



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Medicina
Maestría en Salud Pública

**EL PAPEL DEL PROSENCÉFALO CAUDAL
EN EL CONTROL DE LA ORIENTACIÓN DEL NÚCLEO INTERSTICIAL DE CAJAL**

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener grado de

Maestro en Salud Pública

Presenta:

Nephtys López Sánchez.

Dirigido por:

Dr. Hebert Luis Hernández Montiel

SINODALES

Dr. Hebert Luis Hernández Montiel
Presidente

Dr. Adrián Hernández Lomelí
Secretario

MSP. Alberto Juárez Lira
Vocal

Dr. Pablo García Solís
Suplente

Dr. Juan Carlos Solís Sáinz
Suplente

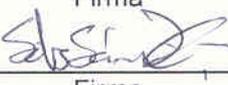
Med. Esp. Enrique A. López Arvizu
Director de la Facultad


Firma


Firma


Firma

P. García Solís
Firma


Firma

Dr. Luis Gerardo Sandoval Hernández
Director de Investigación y
Posgrado

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
Septiembre 2009
México

RESUMEN

La proyección axonal está controlada por regiones que la dirigen durante el desarrollo embrionario. Se postula que alguna de las regiones del prosencéfalo es la responsable de esta señalización. Estas regiones de control involucran familias de moléculas quimiotrópicas que participan en la formación de la red de conexiones neurales del sistema nervioso central en vertebrados. Estudios previos describen que la prosómera 1 es un organizador del crecimiento axonal del núcleo intersticial de Cajal (NIC) conforma el fascículo longitudinal medio del mesencéfalo. Con diseño experimental en 10 embriones de pollo (estadio 19 a 21 de Hamburger y Hamilton), se caracterizaron con técnicas de inmunohistoquímicas en la región del prosencéfalo, previa microcirugía *in ovo*. La sección del prosencéfalo rostral y mesencéfalo determinaron al grupo experimental y de la prosómera 1 y 2 al control. Se evaluó la ausencia de la prosómera 1 con: el anticuerpo 3A10, Calbindina, Marcaje axonal retrógrado e Hibridación in situ, Resultados: los cuerpos neuronales del NIC se ubicaron, sin proyección axonal ni formación del FLM. Se demostró que la ausencia de prosómera 1 provoca una falta de proyección del NIC, identificado mediante inmunohistoquímica contra neurofilamento 3a10, cabindina y con marcaje axonal retrógrado. Los datos se analizaron con estadística descriptiva en el programa SPSS.

Palabras Clave: NIC, proyección axonal longitudinal, prosómera 1.

SUMMARY

Axon projections in the hindbrain offer a suitable model for the study of longitudinal axon guidance; ascending or descending longitudinal projections originate from ipsilateral or contralateral neurons which follow medial or lateral longitudinal tracts. We have addressed the control of longitudinal axon pathfinding in the developing hindbrain, including the caudal projections of interstitial Cajal Nucleus (ICN). To test potential sources of guidance signals, we assessed axon outgrowth from embryonic chick mesencephalon ICN without caudal prosencephalon. When the caudal prosencephalon was surgically separated from the mesencephalon, caudal Cajal axon projections failed to form, the medial longitudinal fasciculus (MLF) was not formed. Immunohistochemistry for Interstitial Cajal Nucleus neuronal markers indicated that the caudal projections of these neuronal subpopulations were inhibited by caudal prosencephalon absence.

These results suggest that diffusible chemorepellent signals from prosomere are involved in the caudal direction of INC projections, the molecular nature of the axon guidance activity in the prosomere 1 was not determined in this study

Key words: INC, Axon projections in the hindbrain prosomere 1

DEDICATORIAS

A Mis padres y hermanos, por ser la motivación y porque nadie más que ustedes valoraron, entendieron y apoyaron mi esfuerzo y su ejemplo siempre estuvo presente en mí en los momentos difíciles.

A mi bebé por ser la mejor parte de todos los días

INDICE

Resumen	i
Summary	ii
Dedicatorias.....	iii
Agradecimientos	iv
Índice	v
Índice de figuras	vi
I. Introducción	1
II. Revisión de la literatura	3
II.1. Vías de señalización axonal embrionaria	3
II.2. Mecanismos de control de la proyección axonal	6
II.3. Nucleo Intersticial de Cajal	7
II.4. neuronas retículoespinales	8
III. Metodología	10
III.1. Técnica de Inmunohistoquímica	11
III.2. Marcaje axonal retrogrado	11
III.3. Hibridación <i>in situ</i>	12
III.4.Soluciones	13
III.4.1 Soluciones para hibritación <i>in situ</i>	14
III.5. Materiales	14
IV. Resultados	16
V. Discusión	21
VI Referencias bibliográficas	23

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA		Página
1	Proyección Caudal del NIC.	16
2	La ausencia del diencéfalo caudal provoca una falta de marcaje de la proyección del NIC.	17
3	Falla en la proyección del NIC por la ausencia del diencéfalo caudal.	18
4	La prosómera 1 es responsable de la actividad quimiotropica en la orientación de la proyección caudal del NIC	19
5	La falta de proyección del NIC provoca una disminución de la proyección de las neuronas retículo espinales de los grupos rostral y bulbar hacia el FLM.	20
6	Las cirugías en embriones de pollo <i>in ovo</i> afectan la proyección 21 inicial de los axones del NIC pero no la expresión de marcadores regionales para neuronas retículo espinales ni motoras.	

I. INTRODUCCIÓN

El Sistema Nervioso Central (SNC) de los mamíferos está constituido por una

compleja red de circuitos neuronales interconectados que en su mayoría se forman durante las etapas tempranas del desarrollo embrionario (Daston y Koester, 1996). Estos circuitos neuronales se establecen a través de proyecciones estereotípicas de axones en crecimiento desde su sitio de origen hasta sus sitios blanco. A través de señales guía, las cuales son detectadas por receptores localizados en su extremo distal (el cono de crecimiento), las neuronas son capaces de responder a estos estímulos de orientación y crecimiento (Mueller, 1999; Kanki y Kuwada, 2000).

La proyección axonal está controlada por sistemas que se pueden clasificar en señales de corto y de largo alcance, dependiendo de su sitio de producción (Tessier-Lavigne y Goodman, 1996; Varela-Echavarría y Guthrie, 1997). Estos sistemas de control involucran familias de moléculas quimiotrópicas que participan en la formación de la compleja red de conexiones neurales que caracterizan al sistema nervioso central de vertebrados. Actualmente, los sistemas que guían la proyección axonal sobre el eje longitudinal del tubo neural son poco conocidos. Este trabajo se enfoca en el estudio de la proyección del NIC, núcleo par simétrico, de proyección ipsilateral en sentido caudal. En el embrión de pollo, el NIC constituye uno de las proyecciones más tempranas y pioneras en el desarrollo embrionario del neuroepitelio. Se ha postulado que muchas de estas proyecciones pioneras podrían actuar como un andamiaje para la ulterior proyección de nuevos núcleos a través de tractos establecidos con anterioridad. En el adulto, el NIC participa en sistemas complejos de integración de los movimientos de las extremidades superiores en relación con el espacio, utilizando información proveniente del sistema visual y de la columna cervical.

El NIC nace en la zona caudal del diencefalo y en la rostral del mesencefalo, proyectando de forma caudal a través del FLM hacia el rombencefalo, donde las proyecciones de las neuronas reticuloespinales se unen. La presente investigación fue realizada en embriones de pollo, utilizando un modelo que nos permitió hacer evaluaciones de los eventos *in vivo*. A través de cirugías *in ovo*, pudimos determinar los efectos provocados por la ausencia de la región del diencefalo caudal sobre la proyección caudal del NIC y los efectos de esta falta de

proyección en el rombencéfalo.

II REVISIÓN DE LA LITERATURA

El funcionamiento del Sistema Nervioso Central (SNC) en los vertebrados depende de las conexiones neurales complejas que en su mayoría se establecen durante el desarrollo embrionario. En los estadios tempranos del desarrollo del tubo neural el neuroepitelio está formado por una capa delgada de células por lo que se puede decir que el crecimiento axonal ocurre solamente en dos dimensiones. (Kolodkin, 1996)

Durante el desarrollo del SNC, las neuronas envían proyecciones axonales que nacen directamente del soma o cuerpo celular. En el extremo distal de cada axón se encuentra el cono de crecimiento que es la estructura capaz de detectar las señales guía que le permiten encontrar su blanco específico (Kolodkin, 1996). Durante el desarrollo embrionario, los axones intersticiales siguen una ruta descendente ipsilateral en el fascículo longitudinal medio (FLM)

II.1. Vías de señalización axonal embrionaria.

En el desarrollo del sistema nervioso de los vertebrados, los axones viajan a sus puntos blanco de acuerdo a señales precisas que los direccionan en su entorno. Los tractos axonales primarios se orientan predominantemente de manera longitudinal o circunferencial, formando una serie de vías ortogonales un axón primario “estructural”. Estos tractos constituyen un sustrato de desarrollo para el posterior crecimiento axonal, así se forman las bases para la emergencia de la compleja arquitectura del sistema nervioso central.

El tracto longitudinal dominante en la estructura axonal temprana es el fascículo longitudinal medio. De particular importancia es la regulación genética para la diferenciación de las neuronas del fascículo longitudinal medio desde las que se forman en la comisura posterior como las de la unión de cerebro medio-cerebro anterior.

En el desarrollo, dos prominentes tractos de axones longitudinales atraviesan tempranamente la rombómera 1: el fascículo longitudinal medio y el fascículo

longitudinal lateral, ambos son precedidos por axones del núcleo intersticial de Cajal y del núcleo mesencefálico del trigémino respectivamente. En el pollo, el fascículo longitudinal medio es el primer tracto que desciende desde el cerebro anterior, en contraste al ratón, en el cual aparece posterior al desarrollo. Las neuronas del núcleo intersticial de Cajal se originan cerca de la línea diencéfalo-mesencefálica y rostral al núcleo del nervio oculomotor, los axones crecen primero ventralmente hacia la línea media y luego caudalmente, formando el fascículo longitudinal medio que cursa a través de cerebro medio y cerebro posterior hacia el cordón (medula) espinal.

Se hallan señales extracelulares regulan el crecimiento axonal que pueden ser sustratos, sustancias solubles a los que se es negativo o positivo, múltiples familias de moléculas que direccionan el desarrollo axonal han sido identificadas. Los receptores neuronales de crecimiento axonal positivo responden a sustratos que consisten en una gran parte de células-moléculas de adhesión de las superfamilias de la caderina y de inmunoglobulinas y de heterodímeros integrina tipo β 1. Durante la guía axonal se requieren otras familias de ligandos y receptores como las netrinas/DDC, semaforinas/plexins, slits/robo y efrinas/receptores

Estas moléculas pueden actuar de manera contacto dependiente o por difusión y ejercer efectos de atracción o repulsión sobre los conos de crecimiento, la distribución y el mecanismo de acción de las moléculas guía han sido estudiadas intensamente con respecto al camino que siguen los axones a través de trayectorias circunferenciales.

El patrón mejor caracterizado de la migración de la célula es radial, desde la capa más interna del tubo neural hasta la más cercana a la superficie del cerebro. La vía radial de la migración de la célula primero fue postulada por Ramón y Cajal en 1890.

Los mecanismos moleculares que rigen la señalización axonal a través de la vía longitudinal incluyendo los tractos axonales primarios en el desarrollo del

sistema nervioso central, son menos conocidos. Ello parece ser que a través del eje rostrocaudal, las señales de guía son ejecutadas por estructuras particulares, por ejemplo las regiones limítrofes. En el cerebro posterior, los límites del rombómero actúan como conductores para el axón primario de crecimiento en el plano circunferencial.

También en el cerebro anterior los tractos axonales parecen desarrollarse en áreas limítrofes. En el caso del cerebro anterior recientemente se demostró que no en todas esas zonas se define claramente la trayectoria de los axones antecesores, primarios o pioneros.

La maquinaria citoesquelética neuronal puede ser responsable de una amplia gama de señales guía y vías de señalización. Los factores que influyen en el crecimiento axonal incluyen simples barreras estructurales, así como tejidos impenetrables, campos eléctricos, fototropismo y estereotropismo

Presuntivamente las vías expresan moléculas específicas de señalización que se incluyen en la determinación de la polaridad de los tractos longitudinales con respecto a la línea media, de manera reciente surgió la idea de estudiar los mecanismos moleculares determinantes de la posición de los tractos axonales longitudinales en *Drosophila* mostrando que la sensibilidad diferencial a la molécula repelente *slit* de la línea media resultó en tractos axonales adoptando una posición medio lateral a considerable distancia desde la línea media. Mecanismos similares pueden operar en los vertebrados, así como en el cordón espinal el comportamiento ventral del cerebro medio está regido por el señalizador Shh derivado de la placa del piso. La señalización ventral es crucial para el desarrollo correcto de del cerebro medio ventral.

En otra vertiente, las proteínas RNA-acopladoras se han involucrado en el crecimiento de las neuritas en los embriones y en el desarrollo del sistema nervioso del adulto.

II.2. Mecanismos de control de la proyección axonal.

La proyección axonal está controlada por sistemas moleculares que se pueden clasificar en señales de corto y de largo alcance (Tessier-Lavigne y Goodman, 1996; Varela-Echavarría y Guthrie, 1997). Los mecanismos de corto alcance consisten en moléculas ancladas a la membrana celular o a la matriz extracelular de las células que las producen. Entre este tipo de señales podemos citar a las proteínas *slit* (Brose y Tessier-Lavigne, 2000), a moléculas de adhesión celular como NCAM y L1 y a las efrinas y sus receptores (Kury et al., 2000). Los mecanismos de largo alcance consisten en señales secretadas que difunden desde su sitio de síntesis formando gradientes de concentración decreciente en el tejido circundante. Ejemplos de señales de largo alcance lo constituyen las semaforinas de secreción, las netrinas y las proteínas BMP.

Algunos de los grupos de moléculas descritos guían el crecimiento axonal a lo largo de rutas circunferenciales en el tubo neural en desarrollo, esto es, a lo largo de rutas ortogonales a su eje longitudinal (Kaprielain, Imondi y Runko, 2000). Destacan entre ellas las netrinas (Kennedy et al., 1994; Colamarino y Tessier-Lavigne, 1995; Chan et al., 1996; Ren et al., 1999), BMP's y *slit* (Kidd, Bland y Goodman, 1998; Van Vactor y Flanagan, 1999; Wang et al., 1999; Rajagolapan et al., 2000) en la proyección de las neuronas comisurales espinales. Estas neuronas proyectan ventralmente desde la porción dorsal del tubo neural y atraviesan la línea media para después proyectar en sentido ascendente. Estas neuronas inician la proyección ventral alejándose de la placa del techo que expresa la proteína BMP-7 (Augsburger et al., 1999); en su proyección ventral, son atraídas hacia la placa del piso (PP), en la línea media ventral, que expresa netrina-1 (Serafini et al., 1996). Posteriormente, las proteínas *slit*, que se expresan también en la línea media, controlan el cruce en la placa del piso, evitando que los axones crucen nuevamente (Rothberg et al., 1990)

II.3. Núcleo Intersticial de Cajal.

El Núcleo Intersticial de Cajal (NIC) es el más grande y prominente de los grupos celulares del Fascículo Longitudinal Medio. Contiene al menos dos clases celulares denominadas piramidales grandes o neuronas multipolares y piramidales pequeñas-medianas, fusiformes o células redondas. Múltiples estudios sugieren que el NIC participa en un sistema que integra a los movimientos oculares y el sistema músculoesquelético para el control de los movimientos de las extremidades superiores y su relación con el espacio. Sin embargo, existen proyecciones que incluso llegan a zonas lumbares, donde se cree que participan en la integración espacial corporal. Emite proyecciones al núcleo oculomotor y troclear, al complejo vestibular, al complejo olivar inferior y a la medula espinal. Recibe proyecciones desde la corteza cerebral, la placa, el cerebelo, el núcleo vestibular y la medula espinal.

Tres grupos distintos de células pueden ser reconocidos dentro del NIC, los cuales presentan proyecciones específicas a zonas circundantes. Uno de ellos es dirigido a través de la comisura posterior para finalizar en la zona densa del NIC contralateral, el núcleo oculomotor y el núcleo troclear; otro de ellos, es una proyección descendente hacia el puente ipsilateral, el núcleo medular y el asta ventral de segmentos espinales cervicales y una tercera proyección ascendente que llega a estructuras mesencefálicas y diencefálicas ipsilaterales.

La citoarquitectura del NIC se han realizado en roedores, gatos y en el hombre. Las características de ultraestructura aún son limitadas y sólo han sido reportados en roedores.

La extensión regional del NIC abarca desde la región de la unión meso-diencefálica, que inicia justo dorsal a la región en la que cruzan las fibras del fascículo retroflexus, alejado de la zona rostral de las células columnares somáticas del núcleo oculomotor. Se localiza ventrolateralmente a la materia gris periacueductal y en el nivel adyacente al núcleo de Darkschewitsch.

II.4. Neuronas retículoespinales.

Las neuronas de la formación reticular del romboencéfalo dan lugar a varias proyecciones, incluyendo la vía retículoespinal originada en las neuronas retículoespinales cuyos axones se unen de forma ipsilateral al FLM o proyectan a través de la placa del piso antes de unirse al FLM contralateral (Glover y Petursdottir, 1988; Easter y Frankfurter, 1993; Parent, 1996; Bélanger et al., 1997; Auclair, Marchand y Glover, 1999). Tanto en embriones de pollo como de roedores, las neuronas retículoespinales se encuentran organizadas en columnas longitudinales con núcleos localizados en niveles específicos del eje longitudinal (Glover y Petursdottir, 1988; Clarke y Lumsden, 1993; Glover, 1993; Auclair, Marchand y Glover, 1999). Dos columnas se encuentran en la médula (rombómeras 6 a 8); una de ellas proyecta ipsilateralmente y la otra de forma contralateral. La columna ipsilateral se continúa en el puente (rombómera 1 a 5) mientras que la contralateral es interrumpida a nivel de la prosómera 5 (Mastick y Easter, 1996). Las neuronas serotoninérgicas y adrenérgicas son otras poblaciones que siguen proyecciones longitudinales en el romboencéfalo en desarrollo. Las neuronas serotoninérgicas se desarrollan en el romboencéfalo rostral y dan lugar a los núcleos caudales lineales, al núcleo dorsal del rafe, al núcleo medial del rafe y al grupo B9 de Dalhström y Fuxe (Dalhström y Fuxe, 1964; Aitken y Tork, 1988).

En contraste, el núcleo serotoninérgico caudal tiene principalmente proyecciones caudales (Parent, 1996). Se ha mostrado que las neuronas positivas para feniletanolamina-N-metiltransferasa (PNMT) que se desarrollan en el romboencéfalo rostral, dan lugar a centros adrenérgicos en el puente que presentan tanto proyecciones ascendentes como descendentes (Shimada, Takatsuji y Wanaka, 1998).

En el romboencéfalo de anfibios, la dirección de crecimiento caudal de las neuronas retículoespinales Mauthner es influenciada por la polaridad del tubo neural. Las neuronas Mauthner presentes en fragmentos neuroepiteliales romboencefálicos transplantados homotópicamente pero en orientación inversa de

a acuerdo a su eje longitudinal, proyectan inicialmente de forma ascendente de acuerdo al eje original del implante. Sin embargo, la mayoría de ellas viran caudalmente siguiendo la proyección normal de acuerdo a la polaridad del tubo neural del hospedero (Hibbard, 1965).

III METODOLOGÍA

El presente trabajo se realizó en embriones de pollo de la cepa White Leghorn, incubados a los estadios de Hamburger y Hamilton (HH) deseados (Hamburger y Hamilton, 1951) para realizar marcaje axonal retrógrado con dextrán fluorescente, inmunohistoquímica, microcirugías *in ovo* o en hibridación *in situ*.

Se observaron los lineamientos éticos del manejo de animales de acuerdo con la norma sobre especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio, (NOM-062-ZOO-1999) y del Catálogo de normas oficiales mexicanas (SECOFI, 1999).

Las microcirugías se realizaron en los embriones de pollo en estadio HH12. Se realizó un corte en el cascarón del huevo con tijeras curvas para poder acceder al embrión, inyectando tinta china al 10% en PBS por debajo de la yema para visualizar al embrión. Los embriones fueron sometidos a un corte transversal en la unión del mesencéfalo con el prosencéfalo caudal, separando completamente el mesencéfalo del diencefalo (experimentales). Después, fue removido por completo el tejido diencefálico restante, evitando así, la regeneración. Los embriones control fueron sometidos al mismo procedimiento quirúrgico, pero el corte transversal fue realizado por encima de la prosómera 2 o en las prosómeras 5 y 6. Después de la cirugía, fueron agregadas unas gotas sobre el embrión de solución Ringer con penicilina-estreptomicina a una dilución de 1:100, la pieza del cascarón removida al inicio de la cirugía fue recolocada, cubriendo por completo la ventana y fue sellada con cinta adhesiva. Después de esto, todos los huevos fueron puestos en una incubadora humidificada y a 39° C hasta alcanzar los estadios HH19 a 22. A este término, sólo aquellos embriones que tuvieron una apariencia normal fueron lo utilizados para seguir con los experimentos marcaje axonal retrógrado, hibridación *in situ* e inmunohistoquímica.

III.1. Técnica de Inmunohistoquímica.

- 1.- Fijar los embriones con paraformaldehído al 3.5.
- 2.- Realizar 6 lavados en PBS/tritón 1%, 15 minutos cada uno.
- 3.- Lavar dos veces con PBS/Tritón 1%/peróxido de hidrógeno1% una hora a temperatura ambiente.
- 4.- Incubar en solución PBS/Tritón 1%/suero de cabra 10% durante 3 horas a temperatura ambiente.
- 5.- Incubar el anticuerpo primario durante 72 horas a 4 °C.
- 6.- Lavar con PBS/Tritón 1% durante 1 día completo haciendo 6 cambios a 4 °C.
- 7.- Incubar el anticuerpo secundario en PBS/Tritón/suero de cabra 10% durante 1 día completo a 4 °C.
- 8.- Lavar con PBS/tritón al 1% durante 1 día completo.
- 9.- Revelar con diaminobencidina:
 - a) Disolver una tableta de DAB de 20 mg en 20 ml de tris 0.1M pH 7.2, centrifugar antes de usar.
 - c) Incubar en esta solución durante 2 horas a temperatura ambiente.
 - d) Disolver otra tableta como en el inciso a y añadir 6 µl de peróxido de hidrógeno por cada 10 ml de solución.
 - e) Incubar con esta solución hasta alcanzar el contraste y color deseado de la reacción.
 - f) Lavar rápidamente con PBS.

III.2. Marcaje axonal retrógrado.

Para llevar a cabo el marcaje de la proyección caudal de las neuronas se utilizarán embriones de pollo EHH 19-22. El marcaje de neuronas en embriones de pollo usando dextrans conjugado con rodamina y FITC se realizará de la siguiente manera: los embriones se fijarán a una superficie de silicón y serán sumergidos en medio D-MEM, se realizará un corte transversal

a nivel de r6-r7, aplicando inmediatamente el dextrán fluorescente utilizando unas pinzas finas. Después del marcaje, los embriones serán incubados por 2 horas en el mismo medio a 37 °C en una atmósfera de CO₂ al 5% y posteriormente fijados con paraformaldehído al 4.5%. Este método de marcaje será utilizado para visualizar a las neuronas de proyección caudal después de las microcirugías in ovo.

III.3. Hibridación *in situ*.

Los embriones de pollo serán fijados y se les realizará hibridación *in situ* como se describe enseguida. Se usarán sondas para Lhx-1, Lhx-3 e Islet-1.

Método

- 1.- Disecar los embriones en PBS.
- 2.- Deshidratar los embriones en series de metanol/PBT (25%, 50%, 75%) por 15 minutos cada una.
- 3.- Lavar dos veces con metanol al 100% por 10 minutos cada una.
- 4.- Rehidratar los embriones en series de metanol/PBT (75%, 50%, 25%) por 10 minutos cada una.
- 5.- Lavar dos veces con PBT, 10 minutos cada una.
- 6.- Aclarar los embriones con peróxido de hidrógeno 6% en PBT por 1 hora.
- 7.- Lavar los embriones 3 veces en PBT, 10 minutos cada una.
- 8.- Tratar con proteinasa K (10 µg/ml en PBT) por 20 minutos a temperatura ambiente sin agitación. Detener la digestión de la proteinasa K reemplazando con una solución de paraformaldehído al 3.5%, glutaraldehído al 0.2% y tween-20 al 0.1% durante 20 minutos.
- 9.- Lavar dos veces con PBT durante 10 minutos cada una.
- 10.- Agregar a los embriones 4 ml de buffer de hibridación para la prehibridación e incubar al menos por una hora a 70 °C.
- 11.- Reemplazar la solución de hibridación con la solución de hibridación precalentada con la sonda e incubar los embriones por 1 día a 70 °C. La

concentración total de la sonda no debe exceder 1 µg/ml.

Lavados post-hibridación, se realizan a 70 °C y con soluciones precalentadas.

12.- Lavar 3 veces con la solución I, 30 minutos cada una.

13.- Lavar 1 vez con una mezcla 1:1 de la solución I y la solución II, por 30 minutos.

14.- Lavar 3 veces con la solución II, 30 minutos cada una.

15.- Lavar 3 veces con la solución III, 30 minutos cada una.

16.- Enjuagar a temperatura ambiente con MABT 3 veces por 10 minutos cada una.

17.- Reemplazar la solución MABT con MABT/suero de cabra al 15% y preincubar por 3 horas.

18.- Reemplazar con solución fresca con el anticuerpo anti-DIG 1:3000 e incubar toda la noche a 4 °C.

19.- Lavar 6 veces con MABT, una hora cada una.

20.- Lavar 3 veces con NTMT por 10 minutos cada una.

21.- Incubar con la solución colorante NBT/BCIP (agregar 4.5 µl de NBT y 3.5 µl de BCIP por cada mililitro de NTMT) a temperatura ambiente hasta que se desarrolle la tinción deseada.

22.- Detener la reacción lavando 3 veces con NTMT, 10 minutos cada una.

23.- Fijar con paraformaldehído al 3.5% en PBS toda la noche para preservar la tinción.

III.4. Soluciones.

Medio Opti-Mix: Optimem 70% (# de catálogo 51985-034, Gibco), nutrimix f-12 23.5% (# de catálogo 10565, Gibco), suero fetal bovino 4.7% (# de catálogo 16000-044, Gibco) y penicilina/estreptomicina 1:100 0.5% (# de catálogo 15140-122, Gibco).

Fijador: Paraformaldehído al 3.5% (# de catálogo P6148, Sigma) en PBS/pH 7.3.

Solución de Ringer: 0.1232 M de NaCl (# de catálogo 3624-05, J.T. Baker), 0.0015 M de CaCl₂-2H₂O (# de catálogo 1332-01, J.T. Baker) y 0.0049 M de KCl (# de

catálogo 3040-01, J.T. Baker).

Solución PBS pH 7.3: 0.0014 M de NaCl, 0.0026 M de KCl, 0.0042 M de Na₂HPO₄ (# de catálogo 3828-01, J.T. Baker) y 0.0014 de KH₂PO₄ (# de catálogo 3246-01, J.T. Baker).

III.4.1. Soluciones para hibridación *in situ*.

Buffer de hibridación: Formamida (# de catálogo 4028-01, J.T. Baker) 25 ml, SSC pH 4.5 12.5 ml, heparina (# de catálogo H-5263, Sigma) (50 mg/ml) 50 µl, Tween-20 500 µl, Yeast RNA (# de catálogo 109 223, Roche) (20 mg/ml) 125 µl, SSDNA (# de catálogo D-7656, Sigma) (10 mg/ml) 250 µl, aforar con agua a 50 ml.

Solución I: Formamida 25 ml, SSC pH 4.5 10 ml, SDS (sodium dodecyl sulfate, # de catálogo 15525-017, Invitrogen)) 10% 5 ml, aforar con agua a 50 ml.

Solución II: NaCl 2M 12.5 ml, Tris 1M pH 7.5 500 µl, Tween-20 10% 500 µl, aforar con agua a 50 ml.

Solución III: formamida 25 ml, SSC pH 4.5 5 ml, aforar con agua a 50 ml.

Solución NTMT: NaCl 2M 2.5 ml, Tris pH 9.5 1M 5 ml, MgCl₂ 2M 1.75 ml, Tween-20 10% 500 µl, aforar con agua a 50 ml.

Solución MABT: ácido maléico (P460-07, J.T. Baker) 0.1 M, NaCl 150mM y Tween-20 0.1%.

SSC 20X: NaCl 3M, citrato de sodio (# de catálogo 364605, J.T. Baker) 0.3M pH 4.5.

III.5. Materiales.

Anticuerpos primarios:

Anticuerpo contra calbindina.

Anticuerpo contra neurofilamento, 3A10

Anticuerpos secundarios:

Anticuerpo anti-conejo, conjugado a CyTM3.

Anticuerpo anti-ratón, conjugado a fluoresceína.

Anticuerpo anti-conejo, conjugado a peroxidasa.

Anticuerpo Anti-DIG (anti-digoxigenin-AP Fab fragments).

Otros reactivos:

Diaminobencidina, # de catálogo D-5905, Sigma, St. Louis, MO, USA.

Tritón X-100, # de catálogo X198-07, J.T. Baker.

Tween 20, # de catálogo X251-07, J.T. Baker.

Metanol, # de catálogo 9070-03, J.T. Baker.

Proteinasa K, # de catálogo 25530-015, GibcoBRL.

Glutaraldehído 50%, # de catálogo 16310, Electron Microscopy Sciences.

NBT (4-nitro blue tetrazolium chloride, # de catálogo 1 383 213, Roche.

BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate), # de catálogo 1 383 221, Roche.

Sacarosa, # de catálogo 4072-01, J.T. Baker.

Dextrán fluorescente.

Peróxido de hidrógeno al 30%, # de catálogo 2186-01, J.T. Baker.

DABCO/Glicerol 0.21 M.

0.233 grs. de DABCO (# de catálogo D-2522, SIGMA, St. Louis, MO, USA) se disuelven en 800 µl de agua MQ, más 200 µl de tris (# de catálogo 4109-06, J.T. Baker) 1M pH 8 y 9 ml de glicerol (# de catálogo 2136-02, J.T. Baker). Se deja en agitación toda la noche. Almacenar a -20 °C

IV RESULTADOS

El diencefalo caudal es fuente de una actividad difusible que controla el crecimiento de los axons del NIC

Con la finalidad de evaluar si la proyección en sentido caudal del NIC se encuentra influenciada por señales rostrales provenientes del diencefalo, se desarrollaron cirugías in ovo en embriones de pollo en estadio HH12 (Figura 1A). Estas cirugías consistieron en separar por completo la región del diencefalo caudal del mesencefalo, separándolo del núcleo y evitando cualquier posible efecto de esta zona sobre la proyección caudal (corte-rMes). Los animales control fueron sometidos también a un corte transversal pero a nivel de las prosómeras rostrales, sin afectar la continuidad del diencefalo caudal con el mesencefalo y por tanto, con el NIC (corte-rPros) (Figura 1B).

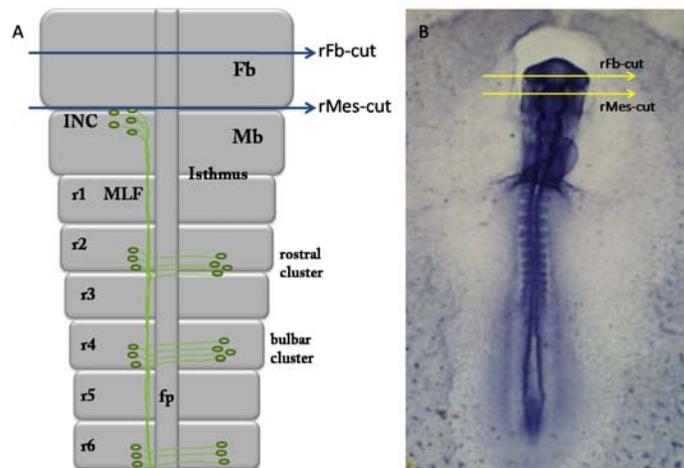


Figure 1. Proyección caudal del NIC. La figura A esquematiza la proyección ipsilateral del NIC, la formación del FLM y la proyección adicional de las neuronas reticuloespinales a distintos niveles del rombencéfalo. Se muestran los niveles de los cortes realizados en las cirugías in ovo. El corte rFb-cut (flecha azul en A), corresponde a los animales control y el corte rMes-cut (flecha azul en A), nos permitió la ablación del tejido diencefálico de forma completa. La figura B muestra una fotografía del embrión de pollo en E HH12 antes de ser intervenido (niveles de los cortes mostrados en flechas amarillas).

Una vez terminado el período de incubación, los embriones así operados fueron marcados con dextrán fluorescente a nivel de la prosómera 6. Los animales control mostraron el marcaje axonal retrógrado del fascículo longitudinal medio y de su origen más rostral, el NIC. Además, se pudo observar el marcaje del TmesV, con su proyección en el fascículo longitudinal lateral (Figura 2A). Sin embargo, cuando los embriones experimentales (Figura 2B) fueron marcados, sólo pudo apreciarse el marcaje del fascículo longitudinal lateral y el TmesV, faltando por completo la proyección del FLM y el marcaje del NIC (Figura 2C). Este resultado nos muestra que la ausencia de la zona del diencefalo caudal provoca un fallo en la proyección caudal del NIC.



Figure 2. La ausencia del diencefalo caudal provoca una falta de marcaje de la proyección del NIC. Las cirugías realizadas en los animales experimentales provocaron una ausencia de marcaje axonal retrógrado con dextrán fluorescente, no se observó al FLM. Los animales control (A) presentaron una proyección normal del FLM y se visualiza la ubicación de las neuronas del NIC, así como la proyección del trigémino (TmesV) en la zona dorsal del neuroepitelio embrionario. En los animales experimentales (B) sólo se pudo observar la proyección del TmesV en la zona dorsal del neuroepitelio pero no la proyección del NIC. Barra de escala: 1mm.

El crecimiento caudal del NIC es abolido en ausencia del diencefalo caudal

Ante la posibilidad de una falla en la proyección caudal del NIC y para descartar la ablación completa del núcleo por el corte o la muerte celular, se realizó una

inmunotinción contra calbindina, la cual tiñe de forma específica al NIC y al FLM (Figura 3A y B). Cuando los embriones experimentales fueron inmunoteñidos se pudo observar que el corte-rMes se encuentra por encima de la ubicación del NIC y no es lesionado con la cirugía (Figura 3C y D). Además, el núcleo presenta una disposición anatómica normal pero sin proyección caudal, lo que provoca a su vez, una ausencia del FLM (flecha roja en 3C y D). Este resultado es interesante, ya que muestra que la ausencia del diencefalo caudal provoca una falta de proyección caudal sin afectar la sobrevivencia del núcleo.

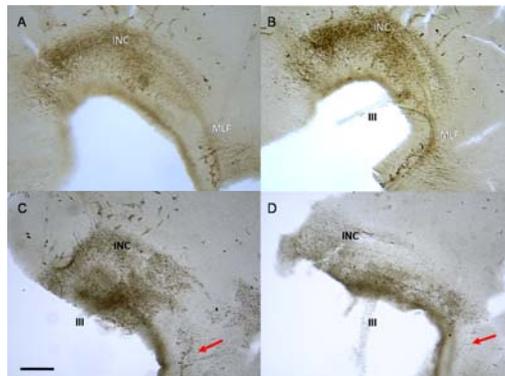


Figure 3. Falla en la proyección del NIC por la ausencia del diencefalo caudal. La figura muestra el patrón de proyección del NIC en los animales control (Ay B) y el efecto que provoca la ablación del diencefalo caudal (C y D). Los animales fueron marcados mediante inmunofluorescencia contra calbindina, mostrando la permanencia del núcleo en su ubicación normal pero con ausencia en la proyección caudal, provocando a su vez, una ausencia de la formación del FLM en su origen más rostral (flecha roja). Barra de escala: 1 mm.

Cuando el corte se realizó por encima del nivel de la prosómera 1 (línea roja punteada, Figura 4A), la proyección caudal del NIC fue restituida, formando de forma normal el FLM (Figura 4B). Esto nos permite sugerir que la actividad quimiotrópica causante de la orientación inicial del NIC reside en la zona de la prosómera 1 (p1).

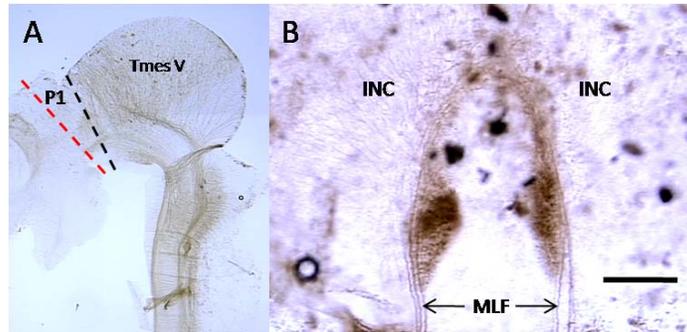


Figure 4. La prosómera 1 es responsable de la actividad quimiotrópica en la orientación de la proyección caudal del NIC. Cuando el corte en las cirugías in ovo se realizaron por encima de la prosómera 1, permitiendo la continuidad anatómica con el NIC (flecha roja en A), la proyección del NIC y la formación del FLM ocurrieron de forma normal (flechas negras en B). Barra de escala: 0.1 mm.

La proyección caudal de los axones reticuloespinales rombencefálicos es aberrante en ausencia de la proyección caudal del NIC.

Estudios anteriores han mostrado que la zona del istmo participa en el control de la orientación de la proyección de las neuronas reticuloespinales rombencefálicas. El istmo promueve el crecimiento en sentido caudal de estas neuronas, rechazando el crecimiento hacia niveles caudales dentro del FLM. Debido a que el eje longitudinal del tubo neural es muy extenso, resulta probable que existan varios sistemas de navegación a distintos niveles de este eje, asegurando la adecuada proyección axonal embrionaria. Ante tal posibilidad, evaluamos si la ausencia del FLM debido a la falta de proyección del NIC provocaba alguna alteración en los patrones de proyección de las neuronas reticuloespinales rombencefálicas en los grupos rostral y bulbar, correspondientes a las primeras 4 rombómeras del rombencéfalo. Se realizó un marcaje axonal retrógrado del FLM en el límite entre las rombómeras 6-7 y se contabilizaron los somas neurales marcados por dicha técnica (Figura 5). Los análisis mostraron que la falta de proyección del NIC disminuye de forma significativa el número de neuronas reticuloespinales que proyectan hacia el FLM en comparación con los controles (Figura 5A, corte-rPros). En los animales experimentales, se encontró una

disminución de la proyección general de la zona en un 48.6% para ambos grupos, tanto rostral como bulbar (Figura 5B, corte-rMes). A nivel de la prosómera 2, la disminución fue del 51.56%; en la prosómera 3, fue del 61.79% y en la prosómera 4, del 32.45%; siendo los niveles rostrales más afectados (Figura 5C). Estos resultados sugieren la posibilidad de que los axones de las neuronas reticuloespinales utilicen como andamiaje la proyección del NIC, fasciculando sobre esta proyección inicial pionera.

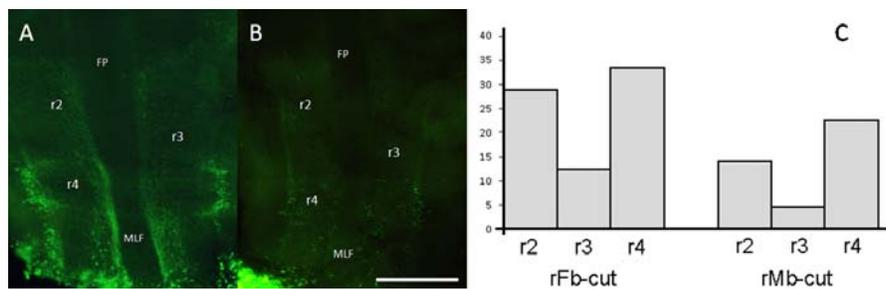


Figure 5. La falta de proyección del NIC provoca una disminución de la proyección de las neuronas reticuloespinales de los grupos rostral y bulbar hacia el FLM. El corte realizado por encima de la prosómera 1 (control, A, rFB-cut) muestra un patrón de proyección normal, mientras que la ablación del diencefalo caudal (rMb-cut, B) disminuyó de forma significativa el número de neuronas reticuloespinales que proyectan en sentido descendente hacia el FLM. Barra de escala: 1mm.

Para asegurar que la intervención quirúrgica no altera el desarrollo regional del neuroepitelio embrionario, se evaluó mediante hibridación in situ la expresión de los factores de transcripción regionales para neuronas reticuloespinales Lhx1 (Figura 6) y Lhx3 y del factor de transcripción Islet-1 para neuronas motoras; los resultados en ambos grupos fueron normales, se encontró que la cirugía no altera la expresión regional de estos factores. Estos resultados son similares a los ya descritos (Hernández-Montiel et al., 2003) y se anexan a la falta de alteraciones anatómicas mostradas por los animales sometidos a cirugías, donde el desarrollo regional de otros tractos de proyección longitudinal como el TmesV, o circunferencial, como el núcleo oculomotor (III par craneal), fueron normales.

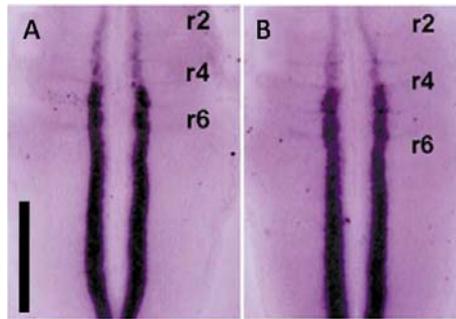


Figure 6. Las cirugías en embriones de pollo in ovo afectan la proyección inicial de los axones del NIC pero no la expresión de marcadores regionales para neuronas reticuloespinales ni motoras. La determinación de marcadores regionales de desarrollo no se vio alterada por las cirugías realizadas en los embriones, la hibridación in situ para Lhx1 en los controles (A) y los experimentales (B) fue similar. Barra de escala: 1mm.

V DISCUSIÓN

El diencefalo caudal es fuente de moléculas quimiotrópicas difusibles que afectan la proyección caudal del NIC.

Los resultados mostrados sugieren que la prosómera 1, la porción más caudal del diencefalo en desarrollo, participa de forma activa en el establecimiento de la proyección de tractos sobre el eje longitudinal del tubo neural. Debido a la extensa longitud del tubo neural en este eje, la posibilidad de que existan diversos sistemas regulando la proyección a distintos niveles es muy alta. En este estudio, se pudo determinar que la zona del diencefalo caudal participa de forma activa en la proyección caudal del NIC. Inicialmente, se identificó que los embriones sometidos a la ablación del diencefalo caudal fallaron en la proyección caudal; esto se pudo determinar mediante la ausencia del marcaje axonal retrógrado del NIC con dextrán fluorescente. Sin embargo, la ausencia del marcaje en esta técnica, no permite determinar con certeza la naturaleza del efecto sobre el núcleo. Tomando en cuenta que el efecto quimiotrópico ejerce sólo un control en la dirección del crecimiento axonal y no en la sobrevida del grupo neuronal

afectado, se esperaba que la ausencia del marcaje del NIC con dextrán fluorescente se debiera a una falta en la proyección y no a la afectación de la sobrevida del núcleo mismo. La identificación específica del NIC mediante el uso de anticuerpos contra calbindina nos permitió identificar que tras la cirugía de ablación del diencefalo caudal, el NIC se encontraba en su sitio anatómico habitual pero con ausencia en la proyección, es decir, las neuronas parecen tener una disposición similar a los controles, pero carecen de proyección axonal y no forman la porción inicial del FLM. Existe la posibilidad de que las cirugías realizadas disminuyan de forma ligera el número de neuronas que conforman el núcleo, sin embargo, la inmunohistoquímica reveló que la mayoría de las neuronas del núcleo quedan en su ubicación habitual. Estas neuronas no proyectaron en sentido descendente, provocando una falla en la formación del FLM. Cuando las cirugías respetan la zona de la prosómera 1, la porción más caudal del diencefalo, la proyección del NIC en el FLM no sufre alteración. Esto sugiere que la actividad responsable del crecimiento caudal se encuentra presente en esta zona. El análisis mediante la inmunohistoquímica contra neurofilamento mostró que las proyecciones del TmesV y del núcleo oculomotor (III par craneal) son normales; de la misma forma, las estructuras del mesencefalo y rombencefalo también son normales. La determinación de los patrones de expresión de factores de transcripción Lhx1, Lhx3 y Islet-1, que son característicos de esta zona tampoco se alteran con la cirugía de ablación del diencefalo (Hernández-Montiel et al., 2003; y resultados no mostrados). Estos datos en conjunto, nos hacen suponer que la alteración en la proyección del NIC se debe a la ausencia de la zona de prosómera 1 y no a la alteración que supone la cirugía misma.

Los axones mesencefálicos del FLM son necesarios para la correcta proyección de los axones reticuloespinales rombencefálicos

Con anterioridad, se había determinado que la zona del istmo ejerce un efecto de control sobre la proyección inicial de los grupos de neuronas reticuloespinales rostrales, promoviendo a través de una señal de rechazo, la proyección en sentido

descendente (Hernández-Montiel, et al., 2003). Los resultados en este estudio nos permitieron determinar la posibilidad de que el NIC también pudiera participar en este control de la proyección, esto al encontrar una reducción discreta de las neuronas proyectando en sentido descendente cuando se bloqueaba su proyección natural. En el presente estudio, al analizar la conducta de proyección de las neuronas reticuloespinales en los embriones experimentales operados, se observó una disminución del número de neuronas proyectando en el FLM a niveles caudales del rombencéfalo. La falta en la proyección del NIC disminuyó de forma significativa la proyección de los grupos rostral y bulbar de las neuronas reticuloespinales. Estos datos nos hacen suponer que tanto el istmo como la proyección del NIC participan en la proyección de los grupos rostrales de las neuronas reticuloespinales. Sin embargo, los mecanismos por los que ejercen esta actividad no son similares. El istmo ejerce su efecto mediante la producción de una molécula aún no identificada, secretada y que ejerce su efecto a larga distancia. Mientras que la proyección del NIC en el FLM provocaría un crecimiento fasciculado de las neuronas reticuloespinales al entrar en contacto con los axones que viajan en el fascículo, siguiendo la proyección en sentido caudal.

Mecanismos de proyección axonal longitudinal en el SNC en desarrollo

Los sistemas que participan en el control de la navegación axonal en el período embrionario han podido agruparse para su estudio en señales de corto y largo alcance. Así mismo, existen familias de moléculas con efectos quimiotrópicos que ejercen sus acciones en alguna de estas dos formas. Sin embargo, cuando se estudian los elementos que participan en la proyección de un determinado grupo neuronal, es frecuente observar que la proyección se encuentra siendo controlada por la conjunción de múltiples sistemas, con señales de corto y largo alcance actuando de forma confluyente y dinámicamente fluctuante. Tomando en cuenta la gran longitud que los axones tienen que viajar para establecer los tractos en el eje longitudinal, es muy probable que se encuentren sistemas a lo largo del territorio, conformando gradientes o señales locales en conjunto, permitiendo el control

global. En el estudio de la proyección del NIC pudimos identificar que la zona del diencéfalo caudal participa en la proyección inicial de este núcleo y que su ausencia provoca una falta de proyección caudal, al parecer sin afectar la sobrevivencia de las neuronas que integran este núcleo. Pero además, la falta de proyección caudal del NIC en el FLM, ocasiona a su vez, una disminución de la proyección caudal de las neuronas reticuloespinales ubicadas en la zona rostral del rombencéfalo en desarrollo; cabe hacer mención que las alteraciones descritas tuvieron una intensidad decreciente en sentido caudal, afectando de forma más drástica a los grupos de neuronas reticuloespinales rostrales y bulbares y mucho menos al grupo vagal, el cual prácticamente no parece ser afectado. Esta evidencia nos hace suponer que las neuronas caudales del sistema reticuloespinales podrían utilizar una señalización distinta para orientar su dirección de proyección, probablemente respondiendo a señales de atracción localizadas hacia los blancos de proyección o a través de un gradiente de señalización en el entorno.

Naturaleza de las señales guía sobre axones longitudinales pioneros

Los resultados mostrados sugieren que el efecto ejercido por el diencéfalo caudal pudiera corresponder a una molécula secretada al medio extracelular y que afecta la proyección inicial del NIC. Una posibilidad es que la semaforina 3A sea la molécula causante de este efecto. Existen reportes que indican que en el pez cebra (Wolman et al., 2004) y en embriones de pollo (Ahsan, Riley y Schubert, 2007, unpublished data), esta semaforina repele el crecimiento de los axones del FLM, mediando esta señalización a través de neuropilina-1. Además, participa en la repulsión de axones tectobulbares (Henke-Fahle, Beck y Püschel, 2001). Sin embargo, los resultados vertidos en este trabajo, revelan el papel fundamental que tiene esta zona del neuroepitelio, posiblemente a través de la semaforina 3A, para controlar la proyección inicial del NIC. Estableciendo además, que la proyección del NIC dentro del FLM es vital para la incorporación posterior, posiblemente mediante la fasciculación, de axones reticuloespinales de los grupos rostral y

bulbar del rombecéfalo, apoyando la idea de múltiples sistemas de control para el correcto establecimiento de las rutas de proyección axonal embrionaria. Así, varias moléculas podrían intervenir en la proyección inicial del NIC, la semaforina 3A ejercería un efecto de rechazo forzando la proyección inicial en sentido descendente, mientras que las moléculas de Shh y netrina estarían atrayendo la proyección hacia la placa del piso y las moléculas Slit provocarían un estrechamiento de la proyección a nivel del istmo, organizando la proyección axonal en este nivel (Molle et al., 2004).

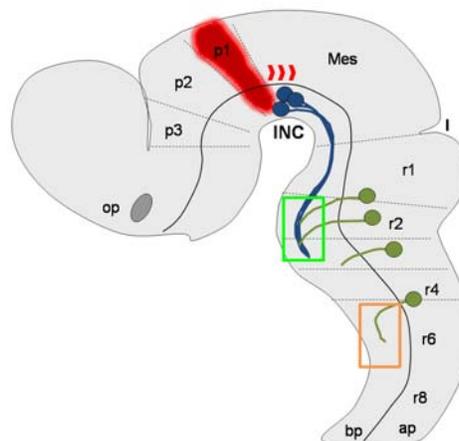


Figure 7. Representación esquemática del posible papel del diencéfalo caudal en la proyección del NIC. La zona de la prosómera 1 ejerce una señal de rechazo, posiblemente a través de la semaforina 3A (rojo), que provoca la proyección inicial en sentido descendente. La proyección así iniciada, contribuiría a su vez, a la proyección de las neuronas reticuloespinales rombencefálicas de los grupos rostral y bulbar, las cuales fascicularían con la proyección inicial presente en el FLM (recuadro en verde). Los grupos caudales de neuronas rombencefálicas al parecer utilizan un sistema distinto, ya que no presentan alteraciones ante la falta de proyección del NIC (recuadro en naranja).

Estos resultados sugieren la posible existencia de señales difusibles con propiedades quimiotrópicas no permisivas o quimiorrepelentes emanadas de la región del prosencéfalo caudal sobre los axones pioneros del FLM y que podrían influenciar otras proyecciones longitudinales en el neuroepitelio en desarrollo.

VI REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahsan M, Riley KL, Schubert FR. Molecular mechanisms in the formation of the medial longitudinal fascicle. *J Anat.* 2007 Aug; 211 (2): 177-87.
- Aitken A. y Tork I. (1988) Early development of serotonin-containing neurons and pathways as seen in wholemound preparations of the fetal rat brain. *J. Comp. Neurol.* 274: 32-47.
- Auclair F., Marchand R. y Glover J. (1999) Regional patterning of reticulospinal and vestibulospinal neurons in the hindbrain of mouse and rat embryos. *J. Comp. Neurol.* 411: 288-300.
- Augsburger A., Schuchardt A., Hoskins S., Dodd J. y Butler S. (1999) BMPs as mediator of roof plate repulsion of commissural neurons. *Neuron.* 24, 127-141.
- Bélangier M., Auclair F., Bertrand L. y Marchand R. (1997) The early neuronal organization predicts the path followed by some major axonal bundles in the embryonic brainstem. *Neuroscience.* 78: 259-270.
- Brose K. y Tessier-Lavigne M. (2000) Slit protein: key regulators of axon guidance, axonal branching and cell migration. *Curr. Opin. Neurobiol.* 10: 95-102.
- Chan S., Zheng H., Su M. Wilk R. Killen M. Hedgecock E. y Culotti J. (1996) UNC-40, a *C. elegans* homolog of DCC (Deleted in Colorectal Cancer), is required in motile cells responding to UNC-6 netrin cues. *Cell.* 87: 187-195.
- Clarke J. y Lumsden A. (1993) Segmental repetition of neuronal phenotype sets in the chick embryo hindbrain. *Development.* 118: 151-162.
- Colamarino S. y Tessier-Lavigne M. (1995) The axonal chemoattractant netrin-1 is also a chemorepellent for trochlear motor axons. *Cell.* 81: 621-629.
- Dalström A. y Fuxe K. (1964) Evidence for the existence of monoamine-containing neurons in the CNS. I. Demonstration of monoamines in the cell bodies of brainstem neurons. *Acta Physiol. Scand.* 62: 1-55.
- Daston M. y Koester S. (1996) Transcriptional regulation of axon pathfinding. *Neuron.* 17: 5-8.

Easter S. y Frankfurter A. (1993) Initial tract formation in the mouse brain. *J. Neurosci.* 13: 285-299.

Glover J. (1993) The development of brain stem projections to the spinal cord in the chicken embryo. *Brain Res. Bull.* 30: 265-271.

Glover J. y Petursdottir G. (1988) Pathways specificity of reticuloespinal and vestibulospinal projections in the 11-day chicken embryo. *J. Comp. Neurol.* 270: 25-38.

Glover J. y Petursdottir G. (1991) Regional specificity of developing reticulospinal, vestibulospinal, and vestibulo-ocular projections in the chicken embryo. *J. Neurobiol.* 22: 353-376.

Hamburger V. y Hamilton H. (1951) A series of normal stages in the development of chick embryo. *J. Comp. Neurol.* 88: 49-87.

Henke-Fahle S, Beck KW, Püschel AW. Differential responsiveness to the chemorepellent Semaphorin 3A distinguishes Ipsi- and contralaterally projecting axons in the chick midbrain. *Dev Biol.* 2001 Sep 15; 237 (2): 381-97.

Hibbard E. (1965) Orientation and directed growth of Mauthner's cell axons from duplicated vestibular nerve roots. *J. Exp. Neurol.* 13: 289-301.

Kanki J. y Kuwada J. (2000) Growth cones utilize both widespread and local directional cues in the zebrafish brain. *Dev. Biol.* 219: 364-372.

Kaprielain Z., Imondi R. y Runko E. (2000) Axon guidance at the midline of the developing CNS. *The Anatomical Record.* 261: 176-197.

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

Kidd T., Bland S. y Goodman C.S. (1998) Slit is the midline repellent for the robo receptor in *Drosophila*. *Cell.* 96: 785-794.

Kolodkin, A. L. (1996) Growth cones and the cues that repel them. *Trends Neurosci.* 19, 5007-513.

Kury P., Gale N., Connor R., Pasquale E. y Guthrie S. (2000) Eph receptors and ephrin expression in cranial motor neurons and the branchial arches of the chick embryo. *Mol. Cell. Neurosci.* 15: 123-140.

Martínez S., Crossley P., Cobos I., Rubenstein J. y Martin G. (1999) FGF8 induces formation of an ectopic isthmic organizer and isthmo-cerebellar development via a repressive effect on Otx2 expression. *Development*.* 126: 1189-1200.

Molle KD, Chédotal A, Rao Y, Lumsden A, Wizenmann A. Local inhibition guides the trajectory of early longitudinal tracts in the developing chick brain. *Mech Dev*. 2004 Feb; 121 (2): 143-56.

Mueller B. (1999) Growth cone guidance: first steps towards a deeper understanding. *Annu. Rev. Neurosci.* 22: 351-388.

Parent A. (1996) *Carpenter's Human Anatomy*. Williams & Wilkins, Philadelphia.

Rajagolapan S., Nicolas E., Vivancos V., Berger J. y Dickson B. (2000) Crossing the midline: roles and regulation of robo receptors. *Neuron*. 28: 767-777.

Ren X., Kim S., Fox E. y Hedgecock E. (1999). Role of netrin UNC-6 in patterning the longitudinal nerves of *Caenorhabditis elegans*. *J. Neurobiol.* 39: 107-118.

Rothberg J., Jacobs J., Goodman C. y Artavanis-Tsakonas S. (1990) Slit: an extracellular protein necessary for development of midline glia and commissural axon pathways contains both EGF and LRR domains. *Genes Dev*. 4: 2169-2187.

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

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

Shimada S., Takatsuji K. y Wanaka A. (1998) The catecholaminergic system. Noradrenergic-adrenergic systems, En: Tohyama, M., Takatsuji K. (Eds), *Atlas of the Neuroactive Substances and Their Receptors in the Rat*. Oxford University Press, New York, pp: 32-35.

Tsuchida T., Ensini M., Morton S., Baldassare M., Edlund T., Jessell T. y Pfaff S. (1994) Topographic organization of embryonic motor neurons defined by expression of LIM homeobox genes. *Cell*. 79: 957-970.

Van Vactor D. y Flanagan J. (1999) The middle and the end: slit brings guidance and branching together in axon pathway selection. *Neuron*. 22: 649-652.

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

Wang K., Brose K., Arnott D., Kidd T, Good C., Henzel W. y Tessier-Lavigne M.(1999). Biochemical purification of a mammalian slit protein as a positive regulator of sensory axon elongation and branching. *Cell*. 96: 771-784.

Wolman MA, Liu Y, Tawarayama H, Shoji W, Halloran MC. Repulsion and attraction of axons by semaphorin3D are mediated by different neuropilins in vivo. *J Neurosci*. 2004 Sep 29; 24 (39): 8428-35.

VII ANEXOS