcleos dopaminérgicos está indicada como A9-A15. (A) Tinción contra β -III-tubulina para visualizar tractos axonales (rojo). (B) muestran magnificaciones de la zona ventral del mesencéfalo y parte del diencefalo. Abreviaturas: Igual que en Figura 1. Barra de calibración: 100 μ m.

Por experimentos del laboratorio (no publicados) hechos con explantes de MBv cultivados en geles de colágena (ver Figura 4), sabíamos que los axones dopaminérgicos crecían en fascículos formados también por neuronas GABAérgicas.

Para evaluar la posibilidad de que esta interacción ocurriese *in vivo*, primero analizamos si los haces axonales longitudinales descendentes contenían axones inmunoreactivos a GAD65 (descarboxilasa del ácido glutámico 65, enzima característica de poblaciones GABAérgicas).

TH / GAD65 E12

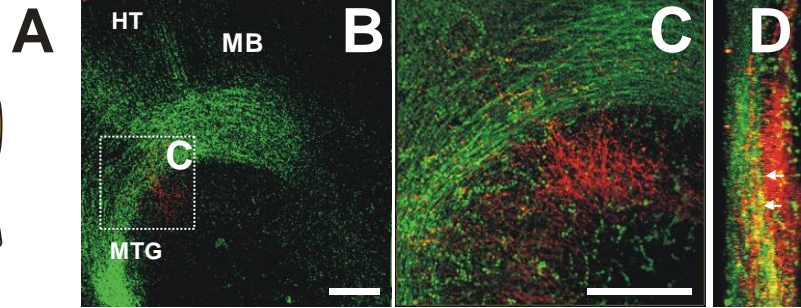
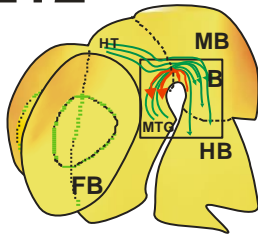


Figura 7. Axones dopaminérgicos proyectan en aposición cercana con axones GAD65⁺ en E12. Se realizó inmunotinción para TH (rojo) y GAD65 (verde) en la etapa más temprana (E12) de proyección de las neuronas TH del Mesencéfalo ventral (MB). Podemos observar en **A**, la representación esquemática de un cerebro embrionario donde las fibras GAD65 (línea verdes), se encuentran en la misma trayectoria de las fibras TH⁺ (líneas rojas). **B**. Inmunotinción que muestra la proyección TH⁺ (rojo) Y GAD65+ (verde) siendo un acercamiento de (**A**). **C** es un acercamiento de **B**, donde se ve con mayor aumento que fibras TH⁺ proyectan en territorio de fibras GAD65+. **D**, muestra una rotación digital de **C**, donde muestra que las fibras TH⁺ van de una zona marginal (cara interna del tubo neural) a la zona pial donde se encontrarse con las fibras GAD65+. Barras de calibración 100 μ m.

En E13, esta interacción entre axones GAD65⁺/TH⁺ es mucho más evidente, ya que se observa un fascículo GAD65 a lo largo del recorrido que hacen los axones dopaminérgicos hacia la zona del estriado, muy similar a lo observado con las tinciones para β -III-Tubulina (comparar Figura 5B y Figura 8). Esta observación sugiere que muchos de los axones del MFB son GAD65. Por medio de imágenes confocales se observa una clara cercanía entre los axones GAD65⁺ y los axones TH⁺ (Figura 8 D-K) a lo largo de la trayectoria de los axones TH hacia el estriado. Esta interacción fue observada tanto en cortes ortogonales realizados de forma digital (Figura 8 I y K) como en cortes histológicos transversales (Figura 8L).

TH / GAD65

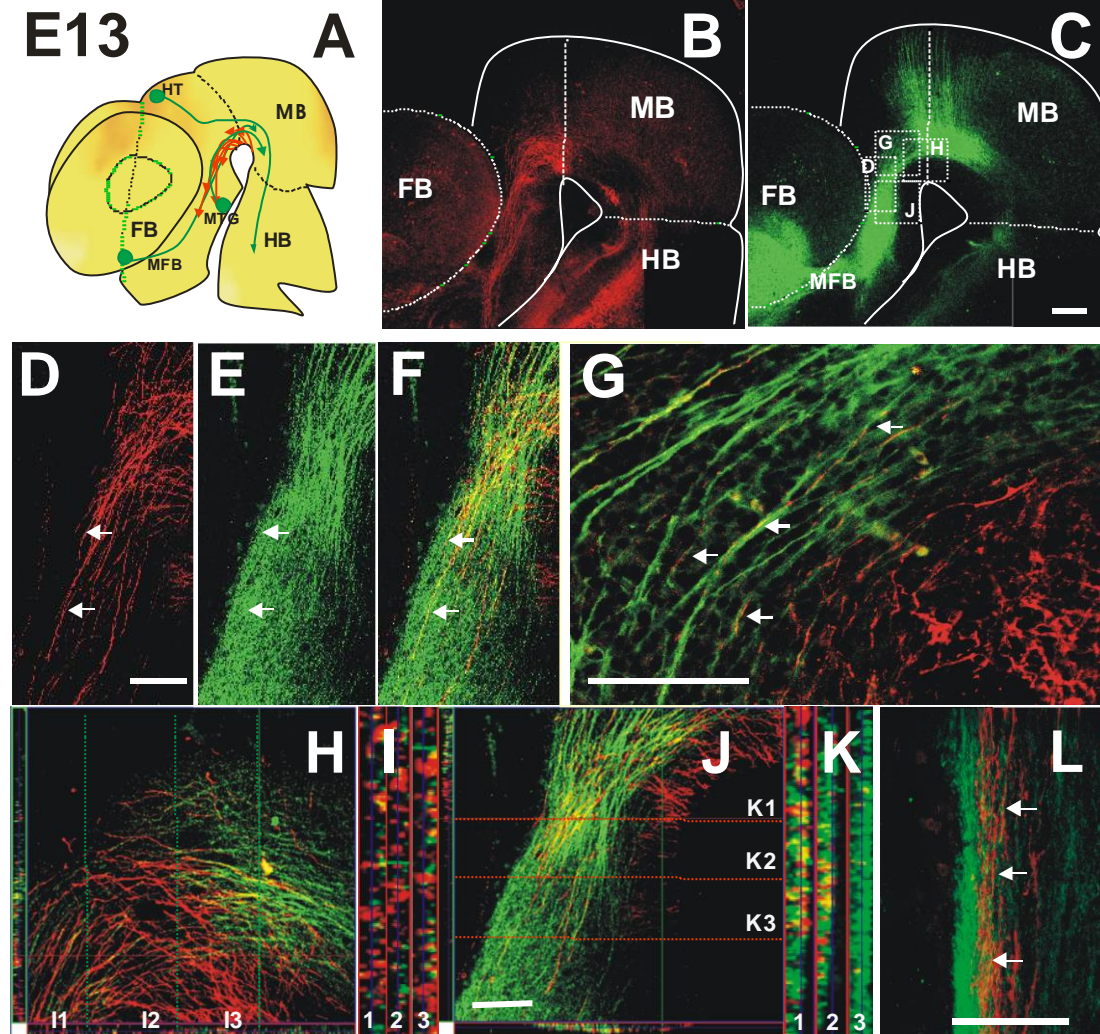


Figura 8. Axones dopaminérgicos proyectan en aposición cercana con axones GAD65⁺ durante su crecimiento en el diencefalo en E13. Se realizó inmunotinción para TH (rojo) y GAD65 (verde) en E13. A. Esquema que resume la trayectoria de los axones TH sobre fascículo GAD65. B y C muestran una vista panorámica de la tinción para TH y GAD65. D-F. Muestran una magnificación de las fibras TH que crecen en el fascículo descendente GAD65 (flechas indican colocalización de fibras GAD65/TH). G es un acercamiento de un solo plano focal donde se ven claramente que las fibras ascendentes TH están sobre las fibras GAD65 (flechas). H-L. Análisis por medio de proyecciones ortogonales para cuantificar la incidencia de colocalización entre axones TH y GAD65. Barra de escala: 100 μ m.

Esta misma relación entre axones TH⁺/GAD65⁺ se observa en el estadio E14, tanto en embriones completos como en cortes histológicos coronales, en los que claramente se observa que los axones TH⁺ están dentro de un fascículo GAD65 robusto que forma, el MFB lo que ya es evidente en este estadio (Figura 9). Se puede observar también en cortes ortogonales digitales, que estas fibras TH⁺ interactúan con las fibras GAD65⁺ (Figura 9).

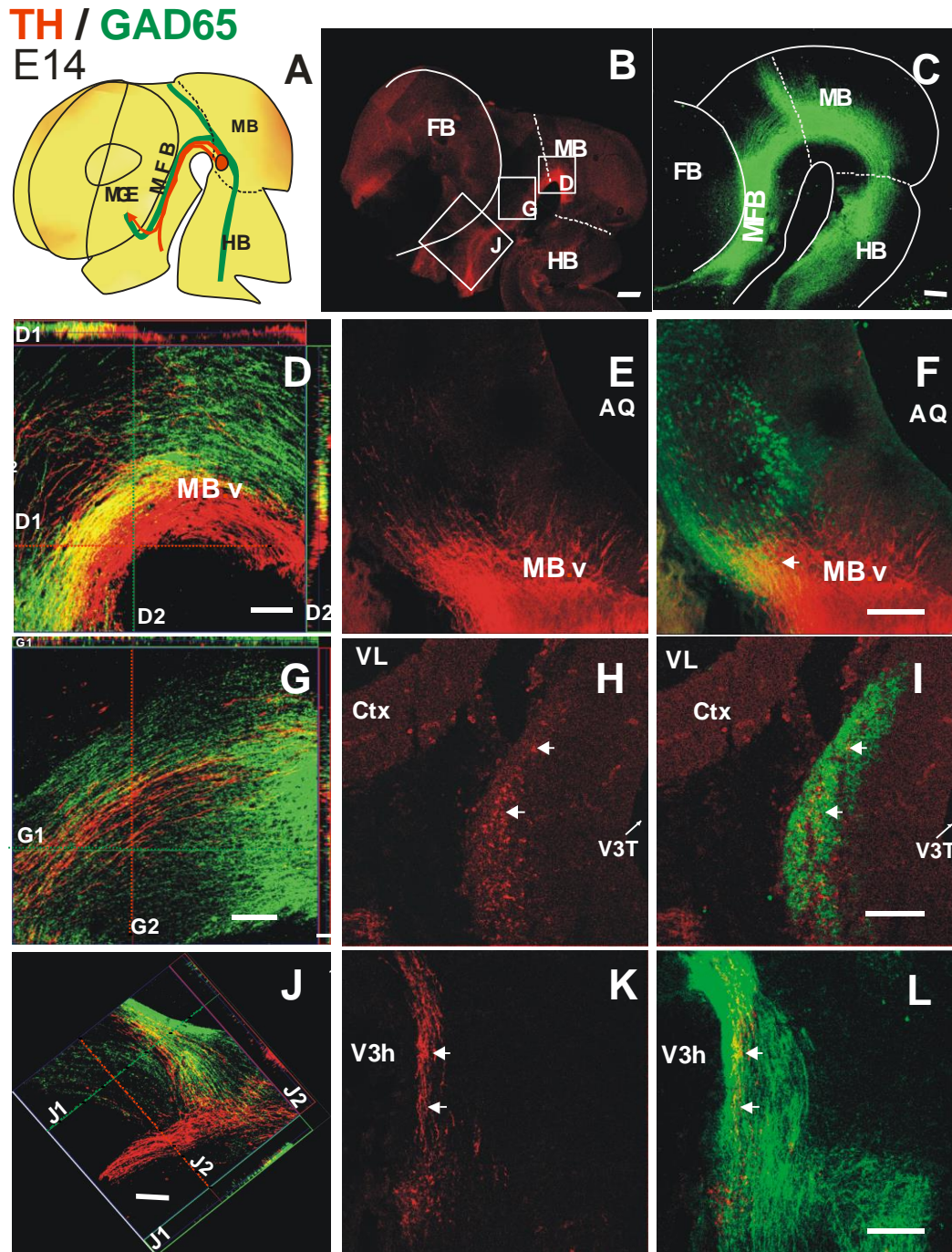


Figura 9. Los axones dopaminérgicos crecen como parte de un fascículo de axones GAD65⁺ en el prosencéfalo (E14). **A.** Esquema que resume el crecimiento de los axones TH⁺ (rojo) sobre el MFB GAD65⁺ (verde) en E14. En **B** y **C** se muestra la inmunotinción en E14 para TH⁺ y GAD65 obtenidas de dos embriones distintos. **D** y **G.** Vista lateral en el hipotálamo donde hay colocalización de fibras TH/GAD65. **E-F** muestran un corte coronal donde se observan fibras TH⁺ creciendo adyacentes a fibras GAD65⁺ en el mesencéfalo ventral (MBv). **H-I.** Corte coronal en área hipotalámica donde se observan fibras longitudinales TH⁺ dentro de un gran fascículo GAD65⁺ (V3T, tercer ventrículo talámico). **J.** Vista lateral de la entrada al telencéfalo donde fibras TH crecen en dos direcciones, una en dirección hacia el estriado y otra hacia la zona cortical ventral. **K-L.** Cortes coronales en área del 3er ventrículo hipotalámico (V3h) donde se muestran fibras TH⁺ sobre el fascículo GAD65. Barra de calibración, 100µm.

2.2 Análisis de las vías axonales ascendentes y descendentes que se encuentran adyacentes a la vía negro-estrial

Para determinar el origen de las fibras no dopaminérgicas que preceden a los axones dopaminérgicos, realizamos un marcaje con Dextran-Rhodamina en la parte ventral del cerebro medio en los estadios E12.5 y E13 que reveló sólo axones descendentes que proyectan hasta esta región (Figura 10). El marcaje de la región dopaminérgica caudal, en E12.5 revela cuerpos neuronales localizados en la región del hipotálamo que pueden corresponder al origen del tracto mamillo-tegmental (MTG). En E13, se observa marcaje del diencefalo en la entrada de los axones dopaminérgicos al telencéfalo en la parte posterior de esta región (Figura 10D-J). Estos resultados revelan que en este estadio los haces de fibras longitudinales están compuestos en realidad por segmentos de diferentes poblaciones neuronales a lo largo del eje longitudinal del cerebro y que no existe un tipo axonal que proyecte a todo lo largo del mismo. Por su localización, este haz de fibras es aparentemente el MFB. La inmunotinción de TH en estas mismas preparaciones con los marcajes retrógrados en E12.5, indican que los axones dopaminérgicos que emergen del MBV proyectan en relación cercana con los axones marcados con Dextrán fluorescente (Figura 10B y C).

Posteriormente, por medio de marcajes retrógrados combinados con inmunotinción de GAD65 se confirmó que los axones del MTG, de la región hipotalámica y del telencéfalo, expresan GAD65 (Figura 10 D-J y Figura 10 A-D).

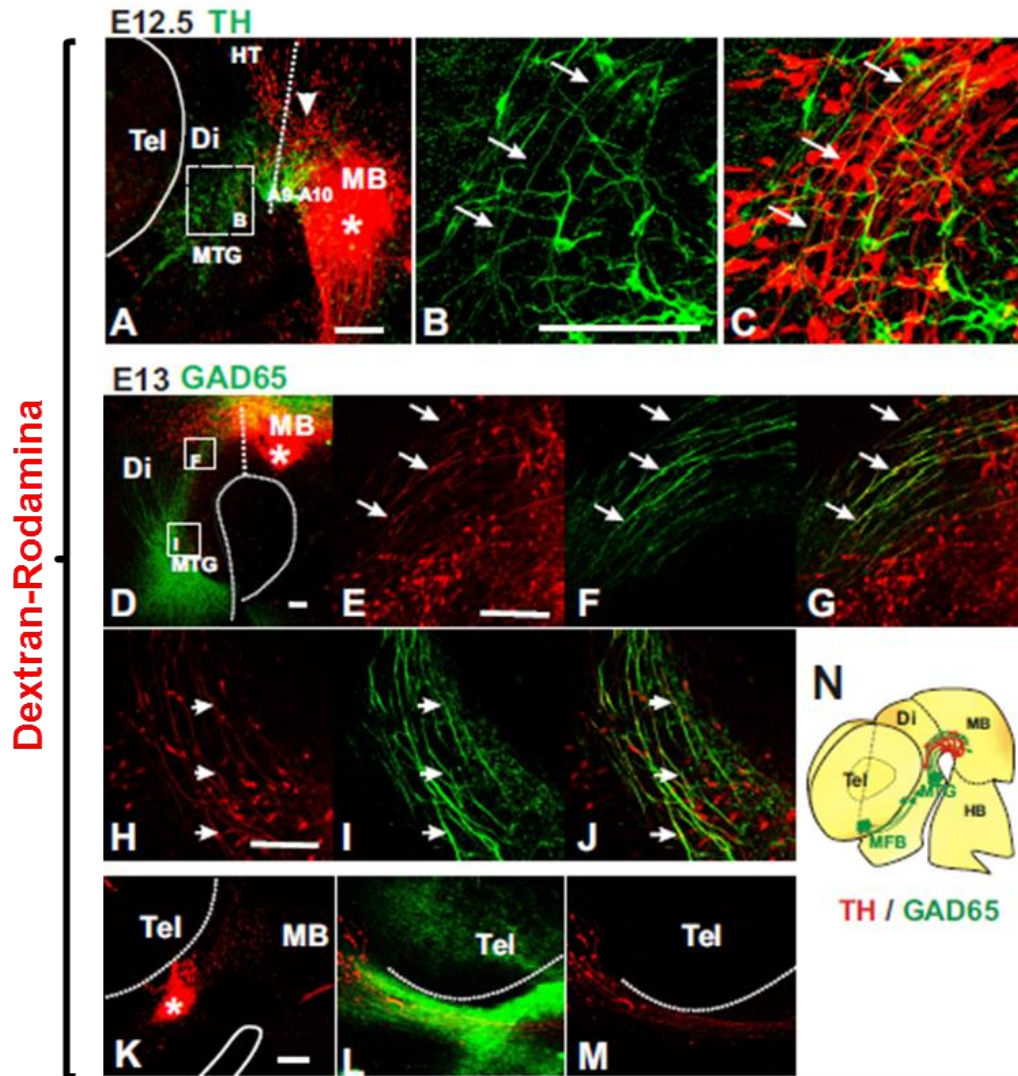


Figura 10. Vías ascendentes GAD65+ del MTG se encuentran asociadas a vías descendentes TH+ del MB. **A y C** muestra marcaje neuronal retrógrado en la región caudal del mesencéfalo (asterisco en **A**) con Dextran-Rodamina (rojo) y una inmunotinción para TH (**B**, verde). Se observa en **B** la parte distal de los somas TH donde se observa claramente en **C** la oposición entre axones del núcleo hipotalámico MTG y las TH provenientes del MB (flechas en **B-C**). **D-M** muestran inmunotinción para GAD65 (verde) y dos diferentes marcajes con Dextran, rodamina (rojo, asteriscos). **E-G** (señalada el área en **D** como **F**) muestran colocalización entre axones provenientes del mesencéfalo ventral y las GAD65 del MTG (flechas) en un solo plano focal. **H-J** muestra área señalada en **D**, donde esta relación entre axones de MB y axones GAD65 coinciden en un solo plano focal. **K-M** muestran un marcaje en la parte anterior del hipotálamo donde en acercamientos (**L y M**) muestran axones provenientes de zonas corticales y que ascienden por la misma trayectoria que los axones GAD65. H Barra de calibración, 100µm.

Como observamos en las Figuras 7-10, hay una constante relación física entre los axones ascendentes TH⁺ durante su trayectoria hacia el estriado y axones descendentes GAD65⁺ que forman parte del MFB (Nieuwenhuys et al., 1982), indicando que, probablemente, los axones GAD65⁺ sirven como andamio y que este andamio está conformado por diversos núcleos.

2.3 Análisis de la expresión de proteínas de adhesión de la superfamilia Ig NCAM, Robo1 y Robo2 en los fascículos TH⁺ y GAD65⁺

Nuestros resultados sugieren que los axones dopaminérgicos interactúan con axones GAD65⁺ a lo largo de su trayectoria hacia el estriado. Para identificar las moléculas que podrían estar mediando esta interacción, se analizó la expresión de moléculas de adhesión en ambos grupos axonales.

Realizamos diferentes inmunotinciones para proteínas de la Superfamilia Ig como L1, TAG-1 y NCAM. De estas proteínas, sólo NCAM fue detectada en patrones que se superponen a los fascículos GAD65⁺ y TH⁺ en las etapas analizadas (Figura 11). La expresión de la proteína NCAM fue detectada en MBV en neuronas TH⁺ en E12 (8 A-H) y a lo largo de la trayectoria de dopaminérgica en E13 (Figura 11 I-M). Además, NCAM, fue detectado en la mayoría de los axones GAD65⁺ en el diencéfalo ventral (Figura 11 N-Q).

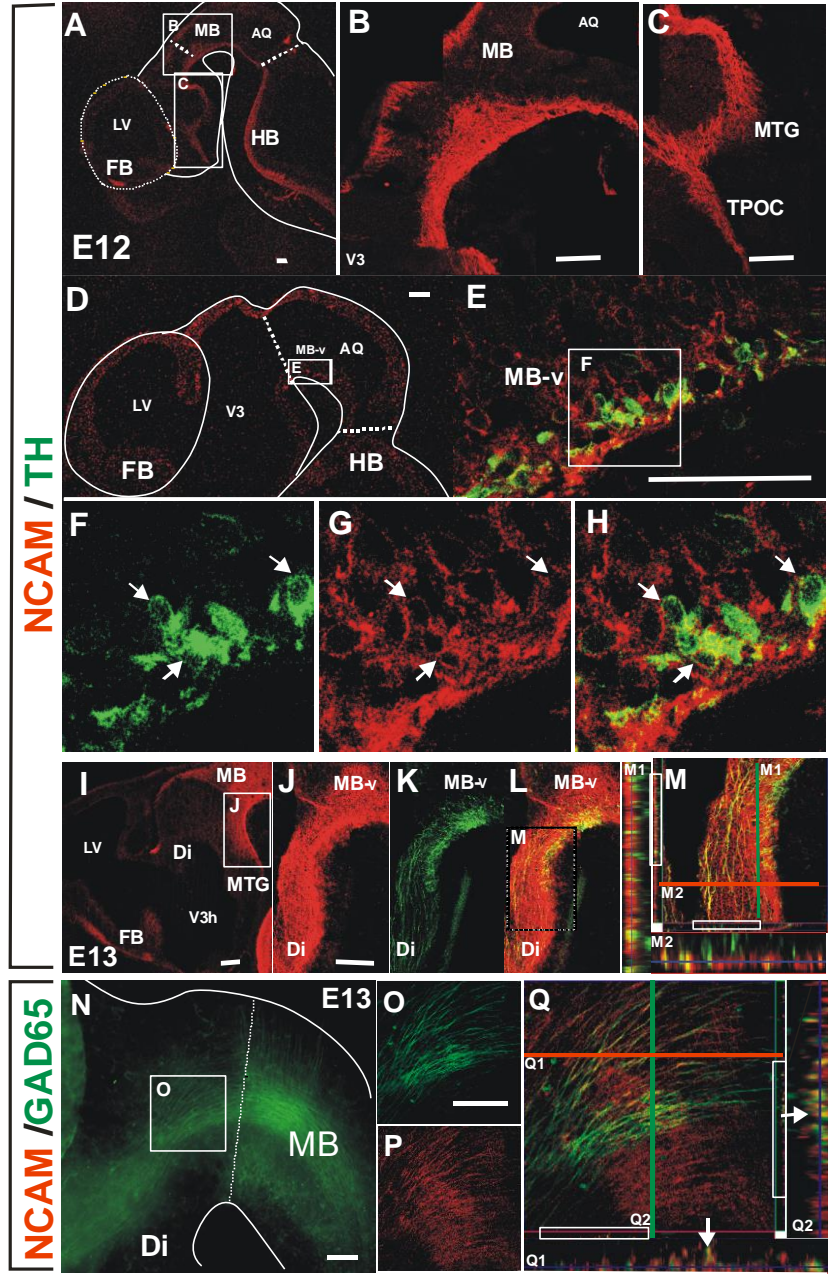


Figura 11. Expresión de NCAM y en axones TH⁺ y axones GAD65. A y D son fotos panorámicas de inmunotinción que muestra la expresión de NCAM en cortes de cerebros embrionario de rata de E12; los recuadros de **A**, muestran la área de **B** y **C**, donde se observa que la expresión de NCAM se encuentra en fibras del cerebro medio (MB). En **D** se muestra una vista panorámica de un corte sagital en el que se observa la expresión de NCAM; el recuadro marcado como **E** es un acercamiento de una doble inmunotinción contra NCAM y TH mostrando la colocalización de NCAM y TH en cuerpos neuronales del cerebro medio ventral (MBv), donde en un acercamiento digital (**F-H**) mostramos que los cuerpos TH⁺ expresan en la membrana NCAM. En otro corte sagital en vista panorámica (**I**) se muestra en el hipotálamo fibras NCAM⁺, donde al hacer un acercamiento (recuadro indicado como **J**) en doble inmunotinción NCAM/TH se observan fibras TH/NCAM⁺ (**K-L**). Al realizar cortes digitales ortogonales, podemos distinguir que hay fibras TH expresando NCAM y otras que no expresan NCAM (**M**). En **N**, se muestra una vista panorámica de un cerebro embrionario de E13 con una inmunotinción para GAD65 donde fibras antes observadas (ver Figura 7-8) están en el cerebro medio (MB) y el diencefalo (Di). Al observar la localización para NCAM y GAD65, en un acercamiento (**O-P**) se puede observar que fibras GAD65 colocalizan con fibras NCAM⁺. Al hacer un corte ortogonal digital de **O**, observamos en **Q**, que fibras NCAM colocalizan con fibras GAD65 (flechas en **Q1** y **Q2**). Barra de calibración 100μm.

Dado que en estudios previos se ha demostrado que Robo 1 y 2 poseen propiedades de adhesión (Hivert et al., 2002) y que los axones dopaminérgicos, el MTG, y el tracto de la comisura pre-óptica (TPOC) expresan estas proteínas (Tsuchiya et al., 2009, Dugan et al., 2011, Ricaño-Cornejo et al., 2011), analizamos su papel en la interacción de los axones dopaminérgicos con otros axones. Por estudios previos, sabíamos que estas proteínas se expresan sólo en una fracción de las TH⁺ del MBV (Dugan et al., 2011). Nosotros confirmamos estas evidencias (Figura 12), observando que la señal de Robo 1 colocaliza con sólo del 12 al 20% de la señal de TH de E12 a E15 (12-I). Por otro lado, observamos que Robo 2 colocaliza con 4% de las neuronas que tienen señal para TH en E12, y que posteriormente esta colocalización se incrementa al 29% en E13 y decrece a 18% en E14 (Figura 12J). También observamos que existe un fascículo dorsal a las neuronas dopaminérgicas expresando Robo 1 y Robo 2 (Flechas en Figura 12 C-H).

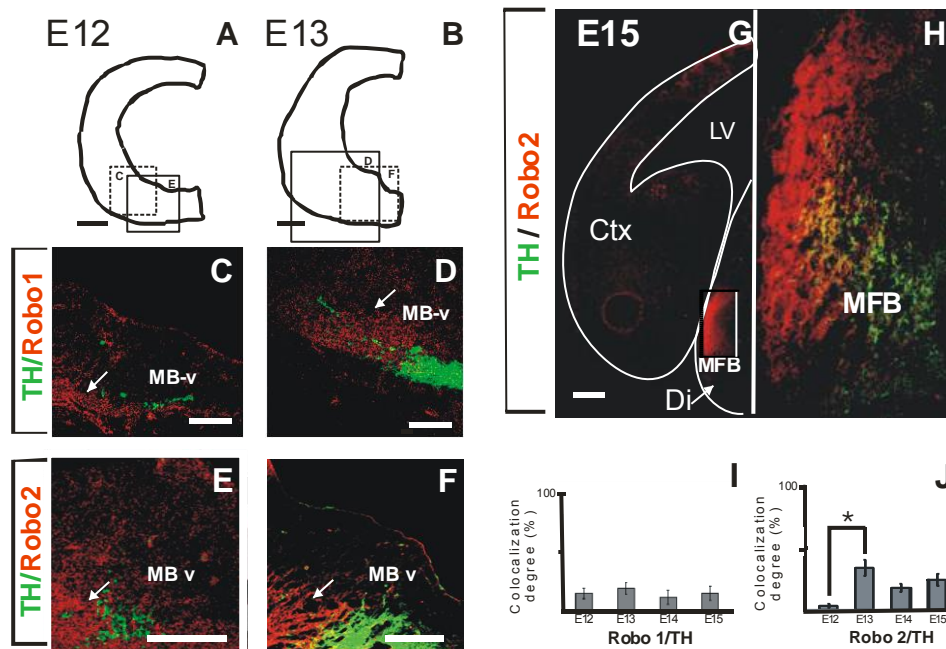


Figura 12. Baja expresión de Robo 1 y 2 en neuronas TH⁺ de en estadios tempranos de la proyección Negro-estrial. Inmunotinción de Robo 1 y 2 en embriones de rata de E12 a E15. **A-B** son esquemas que representan el sitio de corte coronal a la altura del mesencéfalo ventral en E12 y E13 respectivamente. **C-F** acercamiento donde se observa (flechas) que las fibras TH (verde) crecen adyacentes a fascículos Robo 1 o Robo 2 (rojo). **G-H** muestran inmunotinción en E15 en un corte coronal a la altura del hipotálamo, donde un gran fascículo Robo2⁺ contiene fibras TH⁺ (Flecha). **I y J** muestran la correlación que existe entre la expresión de TH y Robo 1 o Robo 2 en diferentes estadios embrionarios, donde el asterisco muestra una diferencia significativa de expresión mayor en E13 en comparación con E12 para Robo 2, pero menor al 40%. Barra de calibración, 100µm.

Estos datos indican que NCAM está expresado en axones TH⁺ y GAD65⁺ en el estadio en el que el tracto dopaminérgico está en crecimiento recorriendo su trayectoria hacia el estriado, que el tracto pre-existente que formará el parte del MFB expresa predominantemente Robo 1 y 2 y que una fracción de las TH⁺ expresan estas proteínas. Por lo tanto, sugerimos que estas proteínas NCAM, Robo 1 y Robo2 podrían estar participando en la interacción de estos tipos axonales durante la proyección dopaminérgica.

2.4 Efecto de NCAM y Robo 1/2 en la proyección negro-estrial en embriones en cultivo

Con el objetivo de verificar la participación de las proteínas NCAM y Robo en la proyección dopaminérgica realizamos cultivos de embriones completos de rata en la presencia o ausencia de la versión soluble de estas proteínas. Éstas consisten en un fragmento del dominio extracelular, que al menos para Robo, se sabe interfiere con la función normal de esta proteína (Ricano-Conrnejo et al., 20011). Después del cultivo de 24 horas, los embriones fueron inmunoteñidos para visualizar TH ó β -III-Tubulina.

Los cultivos fueron realizados con embriones al inicio de la proyección dopaminérgica (E12, Figura 13A). En los cultivos controles, se observó la proyección estereotípica en la que los axones TH⁺ giran a la parte ventral del diencefalo, proyectando hacia el área ventral del preteectum (PT) y al tálamo dorsal (DT), a través del cual alcanzan el tálamo ventral (VT) (n=14) (flechas en Figura 13C). En contraste, en sólo uno de los 10 embriones cultivados con la versión soluble de NCAM observamos el viraje rostral, en 7 de ellos observamos proyección dorsal en dirección del tálamo alcanzando la placa del techo y en 2 de ellos, los axones proyectaban caudalmente hacia el cerebro anterior; sólo en algunos de ellos los axones TH⁺ alcanzaron el tálamo dorsal (Figura 13 D). El efecto de la versión extracelular soluble para Robo 1 y 2 fue aún más dramático pues ningún axón alcanzó el VT en los 12 embriones cultivados y en 10 de ellos se presentaron proyecciones anormales dorsales (Figura 13 E). Además, en los embriones cultivados control inmunoteñidos para β -III-Tubulina, se observó una distribución

normal de los andamios axonales (Figura 13 F). En cambio, en embriones tratados con NCAM la tinción para β -III-Tubulina revela una leve alteración en cuanto al grosor de las fibras longitudinales en el MBV y en el diencefalo (Figura 13G) mientras que en los embriones tratados con Robo 1/2, los tractos axonales se encuentran mucho más desorganizados y defasiculados (Figura 13H).

Por lo anterior, estos resultados sugieren que NCAM participa en la proyección dopaminérgica normal y en el establecimiento de los andamios no dopaminérgicos. Estos resultados también apoyan que Robo1/2 participan en la guía de los axones dopaminérgicos y en el establecimiento de los fascículos longitudinales del MFB.

TH / β III Tub

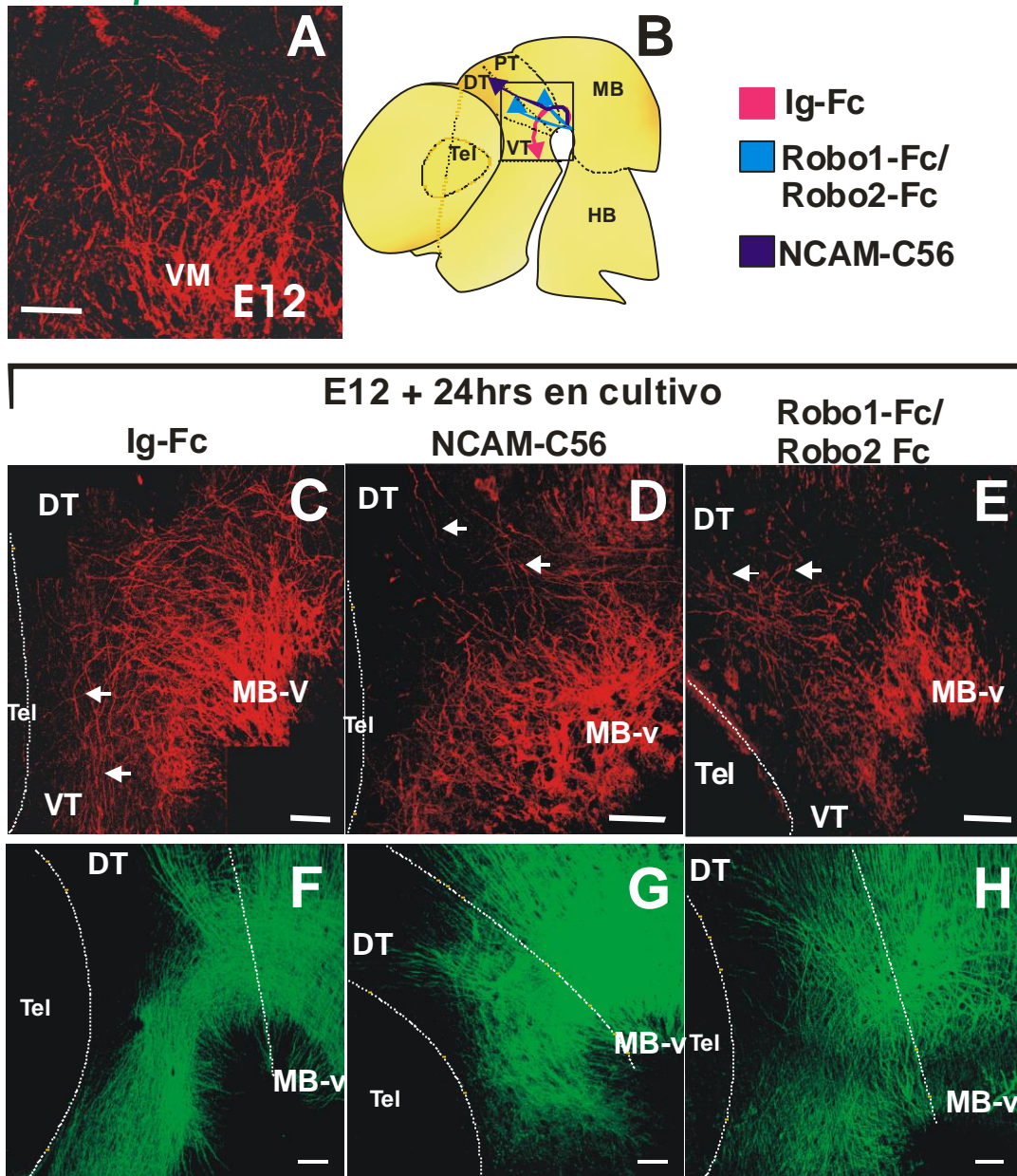


Figura 13. Alteración en la dirección de la proyección dopaminérgica de MBv por acción de NCAM y Robo1/2. Embriones de E12.5 fueron cultivados por 24 horas expuestos a ectodominios de NCAM, Robo1/2 o control Ig-Fc seguidos de inmunotinción para TH (rojo) ó β -III-Tubulina (Verde, B-III-Tub). En **A** se muestra la proyección normal dopaminérgica TH⁺ (rojo) al inicio del cultivo en E12.5. En **B** se muestra un esquema de la proyección dopaminérgica bajo el efecto de las diferentes condiciones de cultivo. En **C** y **F** se observan fibras TH⁺ (flecha) que proyectan en dirección al tálamo ventral (VT), lo que es la proyección normal. **F** muestra un fascículo de fibras que crecen en cultivo de forma similar a lo observado previamente (ver Figura 1B). **D**, proyección TH anormal en cultivos con NCAM-56 y **E** muestra alteración de proyección (flechas) al estar expuestos a Robo1/2. **G** y **H** muestran que hay alteración también en fibras β -III-tubulina (verde) al exponerlas a ambas moléculas de adhesión. Barra de calibración, 100 μ m.

2.5 Análisis del efecto de NCAM y Robo 1/2 en neuronas dopaminérgicas en cultivo provenientes del cerebro medio de embriones de rata

Con el propósito de verificar la relevancia de las proteínas NCAM y Robo como mediadores de la interacción entre axones, analizamos si estas proteínas podrían incrementar el crecimiento axonal cuando están anclados a un sustrato. La zona del MBV fue obtenida de embriones de rata del estadio E12.5, disociada y cultivada en cubreobjetos control o con diferentes sustratos, seguidos de inmunotinciones para TH.

Es importante notar que el cultivo disociado de neuronas fue hecho para indentificar axones TH⁺ que crecieran independientes otros axones que pudieran afectar la interacción con el sustrato o la respuesta a los compuestos del medio de cultivo. (Figura 14 A-D). En el primer experimento se evaluó el crecimiento axonal en cubreobjetos sembrados sobre sustrato de Fibronectina III (FNIII) o en cubreobjetos conteniendo adicionalmente ectodominios NCAM o Robo1/Robo 2 (Figura 14E). La presencia adicional de NCAM en el sustrato incrementó el crecimiento axonal en neuronas dopaminérgicas en comparación con el control creciendo sobre FNIII solamente (Figura 14E). En contraste, cuando el sustrato estaba recubierto con Robo1/2 no se observó un efecto sobre el crecimiento axonal. La especificidad del efecto de NCAM en el sustrato fue confirmada cuando en el medio de cultivo se añadió NCAM soluble; el crecimiento de los axones inducido por NCAM en el sustrato fue inhibido por NCAM soluble (Figura 14E). Sorpresivamente, al añadir Robo1/2 en el medio, también se disminuyó el crecimiento de los axones inducido por NCAM en el sustrato (Figura 11E) tomando en cuenta que Robo1/2 por sí mismas no producen aumento en el crecimiento axonal.

Puesto que ni NCAM ni Robo1/2 tienen efecto basal en el crecimiento normal del crecimiento inducido por FNIII (últimas barras en Figura 14E), esto sugiere que el efecto en el sustrato requiere la participación de NCAM y las proteínas Robo1/2.

Un resultado similar, aunque menos dramático, es el aumento del crecimiento axonal en el experimento donde se usó Laminina como sustrato control (figura 14F). Además, usando este sustrato, también observamos el efecto neutralizante de NCAM soluble y Robo1/2 soluble sobre el efecto causado por NCAM en el sustrato (Figura 14F). Es importante notar, que el crecimiento normal en el sustrato con laminina fue disminuído por la presencia de NCAM soluble (Figura 14F). Esto sugiere también que la interacción

entre NCAM y laminina es requerida para el crecimiento axonal y que parte de la disminución del crecimiento causado por NCAM soluble en sustratos recubiertos con laminina puede ser el resultado de esta interacción.

Resumiendo, podemos decir que NCAM incrementa el crecimiento axonal y que Robo 1 y 2 participan en este efecto.

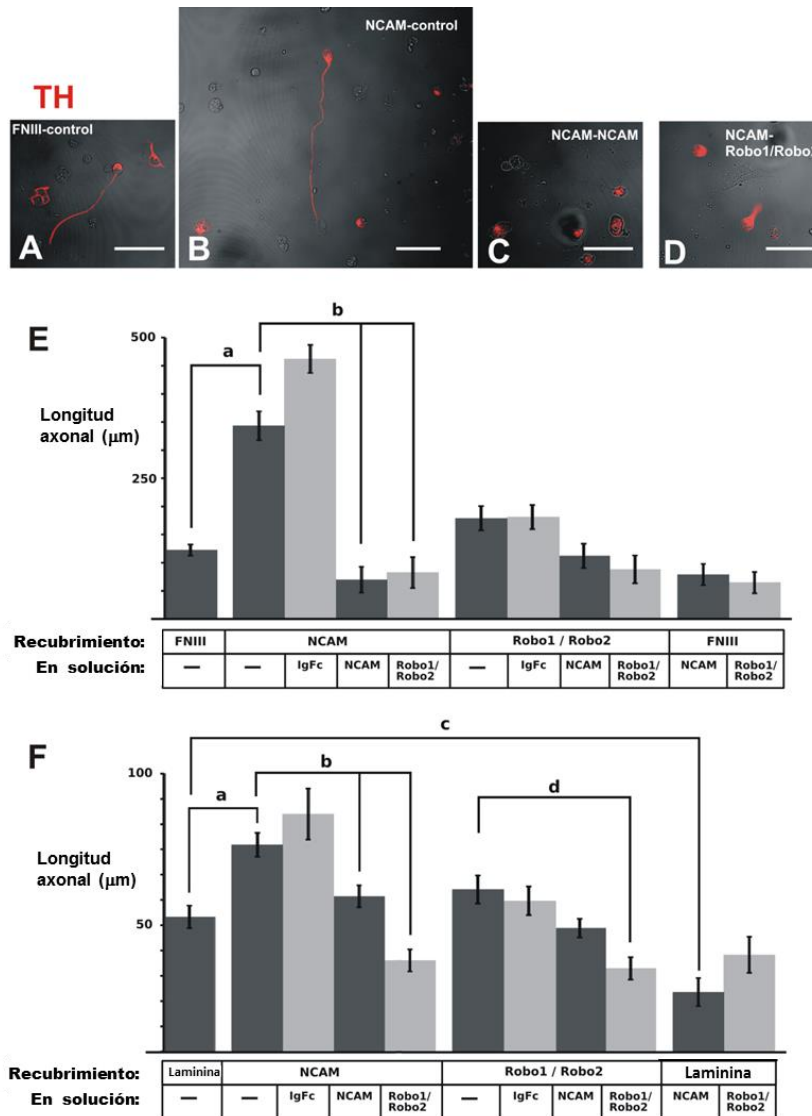


Figura 14. En cultivo, NCAM promueve crecimiento de neuronas TH⁺ y proteínas Robo1/2 inhiben el crecimiento. Células del mesencéfalo ventral fueron disgregadas y cultivadas sobre diversos sustratos y expuestas a moléculas solubles. **A-D** muestran ejemplos de neuronas dopaminérgicas cuyos axones (TH⁺) crecen en diferentes condiciones de cultivo. **E** muestra el crecimiento de axones en fibronectina con los otros ectodominios indicados con diferentes ectodominios en solución. **F**, muestra el crecimiento en un experimento similar al mostrado en **E** pero usando laminina como sustrato base. **a** en **E** y **F**, indican muestran que en comparación con el control, los axones con recubrimiento con NCAM incrementan de forma significativa el crecimiento. **b** en **E** y **F** muestra como Robo ½ decremanta el crecimiento. Barra de calibración, 100µm.

2.6 Análisis de tractos GAD65 y TH en embriones de rata que carecen de las proteínas Slit1/2 y Robo1/2

Estudios previos han implicado a la señal generada por la interacción entre las proteínas Slit/Robo en la proyección dopaminérgica (Bagri et al., 2002, Dugan et al., 2011). Adicionalmente, el estudio de Dugan et al. (2011) sugiere efectos de Robo dependientes de Slit y efectos independientes de estos ligandos pues los mutantes de Robo muestran algunas proyecciones dopaminérgicas aberrantes que no están presentes en los mutantes de Slit. Dado que el presente trabajo sugiere que los axones GAD65⁺ son requeridos como andamio para la formación del tracto dopaminérgico formulamos la siguiente pregunta: ¿Las alteraciones que se observan en los mutantes de Slit 1/2 y Robo 1/2 se acompañan de alteraciones en axones GAD65⁺? Para contestar a esta pregunta, analizamos cerebros completos de embriones mutantes para estas proteínas por medio de inmunotinciones para TH y GAD65 en el estadio en que los axones dopaminérgicos inician su proyección. En embriones control observamos que los axones TH⁺ presentan una proyección estereotípica hacia la zona ventral del diencefalo y que el tracto GAD65⁺ atraviesa de forma longitudinal la parte ventral del cerebro como lo observamos previamente en embriones de rata (Figura 15 A, D, G).

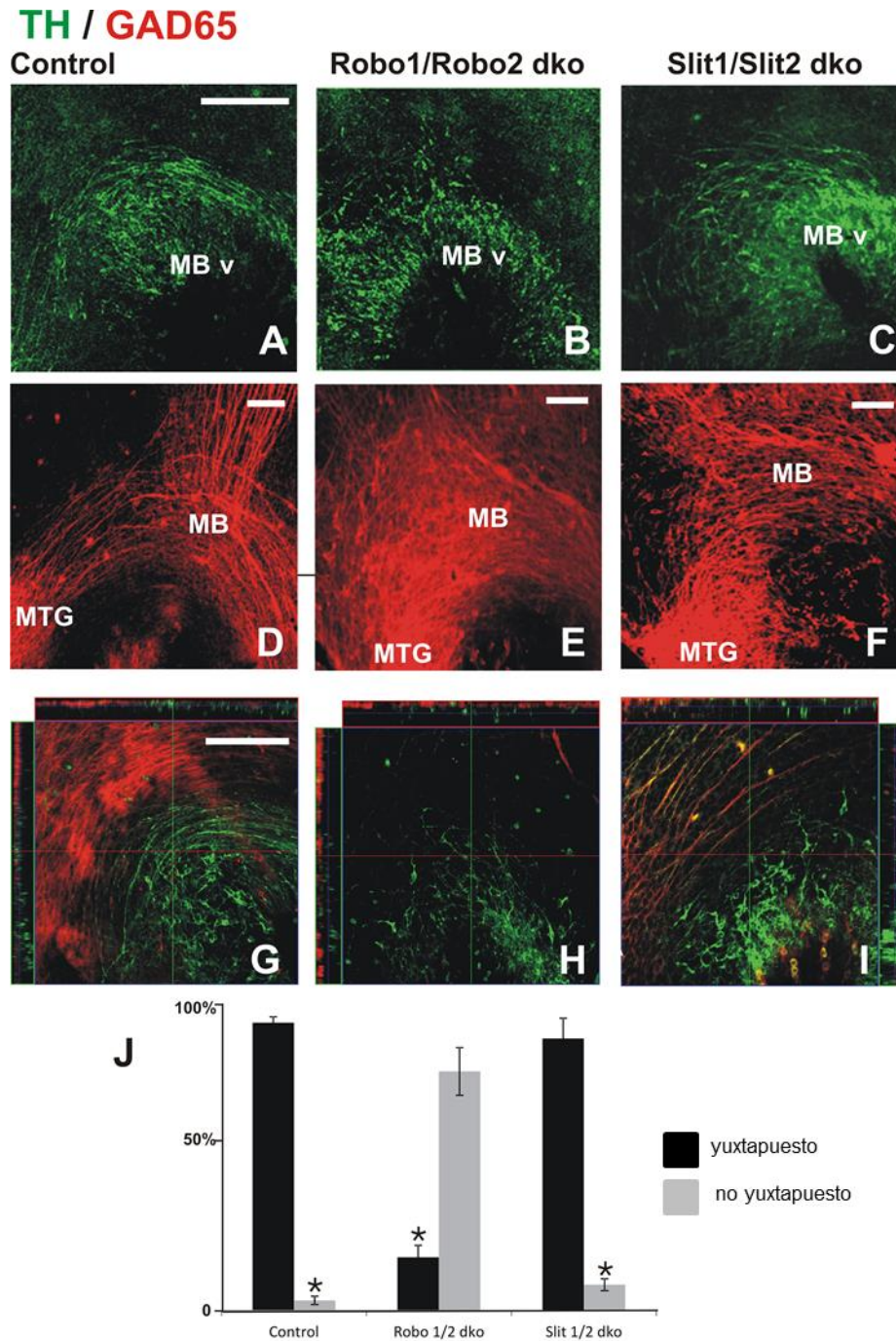


Figura 15. Efecto anormal en la yuxtaposición de axones TH con axones GAD65 en la ausencia de Robo1/2 o Slit 1/2 durante la formación temprana de la VNE. Se llevó a cabo doble inmunotinción para TH o GAD65 de embriones de ratón de E12.5 de dobles mutantes para Slit1/2 o Robo1/2. **A,D,G**, controles CD-1 ó heterocigotos de alelos nulos Robo1/2 se inmunotiñeron contra TH (verde) o GAD65 (rojo). **B,E,H** expresión de TH y GAD65 en dobles mutantes Robo 1/2 (dco Robo1/2) y **C,F,I** expresión de TH y GAD65 en dco para Slit1/2. **J**. Cuantificación de yuxtaposición de axones TH/GAD65 por medio de análisis de un solo plano focal en diferentes áreas del mesencéfalo ventral. Barra de calibración, 100µm.

Como se había observado previamente (Dugan et al., 2011), los mutantes para Robo 1/2 y Slit 1/2 mostraron anomalías severas en la proyección hacia el estriado y ambos presentaban reducción en las proyecciones axonales (Figura 15 B,C). En los dobles mutantes (dco) para Robo 1/2 se observaron axones TH⁺ que crecieron hacia la zona dorsal del diencéfalo (Figura 15 B, H). Además, observamos que los axones GAD65⁺ en los embriones dco presentaban severas anomalías en cuanto a la organización comparadas con los controles, siendo esto más evidente en los dco para Robo1/2 (Figura 15 E,F). Puesto que las alteraciones de las proyecciones TH⁺ están acompañadas de alteraciones de axones GAD65⁺ en ambos mutantes dco podemos sugerir que al menos parte de los errores de proyección de las neuronas dopaminérgicas en estos embriones se debe indirectamente a las alteraciones en los axones GAD65⁺.

Para verificar si la ausencia de las proteínas Robo podría afectar la interacción entre los axones TH⁺ y GAD65⁺, analizamos planos ortogonales que fueron reconstruidos por imágenes confocales del plano Z provenientes de preparaciones de embriones dco. En embriones tanto controles y como dco para Slit 1/2 encontramos que la mayoría de los axones TH⁺ están acompañados de axones GAD65⁺ (Figura 15, G, I, J). En cambio, en embriones dco para Robo 1/2, la mayoría de los axones TH⁺ parecen crecer independientes de los axones GAD65⁺ (Figura 15 H, J). Esto es claramente apreciable en la Figura 15H, en la que en un plano focal se muestran la mayoría de los axones TH⁺ solos y la mayoría de los axones GAD65⁺ están en diferente plano focal. Estos resultados indican que la interacción entre estos dos tipos axonales está impedida por la ausencia de Robo1 y Robo2.

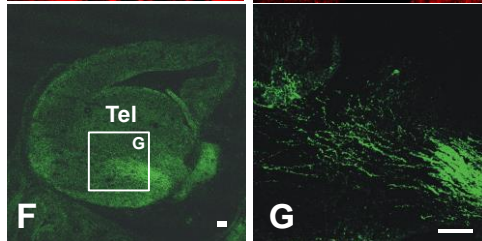
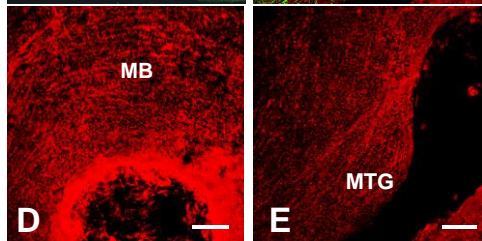
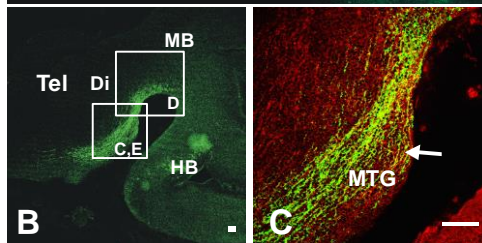
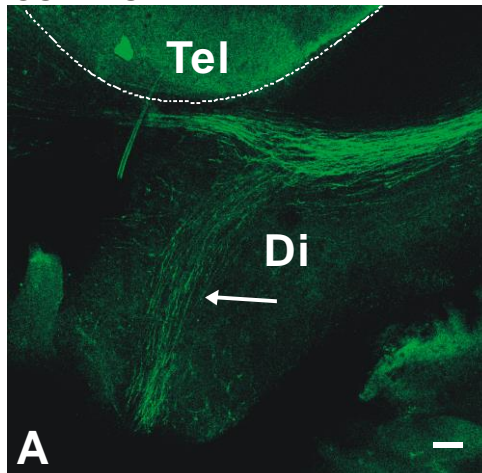
2.7 Análisis de la proyección dopaminérgica en embriones con disminución selectiva de neuronas GAD65

Si la relación entre los axones TH⁺ y los axones GAD65⁺ es importante para la proyección normal de los axones dopaminérgicos, es posible hipotetizar que la alteración del andamio de los axones GAD65⁺ causará una anomalía la VNE.

Para poner a prueba esta hipótesis, se diseñó una estrategia experimental usando líneas de ratones transgénicos para la eliminación selectiva de las poblaciones GAD65 por la expresión de la toxina de la difteria. Una línea que expresa la recombinasa CRE en el locus de GAD65 (GAD65^{CRE}) (Taniguchi et al., 2011) fue cruzada con la línea de ratones ROSA26^{DTA} (Voehringer et al., 2008). En los embriones portadores de ambos alelos, se espera la eliminación de las neuronas GAD65 por la activación de la expresión de la toxina de la difteria por la recombinación por CRE. Embriones completos de E13.5 de ratón portadores de ambos alelos transgénicos (GAD2^{cre}/ROSA26^{DTA}, dos embriones de 4 camadas diferentes) o embriones control (dos silvestres CD-1 y 6 expresando sólo ROSA26-DTA) fueron inmunoteñidos para TH para visualizar los tractos axonales dopaminérgicos. La proyección normal fue observada en los embriones control como se muestra en la Figura 16 A-G. En contraste, los embriones que contenían ambos alelos transgénicos mostraron alteraciones en la proyecciones axonales TH⁺ tanto en el MBV como en el diencéfalo (Figura 16 H-N). En este estadio, muchos axones deberían de haber alcanzado el estriado. Sin embargo, se observa que muchos de los axones no viran hacia la eminencia ganglionar, sino que siguen una trayectoria hacia la parte ventral del hipotálamo (Figura 16H). (flechas en 16H e I). En un corte coronal, se puede apreciar que los axones TH⁺ en vez de entrar al estriado desde una localización longitudinal como se muestra en el control (16 F-G), en los embriones con los dos alelos transgénicos, lo hacen desde una zona ventral (16 M-N).

GAD65/TH

CONTROL



ROSA26^{DTA} / GAD65^{CRE}

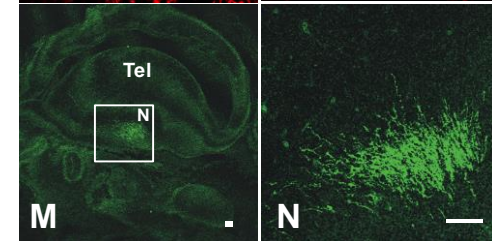
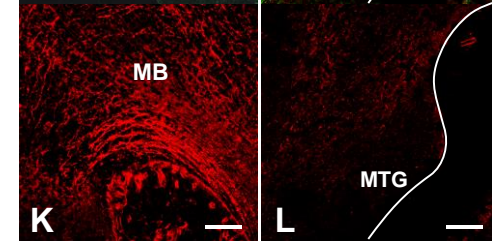
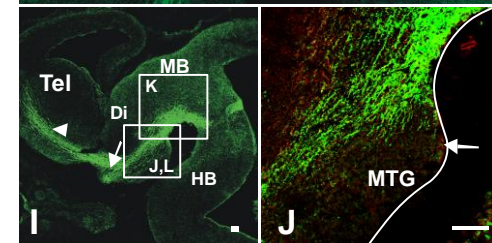
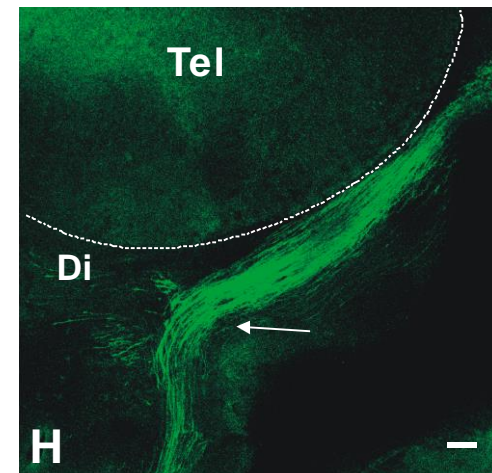


Figura 16. Proyección anormal de la VNE en la disminución de axones GAD65. Ratones control (A-G) y ratones portadores de los alelos transgénicos GAD65^{CRE} y ROSA26^{DTA} (H-N) (E13.5) se inmunotifieron para TH (verde) ó GAD65 (rojo). Se observa en A el crecimiento normal de las fibras TH en vista panorámica lateral del prosencéfalo ventral. B muestra vista panorámica e inmunotinción para TH y se indica la ubicación de las magnificaciones mostradas en C,D,E (cortes para-sagitales). C, muestra doble tinción para GAD65 y TH; se observa el crecimiento de los axones TH⁺ sobre el MTG (tracto mamillo tegmental). D-E muestran expresión normal de GAD65 en el mesencéfalo (MB) y en el MTG, respectivamente. F y G son cortes coronales que muestran entrada de las fibras TH al telencéfalo (tel). H muestra vista panorámica de inmunotinción contra TH en corte sagital en transgénicos GAD65^{CRE}/ROSA26^{DTA}. I muestra una vista panorámica inmuno teñida contra TH y se indican los acercamientos mostrados en J,K,L (cortes para-sagitales). J y K muestran una disminución de fibras GAD65 en dobles transgénicos. M y N muestran un crecimiento aberrante de fibras dopaminérgicas en la entrada hacia el estriado. Flechas muestran comparación entre A y H, C y J de la proyección TH⁺. Barra de calibración, 100µm.

Para evaluar la reducción de los axones GAD65, realizamos una inmunotinción para TH y GAD65 en E13.5 tanto en los controles como en los dobles transgénicos. Observamos la expresión de GAD65 en los controles como se muestra en la Figura 16 C-E. En comparación entre los controles y los embriones de los ratones transgénicos $GAD2^{CRE}/ROSA26^{DTA}$, se aprecia una reducción en la inmunotinción de GAD65 en el MBV (Figura 16 D-K) y este decremento de expresión es más claro en el diencéfalo (Figura 16 K-L). Podemos interpretar que esta eliminación incompleta de axones expresando la enzima GAD65 es consecuencia de la constante generación de neuronas nuevas de este tipo en este período, del proceso prolongado para que estas neuronas alcancen el nivel mínimo de CRE que causa la activación de DTA y el tiempo que se requiere para que la toxina alcance la concentración que elimina a la célula.

Esto previene probablemente un efecto más dramático de la trayectoria de los axones dopaminérgicos. Sin embargo, de acuerdo a la hipótesis que motivó este experimento, se observaron alteraciones evidentes en la trayectoria de estos axones, confirmando con esto, la participación de axones $GAD65^+$ en la formación de la vía negro-estrial.

Para verificar si la alteración de la VNE se mantenía a lo largo del tiempo, se observó la proyección dopaminérgica en recién nacidos (P0) controles y dobles transgénicos (Figura 17). Por medio de inmunotinción de TH se observaron proyecciones aberrantes en el diencéfalo (flecha en 17 E) así como anomalías en la zona preóptica (flecha en 17 D), probablemente resultante de la ausencia de la proyección ventral observada en los embriones en E12.5. Es importante señalar, que no se observaron anomalías en un examen morfológico general en los cerebros de los dobles transgénicos por medio de una tinción de Nissl (Figura 17C-F).

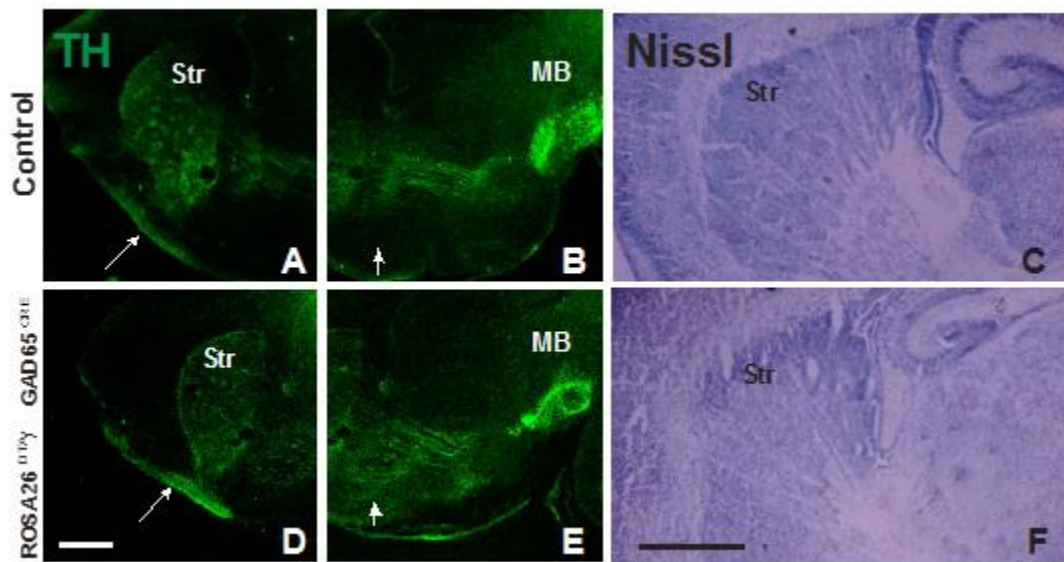


Figura 17. Proyección anormal de axones TH⁺ en cerebros de ratones P0 con disminución de axones GAD65. Inmunotinción para TH (A, B, D, y E) y tinción Nissl (C y F) en neonatos control y dobles transgénicos GAD65^{CRE}/Rosa26^{DTA}. **A-C.** Controles que muestran el crecimiento de la proyección TH⁺ normal. **D-E** muestra crecimiento aberrante de fibras TH⁺ en dobles transgénicos en los que las flechas indican la diferencia de la ubicación de las fibras en ambas condiciones. Barra de calibración, 500 μ m.

3. Discusión

Demostramos en cerebros de embriones de rata y ratón que la interacción de axones dopaminérgicos ascendentes y GABAérgicos descendentes es un mecanismo relevante para la formación de la vía negro-estrial. Así mismo, demostramos en embriones en cultivo, que los ectodominios de las proteínas de adhesión NCAM y Robo 1 y 2 pueden estar involucradas en esta interacción. A continuación se discutirán aspectos relevantes propuestos por otros grupos de investigación y hallazgos anteriores.

Guía axonal durante la formación de la vía negro-estrial

En diversos estudios se ha propuesto que moléculas quimiotrópicas determinan el direccionamiento de axones y por tanto su proyección a sus blancos finales durante la formación de vías axonales en el cerebro (Huber et al., 2003). Esta idea parece aplicar a axones creciendo aislados como ocurre en estadios embrionarios tempranos durante el desarrollo del cerebro en ratón (E8-E10) en los que aún se detectan tractos aislados unos de otros (Mastick and Easter, 1996). Otros mecanismos, sin embargo, podrían estar involucrados durante la proyección de axones que son parte de fascículos compuestos por varios tipos axonales.

Para los axones dopaminérgicos embrionarios que forman la vía negro-estrial, se ha demostrado que en cultivo responden a moléculas como las Semaforinas (Hernández-Montiel et al., 2008; Kolk et al., 2009; Tamariz et al., 2010), Netrina 1 (Huber et al., 2003; Lai Wing Sun et al., 2011), Shh (Hammond et al., 2009) y proteínas Slit (Lin et al., 2005). En apoyo a la idea de la participación de estas moléculas en el control de la proyección negro-estrial, líneas portadoras de alelos nulos para ellas o para sus receptores muestran alteraciones en esta vía (Kolk et al., 2009; Dugan et al., 2011; Torigoe et al., 2013). La posibilidad de que el papel de estas moléculas guía pudiese ser también indirecto, sin embargo, no ha sido analizado. Por estudios previos de nuestro laboratorio y de otros grupos de investigación, se sabe que los axones dopaminérgicos crecen como parte de fascículos que contienen otros tipos axonales in

vitro (Hulley et al., 1998). Además, dado que en estadios tempranos de la proyección dopaminérgica se puede observar que una fracción importante de las fibras TH no expresan los receptores para moléculas quimiotrópicas Npn1, Npn2, DCC, Robo1 ó Robo2 (Hernández-Montiel et al., 2008; Kolk et al., 2009; Dugan et al., 2011), proponemos que otros sistemas guía están involucrados en la proyección dopaminérgica en esta etapa.

Los resultados de este trabajo revelaron que in vivo los axones ascendentes TH⁺ del mesencéfalo crecen yuxtapuestos sobre tractos descendentes GAD65 preexistentes.

También pudimos observar que la interacción de los axones TH con los GAD65 incluye diversas etapas que involucran al MTG en E12.5, a una proyección del hipotálamo (probablemente compuesta por diversos tractos) en E13 y a la entrada al estriado a un tracto del hipotálamo posterior (PHT) en E14. Esta observación dio pie a la hipótesis de que la respuesta in vivo e in vitro de los axones dopaminérgicos a señales guía en su ambiente depende de la interacción con otros tipos axonales. Esto se puso a prueba al eliminar parcialmente a la proyección GAD65 en ratones transgénicos condicionales en los que logramos observar alteraciones a la proyección negro-estrial; las fibras TH se encontraron anormalmente posicionadas ventralmente en su entrada al estriado, además de observarse una proyección hacia el hipotálamo que no se encontró en los controles.

Efecto indirecto de sistemas quimiotrópicos en la proyección negro-estrial

Derivado del hallazgo mencionado arriba, consideramos que al menos algunas de las moléculas guía previamente implicadas en la proyección negro-estrial, pueden tener un papel indirecto. Al estar guiando de principio a los axones GAD65, si estos tuvieran crecimiento anormal por la ausencia de alguna molécula guía, esto tendría como consecuencia que aquellos axones que se fasciculan con este tipo axonal se encontrarían también alterados. Esta posibilidad se abordó directamente al analizar embriones carentes de Robo1/2 ó Slit1/2. En estudios previos se ha observado que estos embriones muestran alteraciones en la proyección dopaminérgica y que algunas

de éstas pueden ser atribuidas a un papel de Robo que no depende de sus ligandos Slit (Dugan et al., 2011). Nuestros estudios, llevados a cabo en estadios más tempranos que en el trabajo previo, confirmaron que la proyección dopaminérgica es anormal tanto en mutantes Slit1/2 como en mutantes Robo1/2. En relación directa a nuestra predicción, observamos además, alteraciones dramáticas en los fascículos GAD65 en estadios en los que los axones dopaminérgicos inician su proyección. Estos resultados sugieren que el efecto de la señalización Slit/Robo sobre la proyección dopaminérgica puede ser indirecto al determinar la proyección GAD65 que a su vez sirve como andamio a la primera.

Estos resultados revelan que la interacción entre los axones TH con los axones GAD65 es importante para la proyección negro-estrial y sugieren que el papel de la señalización Slit/Robo sobre la proyección dopaminérgica puede ser indirecto a través de un papel instructivo de la proyección GAD65 que la precede.

Papel de Robo 1, Robo 2 y NCAM en la proyección de axones dopaminérgicos

Los miembros de la familia Robo son moléculas transmembrana que actúan como receptores de Slit, moléculas secretadas con función repelente de axones (Kidd et al., 1999; Piper et al., 2000; Kidd, 2009). Robo 1-3, que pertenecen a la superfamilia de las Inmunoglobulinas (Ig), contienen un dominio extracelular típico de proteínas de adhesión con 5 dominios Ig-like y 3 dominios de fibronectina tipo 3 (revisado en Morlot et al., 2007). Se ha demostrado además que Robo 1 y 2 son capaces de interacción homofílica y heterofílica entre ellas dado que favorecen la agregación de microesferas recubiertas del dominio extracelular de estas proteínas en fase líquida (Hivert et al., 2002). Adicionalmente, se observó que células 3T3 que expresan Robo 1 ó Robo 2 promueven el crecimiento de neuritas de células de retina. Usando el mismo ensayo de agregación de microesferas se observó que Robo1 y Robo2 no interactúan con NCAM mientras que Robo3 sí lo hace (Hivert et al., 2002; Camurri et al., 2005). Otro grupo propone, la interacción heterofílica de Robo 1 y 2 con N-Cadherina en los tractos espino-cerebelares en roedores y pollo (Sakai et al., 2012). Naturalmente, los axones

comisurales ascendentes de los núcleos espinales d1 y d2 forman parte de los axones sensoriales del fascículo lateral, que posteriormente llegara a el cerebelo para formar parte de la via sensorial cerebelar; en mutantes para Robo o la sobre expresión de N-Cadherina encontraban desordenados estos fascículos. En los mutantes de N-Cadherina, estos podían ser rescatados al bloquear Robo y lo mismo en los mutantes para Robo al bloquear N-Cadherina, lo que demostró que había una relación funcional In vivo entre esta molécula de adhesión y Robo para la organización de tractos (Sakai et al., 2012).

Por tanto, es posible que Robo juegue un papel de adhesión en el tracto dopaminérgico mediando su interacción con el andamio axonal GAD65 en etapas embrionarias tempranas. Este papel indirecto ha sido propuesto por Dugan et al., (2011), quienes encontraron que en los dobles mutantes Robo1/2 había una alteración en la proyección dopaminérgica en un estadio en el que su expresión normal es muy baja. En contraste con esto, el mutante Slit 1/2 no muestra estas alteraciones tan pronunciadas. Lo anterior parece no ser consistente con la relación clásica de Robo/Slit como receptor-ligando por lo que proponen que podría haber otros fascículos involucrados en las alteraciones.

Una observación adicional de nuestro trabajo consistente con el papel de Robo1/2 como mediadores de interacción entre el tracto GAD65 y axones DA es que en embriones carentes de Robo1/2 las fibras TH⁺ se encontraron defasciculadas del tracto GAD65 mientras que en el doble mutante Slit1/2, ambos tipos axonales se encontraron yuxtapuestos. Además de confirmar la idea de un papel diferencial de proteínas Slit y Robo, estos resultados sugieren que Robo 1/2 participan en la interacción entre axones TH y GAD65.

Por otro lado, buscando la participación de otras moléculas de adhesión en la interacción entre los axones GAD65 y axones TH⁺, confirmamos hallazgos previos, de la expresión de la proteína de adhesión celular NCAM en los axones DA (Shults and Kimber, 1992; Schiff et al., 2009) expresada también en los tractos GAD65. Apoyando la posibilidad de que NCAM participa en la proyección de axones dopaminérgicos,

observamos que al añadir una versión soluble del ectodominio de NCAM a embriones en cultivo se interfirió con la proyección normal de las neuronas TH+. Además, un sustrato conteniendo NCAM causó un incremento del crecimiento axonal de neuronas DA disgregadas en cultivo. Esto sugiere que NCAM media la interacción de los axones DA con el sustrato en el cerebro en desarrollo y que podría estar también involucrado en su interacción con los axones GAD65. Sorprendentemente, los ectodominios Robo 1/2 añadidos al medio de cultivo de neuronas disgregadas revirtieron el efecto de NCAM pero cuando se presentaron adheridas al sustrato no indujeron aumento en el crecimiento de axones dopaminérgicos.

Por lo anterior proponemos que Robo1/2 y NCAM podrían participar de diversas maneras formando un complejos homofílicos y heterofílicos, manteniendo la interacción TH/GAD65.

Moléculas de adhesión y receptores de moléculas guía en la proyección dopaminérgica

Una de las principales aportaciones de este trabajo es la evidencia que sugiere que la interacción de axones TH+ y axones GAD65+ es relevante para el establecimiento de la vía negro-estrial, misma que es necesariamente mediada por moléculas de adhesión. Estas proteínas podrían participar vía interacción homofílica o como parejas heterofílicas para NCAM o Robo. Nosotros proponemos que, respecto al crecimiento axonal, algún otro receptor de las moléculas quimiotrópicas podría estar involucrado.

Los receptores para guía axonal como Robo, Npn y DCC presentan similitudes estructurales a moléculas de adhesión y también han sido implicadas en adhesión celular y crecimiento de neuritas (Bennett et al., 1997; Hivert et al., 2002; Martín et al., 2006; Valdembri et al., 2009; Parsons et al., 2010; Huettl et al., 2012). Se ha demostrado interacción homofílica de las proteínas Npn 1 y Robo (Fujisawa et al., 1997; Hivert et al., 2002; Pavlou et al., 2002; Haspel and Grumet, 2003; Liu et al., 2004) y como se mencionó antes interacción heterofílica ocurre entre Robo 1 y Robo2, entre diferentes IgCAM's o entre IgCAMS y Npn 1 y Npn2 (Morales et al., 1993; Castellani et

al., 2000; Liu et al., 2004; Julien et al., 2005; Wright et al., 2007). Consistentemente, evidencia reciente reveló un papel de Npn 1 mediando interacción entre axones sensoriales y motores en embriones de ratón (Huettl and Huber, 2011; Huettl et al., 2012).

Por otro lado, Npn2, un receptor para semaforinas clase 3 ha sido implicado en la formación de la VNE ya que en embriones carentes del mismo se observaron defectos de defasciculación en los axones dopaminérgicos (Kolk et al., 2009; Torigoe et al., 2013). Aunque este efecto se atribuyó a pérdida de respuesta a semaforinas, un efecto en la fasciculación como molécula de adhesión no fue explorado.

Por lo anterior proponemos que los complejos de proteínas formados por receptores a moléculas quimiotrópicas como Robo, Npn, DCC con moléculas de adhesión como NCAM o L1 podrían participar en una función de adhesión/direccionamiento selectivo dependiendo de la combinación de las mismas. Por ello, consideramos que el papel que se le ha adscrito a los sistemas de señalización de moléculas quimiotrópicas en el establecimiento de la vía negro-estrial debe ser reevaluado a fin de explorar, por un lado su posible papel indirecto determinando la proyección de los fascículos GAD65, y por el otro el papel de los receptores como moléculas de adhesión mediadoras de la interacción axonal.

4. Perspectivas

Los hallazgos de este trabajo abren varias avenidas para abordar con mayor profundidad el estudio de los mecanismos moleculares involucrados en la interacción de los axones TH y GAD65. Una de ellas, sería determinar qué parte de los ectodominios de las moléculas de adhesión Robo1/Robo2 y NCAM están interactuando y cómo es que este mecanismo genera una señal intracelular que conduce al crecimiento axonal dopaminérgico. Otra alternativa derivada de nuestros hallazgos, sería la reevaluación del papel de moléculas que han sido implicadas en la guía axonal dopaminérgica como Neuropilinas, Semaforinas, DCC, Netrinas, Wnt5 y EfrinasB, para

saber si su participación en la formación de la Vía negro-estrial es directa sobre los axones dopaminérgicos o por efectos indirectos al determinar la proyección de los axones GAD65. Este aspecto no fue considerado en los estudios previos que abordaron la función de las moléculas citadas. Sin embargo, debido a que el haz de axones GAD65 inicia su proyección en estadios en los que aún no hay otros axones que podrían intervenir en la formación del MFB, es posible que la función principal de las moléculas mencionadas sea la orientación de este tracto.

Otro aspecto a explorar a la luz de la información obtenida en este trabajo es el papel de los receptores Npns, DCC y Shhs como moléculas de adhesión, lo cual arrojaría información para el diseño de sustratos artificiales para favorecer el crecimiento axonal dopaminérgico para la reconstrucción de la VNE en modelos de la enfermedad de Parkinson. Recientemente se diseñó una estrategia para la reconstrucción de la vía usando las moléculas quimotrópicas Semaforina 3A y 3C, logrando exitosamente la atracción de los axones TH⁺ hacia el estriado desde la sustancia nigra en ratas adultas (Díaz-Martínez et al., 2013). Una mejora al método lo podría constituir el uso de un andamio decorado con moléculas de adhesión como NCAM o Robos para favorecer el crecimiento de los axones y así restaurar el tracto negro-estrial.

5. Referencias

- Avilés EC, Wilson NH, Stoeckli ET (2013) Sonic hedgehog and Wnt: antagonists in morphogenesis but collaborators in axon guidance. *Front Cell Neurosci* 7:86.
- Bagri A, Marín O, Plump AS, Mak J, Pleasure SJ, Rubenstein JLR, Tessier-Lavigne M (2002) Slit proteins prevent midline crossing and determine the dorsoventral position of major axonal pathways in the mammalian forebrain. *Neuron* 33:233–248.
- Bennett KL, Bradshaw J, Youngman T, Rodgers J, Greenfield B, Aruffo A, Linsley PS (1997) Deleted in colorectal carcinoma (DCC) binds heparin via its fifth fibronectin type III domain. *J Biol Chem* 272:26940–26946.
- Bielenberg DR, Klagsbrun M (2007) Targeting endothelial and tumor cells with semaphorins. *Cancer Metastasis Rev* 26:421–431.
- Blakely BD, Bye CR, Fernando C V, Prasad A a, Pasterkamp RJ, Macheda ML, Stacker S a, Parish CL (2013) Ryk, a receptor regulating wnt5a-mediated neurogenesis and axon morphogenesis of ventral midbrain dopaminergic neurons. *Stem Cells Dev* 22:2132–2144.
- Buhusi M, Schlatter MC, Demyanenko GP, Thresher R, Maness PF (2008) L1 interaction with ankyrin regulates mediolateral topography in the retinocollicular projection. *J Neurosci* 28:177–188.
- Calò L, Spillantini M, Nicoletti F, Allen ND (2005) Nurr1 co-localizes with EphB1 receptors in the developing ventral midbrain, and its expression is enhanced by the EphB1 ligand, ephrinB2. *J Neurochem* 92:235–245.
- Camurri L, Mambetisaeva E, Davies D, Parnavelas J, Sundaresan V, Andrews W (2005) Evidence for the existence of two Robo3 isoforms with divergent biochemical properties. *Mol Cell Neurosci* 30:485–493.
- Castellani V, Chédotal A, Schachner M, Faivre-Sarrailh C, Rougon G (2000) Analysis of the L1-deficient mouse phenotype reveals cross-talk between Sema3A and L1 signaling pathways in axonal guidance. *Neuron* 27:237–249.
- Dahlstroem A, Fuxe K (1964) Evidence for the existence of monoamine-containing neurons in the central nervous system. I. demonstration of monoamines in the cell bodies of brain stem neurons. *Acta Physiol Scand Suppl:SUPPL 232:1–55.*

- De Carlos JA, López-Mascaraque L, Valverde F (1996) Dynamics of cell migration from the lateral ganglionic eminence in the rat. *J Neurosci* 16:6146–6156.
- Demyanenko GP, Shibata Y, Maness PF (2001) Altered distribution of dopaminergic neurons in the brain of L1 null mice. *Dev Brain Res* 126:21–30.
- Denaxa M, Chan CH, Schachner M, Parnavelas JG, Karagogeos D (2001) The adhesion molecule TAG-1 mediates the migration of cortical interneurons from the ganglionic eminence along the corticofugal fiber system. *Development* 128:4635–4644.
- Díaz-Martínez NE, Tamariz E, Díaz NF, García-Peña CM, Varela-Echavarría A, Velasco I (2013) Recovery from experimental parkinsonism by semaphorin-guided axonal growth of grafted dopamine neurons. *Mol Ther* 21:1579–1591.
- Dugan JP, Stratton A, Riley HP, Farmer WT, Mastick GS (2011) Midbrain dopaminergic axons are guided longitudinally through the diencephalon by Slit/Robo signals. *Mol Cell Neurosci* 46:347–356.
- Finne J (1982) Occurrence of unique polysialosyl carbohydrate units in glycoproteins of developing brain. *J Biol Chem* 257:11966–11970.
- Fujisawa H, Kitsukawa T, Kawakami A, Takagi S, Shimizu M, Hirata T (1997) Roles of a neuronal cell-surface molecule, neuropilin, in nerve fiber fasciculation and guidance. *Cell Tissue Res* 290:465–470.
- Fujita E, Urase K, Soyama A, Kouroku Y, Momoi T (2005) Distribution of RA175/TSLC1/SynCAM, a member of the immunoglobulin superfamily, in the developing nervous system. *Dev Brain Res* 154:199–209.
- Gates MA, Coupe VM, Torres EM, Fricker-Gates RA, Dunnett SB (2004) Spatially and temporally restricted chemoattractive and chemorepulsive cues direct the formation of the nigro-striatal circuit. *Eur J Neurosci* 19:831–844.
- Geeraedts LM, Nieuwenhuys R, Veening JG (1990) Medial forebrain bundle of the rat: IV. Cytoarchitecture of the caudal (lateral hypothalamic) part of the medial forebrain bundle bed nucleus. *J Comp Neurol* 294:537–568.
- Gomez TM, Letourneau PC (2014) Actin dynamics in growth cone motility and navigation. *J Neurochem* 129:221–234.

- Hammond R, Blaess S, Abeliovich A (2009) Sonic Hedgehog is a chemoattractant for midbrain dopaminergic axons. *PLoS One* 4:e7007–e70015.
- Haspel J, Grumet M (2003) The L1CAM extracellular region: a multi-domain protein with modular and cooperative binding modes. *Front Biosci* 8:s1210–s1225.
- Hernández-Montiel HL, Tamariz E, Sandoval-Minero MT, Varela-Echavarría A (2008) Semaphorins 3A, 3C, and 3F in mesencephalic dopaminergic axon pathfinding. *J Comp Neurol* 506:387–397.
- Heyden A, Angenstein F, Sallaz M, Seidenbecher C, Montag D (2008) Abnormal axonal guidance and brain anatomy in mouse mutants for the cell recognition molecules close homolog of L1 and NgCAM-related cell adhesion molecule. *Neuroscience* 155:221–233.
- Hivert B, Liu Z, Chuang C-Y, Doherty P, Sundaresan V (2002) Robo1 and Robo2 are homophilic binding molecules that promote axonal growth. *Mol Cell Neurosci* 21:534–545.
- Hohenester E (2008) Structural insight into Slit-Robo signalling. *Biochem Soc Trans* 36:251–256.
- Huber AB, Kolodkin AL, Ginty DD, Cloutier J-F (2003) Signaling at the growth cone: ligand-receptor complexes and the control of axon growth and guidance. *Annu Rev Neurosci* 26:509–563.
- Huettl RE, Haehl T, Huber AB (2012) Fasciculation and guidance of spinal motor axons in the absence of FGFR2 signaling. *PLoS One* 7.
- Huettl RE, Huber AB (2011) Cranial nerve fasciculation and Schwann cell migration are impaired after loss of Npn-1. *Dev Biol* 359:230–241.
- Hulley P, Schachner M, Lubbert H (1998) L1 neural cell adhesion molecule is a survival factor for fetal dopaminergic neurons. *J Neurosci Res* 53:129–134.
- Julien F, Bechara A, Fiore R, Nawabi H, Zhou H, Hoyo-Becerra C, Bozon M, Rougon G, Grumet M, Püschel AW, Sanes JR, Castellani V (2005) Dual functional activity of semaphorin 3B is required for positioning the anterior commissure. *Neuron* 48:63–75.
- Kamei Y, Takeda Y, Teramoto K, Tsutsumi O, Taketani Y, Watanabe K (2000) Human NB-2 of the contactin subgroup molecules: chromosomal localization of the gene

- (CNTN5) and distinct expression pattern from other subgroup members. *Genomics* 69:113–119.
- Kidd T (2009) Neuroscience. Crossing the line. *Science* 324:893–894.
- Kidd T, Bland KS, Goodman CS (1999) Slit is the midline repellent for the robo receptor in *Drosophila*. *Cell* 96:785–794.
- Klein R (2012) Eph/ephrin signalling during development. *Development* 139:4105–4109.
- Kolk SM, Gunput R-AF, Tran TS, van den Heuvel DMA, Prasad AA, Hellemons AJCGM, Adolfs Y, Ginty DD, Kolodkin AL, Burbach JPH, Smidt MP, Pasterkamp RJ (2009) Semaphorin 3F is a bifunctional guidance cue for dopaminergic axons and controls their fasciculation, channeling, rostral growth, and intracortical targeting. *J Neurosci* 29:12542–12557.
- Lai Wing Sun K, Correia JP, Kennedy TE (2011) Netrins: versatile extracellular cues with diverse functions. *Development* 138:2153–2169.
- Larrieu-Lahargue F, Thomas KR, Li DY (2012) Netrin Ligands and Receptors: Lessons From Neurons to the Endothelium. *Trends Cardiovasc Med* 22:44–47.
- Lin L, Rao Y, Isacson O (2005) Netrin-1 and slit-2 regulate and direct neurite growth of ventral midbrain dopaminergic neurons. *Mol Cell Neurosci* 28:547–555.
- Liu Z, Patel K, Schmidt H, Andrews W, Pini A, Sundaresan V (2004) Extracellular Ig domains 1 and 2 of Robo are important for ligand (Slit) binding. *Mol Cell Neurosci* 26:232–240.
- London NR, Li DY (2011) Robo4-dependent Slit signaling stabilizes the vasculature during pathologic angiogenesis and cytokine storm. *Curr Opin Hematol* 18:186–190.
- Long H, Sabatier C, Ma L, Plump A, Yuan W, Ornitz DM, Tamada A, Murakami F, Goodman CS, Tessier-Lavigne M (2004) Conserved roles for Slit and Robo proteins in midline commissural axon guidance. *Neuron* 42:213–223.
- López-Bendito G, Flames N, Ma L, Fouquet C, Di Meglio T, Chedotal A, Tessier-Lavigne M, Marín O (2007) Robo1 and Robo2 cooperate to control the guidance of major axonal tracts in the mammalian forebrain. *J Neurosci* 27:3395–3407.

- Martín M, Simon-Assmann P, Kedinger M, Martin M, Mangeat P, Real FX, Fabre M (2006) DCC regulates cell adhesion in human colon cancer derived HT-29 cells and associates with ezrin. *Eur J Cell Biol* 85:769–783.
- Mastick GS, Easter SS (1996) Initial organization of neurons and tracts in the embryonic mouse fore- and midbrain. *Dev Biol* 173:79–94.
- McManus MF, Nasrallah IM, Gopal PP, Baek WS, Golden JA (2004) Axon mediated interneuron migration. *J Neuropathol Exp Neurol* 63:932–941.
- Moore SW, Tessier-Lavigne M, Kennedy TE (2007) Netrins and their receptors. *Adv Exp Med Biol* 621:17–31.
- Morales G, Hubert M, Brümmendorf T, Treubert U, Tárnok A, Schwarz U, Rathjen FG (1993) Induction of axonal growth by heterophilic interactions between the cell surface recognition proteins F11 and Nr-CAM/Bravo. *Neuron* 11:1113–1122.
- Morlot C, Thielens NM, Ravelli RBG, Hemrika W, Romijn RA, Gros P, Cusack S, McCarthy AA (2007) Structural insights into the Slit-Robo complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:14923–14928.
- Nakamura S, Ito Y, Shirasaki R, Murakami F (2000) Local directional cues control growth polarity of dopaminergic axons along the rostrocaudal axis. *J Neurosci* 20:4112–4119.
- Nielsen J, Kulahin N, Walmod P (2008) Extracellular Protein Interactions Mediated by the Neural Cell Adhesion Molecule, NCAM: Heterophilic Interactions Between NCAM and Cell Adhesion Molecules, Extracellular Matrix Proteins, and Viruses. *Neurochem Res*:55(5):582–589.
- Nieuwenhuys R, Geeraedts LM, Veening JG (1982) The medial forebrain bundle of the rat. I. General introduction. *J Comp Neurol* 206:49–81.
- Ohyama K, Kawano H, Asou H, Fukuda T, Oohira A, Uyemura K, Kawamura K (1998) Coordinate expression of L1 and 6B4 proteoglycan/phosphacan is correlated with the migration of mesencephalic dopaminergic neurons in mice. *Dev Brain Res* 107:219–226.
- Parsons JT, Horwitz AR, Schwartz MA (2010) Cell adhesion: integrating cytoskeletal dynamics and cellular tension. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11:633–643.

- Pavlou O, Theodorakis K, Falk J, Kutsche M, Schachner M, Faivre-Sarrailh C, Karagogeos D (2002) Analysis of interactions of the adhesion molecule TAG-1 and its domains with other immunoglobulin superfamily members. *Mol Cell Neurosci* 20:367–381.
- Piper M, Georgas K, Yamada T, Little M (2000) Expression of the vertebrate Slit Gene family and their putative receptors, the Robo genes, in the developing murine kidney. *Mech Dev* 94:213–217.
- Quartu M, Serra MP, Boi M, Melis T, Ambu R, Del Fiacco M (2010) Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and polysialylated-neural cell adhesion molecule (PSA-NCAM): Codistribution in the human brainstem precerebellar nuclei from prenatal to adult age. *Brain Res* 1363:49–62.
- Rash BG, Richards LJ (2001) A role for cingulate pioneering axons in the development of the corpus callosum. *J Comp Neurol* 434:147–157.
- Rodríguez M, González-Hernández T (1999) Electrophysiological and morphological evidence for a GABAergic nigrostriatal pathway. *J Neurosci* 19:4682–4694.
- Sakai N, Insolera R, Sillitoe R V., Shi S-H, Kaprielian Z (2012) Axon Sorting within the Spinal Cord Marginal Zone via Robo-Mediated Inhibition of N-Cadherin Controls Spinocerebellar Tract Formation. *J Neurosci* 32:15377–15387.
- Sakurai T, Lustig M, Babiarz J, Furley AJW, Tait S, Brophy PJ, Brown SA, Brown LY, Mason CA, Grumet M (2001) Overlapping functions of the cell adhesion molecules Nr-CAM and L1 in cerebellar granule cell development. *J Cell Biol* 154:1259–1273.
- Sandoval-Minero T, Varela-Echavarría A (2008) Cross-midline interactions between mouse commissural hindbrain axons contribute to their efficient decussation. *Dev Neurobiol* 68:349–364.
- Schiff M, Weinhold B, Grothe C, Hildebrandt H (2009) NCAM and polysialyltransferase profiles match dopaminergic marker gene expression but polysialic acid is dispensable for development of the midbrain dopamine system. *J Neurochem* 110:1661–1673.
- Schmid RS, Maness PF (2008) L1 and NCAM adhesion molecules as signaling coreceptors in neuronal migration and process outgrowth. *Curr Opin Neurobiol* 18:245–250.

- Schmidt ERE, Brignani S, Adolfs Y, Lemstra S, Demmers J, Vidaki M, Donahoo ALS, Lilleväli K, Vasar E, Richards LJ, Karagogeos D, Kolk SM, Pasterkamp RJ (2014) Subdomain-mediated axon-axon signaling and chemoattraction cooperate to regulate afferent innervation of the lateral habenula. *Neuron* 83:372–387.
- Shults CW, Kimber TA (1992) Mesencephalic dopaminergic cells exhibit increased density of neural cell adhesion molecule and polysialic acid during development. *Dev Brain Res* 65:161–172.
- Tamariz E, Díaz-Martínez NE, Díaz NF, García-Peña CM, Velasco I, Varela-Echavarría A (2010) Axon responses of embryonic stem cell-derived dopaminergic neurons to semaphorins 3A and 3C. *J Neurosci Res* 88:971–980.
- Taniguchi H, He M, Wu P, Kim S, Paik R, Sugino K, Kvitsani D, Fu Y, Lu J, Lin Y, Miyoshi G, Shima Y, Fishell G, Nelson SB, Huang ZJ (2011) A Resource of Cre Driver Lines for Genetic Targeting of GABAergic Neurons in Cerebral Cortex. *Neuron* 71:995–1013.
- Tessier-Lavigne M, Goodman CS (1996) The molecular biology of axon guidance. *Science* 274:1123–1133.
- Thelen K, Kedar V, Panicker AK, Schmid R-S, Midkiff BR, Maness PF (2002) The neural cell adhesion molecule L1 potentiates integrin-dependent cell migration to extracellular matrix proteins. *J Neurosci* 22:4918–4931.
- Torigoe M, Yamauchi K, Tamada A, Matsuda I, Aiba A, Castellani V, Murakami F (2013) Role of neuropilin-2 in the ipsilateral growth of midbrain dopaminergic axons. *Eur J Neurosci* 37:1573–1583.
- Torre ER, Gutekunst CA, Gross RE (2010) Expression by midbrain dopamine neurons of *Sema3A* and *3F* receptors is associated with chemorepulsion in vitro but a mild in vivo phenotype. *Mol Cell Neurosci* 44:135–153.
- Valdembri D, Caswell PT, Anderson KI, Schwarz JP, König I, Astanina E, Caccavari F, Norman JC, Humphries MJ, Bussolino F, Serini G (2009) Neuropilin-1/GIPC1 signaling regulates $\alpha 5\beta 1$ integrin traffic and function in endothelial cells. *PLoS Biol* 7.

- Voehringer D, Liang H-E, Locksley RM (2008) Homeostasis and effector function of lymphopenia-induced “memory-like” T cells in constitutively T cell-depleted mice. *J Immunol* 180:4742–4753.
- Volkmer H, Leuschner R, Zacharias U, Rathjen FG (1996) Neurofascin induces neurites by heterophilic interactions with axonal NrCAM while NrCAM requires F11 on the axonal surface to extend neurites. *J Cell Biol* 135:1059–1069.
- Wang L, Marquardt T (2012) Direct live monitoring of heterotypic axon-axon interactions in vitro. *Nat Protoc* 7:351–363 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22281870>.
- Wolfer DP, Henahan-Beatty A, Stoeckli ET, Sonderegger P, Lipp HP (1994) Distribution of TAG-1/axonin-1 in fibre tracts and migratory streams of the developing mouse nervous system. *J Comp Neurol* 345:1–32.
- Wright AG, Demyanenko GP, Powell A, Schachner M, Enriquez-Barreto L, Tran TS, Polleux F, Maness PF (2007) Close homolog of L1 and neuropilin 1 mediate guidance of thalamocortical axons at the ventral telencephalon. *J Neurosci* 27:13667–13679.
- Yamauchi K, Mizushima S, Tamada A, Yamamoto N, Takashima S, Murakami F (2009) FGF8 signaling regulates growth of midbrain dopaminergic axons by inducing semaphorin 3F. *J Neurosci* 29:4044–4055.
- Yazdani U, Terman JR (2006) The semaphorins. *Genome Biol* 7:211.
- Yue Y, Widmer DA, Halladay AK, Cerretti DP, Wagner GC, Dreyer JL, Zhou R (1999) Specification of distinct dopaminergic neural pathways: roles of the Eph family receptor EphB1 and ligand ephrin-B2. *J Neurosci* 19:2090–2101.