



**Universidad de Concepción**  
**Dirección de Postgrado Facultad de Ciencias Biológicas -**  
**Programa de Doctorado en Ciencias Biológicas Área**  
**Biología Celular y Molecular**



**“Estudio de la formación de la comisura posterior durante el desarrollo embrionario en *Gallus gallus*”**

**Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas Área Biología Celular y Molecular**  
**Bq. Karen Nadiza Stanic Aguilera**  
**CONCEPCIÓN-CHILE**  
**2016**

**Profesor Guía: Dra. Teresa Caprile Elola-Olaso.**  
**Dpto. Biología Celular, Facultad de Ciencias Biológicas**  
**Universidad de Concepción**

**Esta tesis fue desarrollada en el departamento de Biología Celular de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción.**

**Profesores integrantes de la comisión evaluadora:**

---

**Dra. Teresa Caprile Elola-Olaso**  
**Profesor Guía**  
**Facultad de Ciencias Biológicas**

---

**Dr. Juan Pablo Henríquez H.**  
**Facultad de Ciencias Biológicas**



---

**Dr. Marcela Torrejón Quezada**  
**Facultad de Ciencias Biológicas**

---

**Dr. Federico Bátiz**  
**Profesor Evaluador Externo**  
**Universidad Austral de Chile**

---

**Dr. Juan Pablo Henríquez H.**  
**Director Programa de Doctorado en Ciencias Biológicas**  
**Área Biología Celular y Molecular**

## ABREVIATURAS

<b>ABB</b>	Alar-Basal Boundry	<b>Epth</b>	Epíflsis (Gl. pineal)	<b>PTD</b>	Placa del Techo diencefálico
<b>BMP</b>	Bone Morphogenic Protein	<b>Hb</b>	Habénula	<b>PTDL</b>	Placa del Techo Diencefálico Lateral
<b>CAMs</b>	Cell Adhesion Molecules	<b>hypoth</b>	Hipotálamo	<b>PTDM</b>	Placa del Techo Diencefálico Medial
<b>CoD1</b>	Commissural Domain 1 (dominio comisural 1)	<b>JcP</b>	Juxtacommissural preteetum (preteetum juxtacomisural)	<b>Shh</b>	Sonic Hedgehog
<b>CoD2</b>	Commissural Domain 2 (dominio comisural 2)	<b>LM</b>	Línea media	<b>SN</b>	Sistema Nervioso
<b>CoL1</b>	Lateral Commissural domain 1 (dominio lateral comisural1)	<b>LCR</b>	Líquido cefalorraquídeo	<b>SNC</b>	Sistema Nervioso Central
<b>CoL2</b>	Lateral Commissural domain 2 (dominio lateral comisural 2)	<b>MEC</b>	Matriz Extracelular	<b>TAG</b>	trascient axonal glycoprotein-1
<b>CoP</b>	Commissural preteetum (preteetum comisural)	<b>mes (M)</b>	Mesencéfalo	<b>tel (T)</b>	Telencéfalo
<b>CoV</b>	Ventral Commissural domain (dominio ventral comisural)	<b>OSC</b>	Órgano Subcomisural	<b>TSR</b>	Thrombospondin type 1 repeats
<b>cp</b>	Comisura posterior	<b>p1, p2 y p3</b>	Prosómero 1, 2 y 3	<b>Wnt</b>	wingless- related mouse mammary tumor virus integration site
<b>Comm</b>	Commissureless	<b>PA</b>	Placa Alar	<b>WT</b>	Wild Type
<b>CSPGs</b>	Proteoglicanos de condroitinsulfato	<b>PB</b>	Placa Basal	<b>ZM</b>	Zona Marginal
<b>CRG</b>	Células Retinales Ganglionares	<b>PS</b>	Placa del Suelo	<b>ZV</b>	Zona Ventricular
<b>Di (D)</b>	Diencefalo	<b>PSL</b>	Placa del Suelo Lateral	<b>IIIV</b>	Tercer Ventrículo
<b>DRG</b>	Dorsal Root Ganglion cells	<b>PSM</b>	Placa del suelo Medial		
<b>Eph</b>	Erythropoietin- producing hepatocellular	<b>PT</b>	Placa del Techo		

## TABLA DE CONTENIDOS

- **Abreviaturas** (Pág. i)
- **Tabla de contenidos** (Pág. ii-vii)
  - **Lista de figuras** (Pág. v-vi)
  - **Lista de tablas** (Pág. vi-vii)
- **Resumen** (Pág. viii-ix)
- **Summary** (Pág. x-xi)
- **Introducción** (Pág. 1-33)
  - ✓ *Guía y navegación axonal: procesos centrales durante el desarrollo embrionario del SN* (**Pág. 2**)
    - Cono axónico o de crecimiento (**Pág. 2**)
    - Mecanismos de guía axonal (**Pág. 4**)
  - ✓ *Línea media del SNC, un punto de decisión durante la navegación axonal* (**Pág. 9**)
  - ✓ *Comisura posterior y placa del techo diencefálica* (**Pág. 13**)
  - ✓ *OSC-espondina y desarrollo de la comisura posterior* (**Pág. 15**)
  - ✓ *Moléculas de guía axonal expresadas en el prosómero 1* (**Pág. 20**)  
*Receptor EphA7* (**Pág. 20**)
  - ✓ *Proteínas de la matriz extracelular y su rol en la guía de axones en navegación* (**Pág. 25**)
    - Proteínas matricelulares* (**Pág. 27**)
      - *Tenascina* (**Pág. 29**)
      - *Osteopontina* (**Pág. 30**)
    - Proteoglicanos de Condroitinsulfato* (**Pág. 31**)
    - Proteínas clásicas de matriz* (**Pág. 32**)
      - *Laminina y Fibronectina* (**Pág. 32**)
- **Hipótesis** (Pág. 34)
- **Objetivos** (Pág. 34)
  - Objetivo General
  - Objetivos Específicos
    - ✓ Objetivo 1: Analizar la expresión de moléculas de matriz extracelular y moléculas pertenecientes a la familia de las Eph/efrinas durante la formación de la comisura posterior.
    - ✓ Objetivo 2: Estudiar la funcionalidad *in vitro* e *in vivo* de EphA7.
- **Materiales y métodos** (Pág. 35-54)
  - **Materiales: (Pág. 35-37)**
    - ✓ Anticuerpos y marcadores fluorescentes (**Pág. 35-36**)
    - ✓ Morfolinos (**Pág. 37**)
    - ✓ Partidores (**Pág. 37**)
    - ✓ Plásmidos (**Pág. 37**)
    - ✓ Concentraciones ribosondas (**Pág. 37**)
  - **Métodos: (Pág. 38-54)**

1. Modelo animal de investigación **(Pág. 38)**
  2. Manejo de muestras mediante técnicas histológicas **(Pág. 38)**
    - 2.1. Procesamiento histológico para inmunohistoquímica en corte **(Pág. 38)**
    - 2.2. Procesamiento histológico para hibridación *in situ* **(Pág. 38)**
      - 2.2.1. Procesamiento histológico para hibridación *in situ* en corte **(Pág. 39)**
      - 2.2.2. Procesamiento histológico para hibridación *in situ* en bloque **(Pág. 39)**
  3. Detección de expresión génica **(Pág. 39)**
    - 3.1. RT-PCR **(Pág. 39)**
    - 3.2. Obtención de producto de PCR **(Pág. 40)**
  4. Inmunohistoquímica **(Pág. 41)**
    - 4.1. Inmunofluorescencia e inmunoperoxidasa en cortes **(Pág. 41)**
    - 4.2. Inmunohistoquímica en bloque **(Pág.42)**
  5. Inmunocitoquímica **(Pág. 43)**
    - 5.1 Cultivo primario de neuronas o explantes de núcleos pretectales**(Pág. 43)**
    - 5.2 Inmunocitoquímica de cultivos **(Pág. 44)**
  6. Hibridación *in situ* **(Pág. 44)**
    - 6.1. Construcción de plásmido TOPO-EphA7 **(Pág. 44)**
    - 6.2. Análisis del plásmido TOPO-EphA7 y síntesis de la ribosonda **(Pág. 45)**
    - 6.3. Hibridación *in situ* en corte **(Pág. 47)**
    - 6.4. Hibridación *in situ* en bloque **(Pág. 48)**
  7. Inhibición de EphA7 mediante inyección al tubo neural de morfolidos **(Pág. 50)**
  8. Análisis *in vitro* del efecto de EphA7 sobre los axones de la región pretectal: ensayos de preferencia **(Pág. 50)**
  9. Análisis de datos **(Pág. 52)**
    - 9.1 Análisis de Inmunohistoquímica **(Pág. 52)**
    - 9.2 Análisis estadístico de experimentos de preferencia de sustratos **(Pág. 53)**
- **Resultados** (Pág. 55-103)
    1. Expresión de moléculas de matriz extracelular en el prosómero 1 en estadios tempranos de desarrollo**(Pág. 55)**
      - 1.1. Expresión de proteínas matricelulares: tenascina y osteopontina **(Pág. 55)**
        - 1.1.1. Análisis de expresión de tenascina **(Pág. 55)**
        - 1.1.2. Análisis de la expresión de osteopontina **(Pág. 56)**
      - 1.2. Proteínas clásicas de matriz extracelular **(Pág. 61)**
        - 1.2.1. Análisis de expresión de laminina **(Pág. 61)**
        - 1.2.2. Análisis de expresión de fibronectina **(Pág.61)**
      - 1.3. Expresión de epítipo específico HNK-1 y CSPGs **(Pág. 61)**
        - 1.3.1. Análisis de expresión para HNK-1. **(Pág. 61)**

- 1.3.2. Patrón de expresión de CSPGs. **(Pág. 62)**
- 1.4. Moléculas presentes en la membrana limitante externa. **(Pág. 66)**
- 1.5. Expresión de proteínas de matriz extracelular en p1 en estadio HH24. **(Pág. 66)**
- 1.6. Posibles receptores presentes en los axones. **(Pág. 66)**
2. Caracterización del patrón de expresión génica y proteica de EphA7 en estadios tempranos de desarrollo embrionario. **(Pág. 70)**
  - 2.1. Análisis de la expresión génica de EphA7 en la placa del techo diencefálica **(Pág. 70)**
    - 2.1.1. RT-PCR para EphA7 **(Pág. 70)**
    - 2.1.2. Estudio mediante hibridación *in situ* de la expresión de mensajero para EphA7 en cortes y en embriones completos **(Pág. 70)**
      - 2.1.2.1. Clonamiento del producto de PCR de EphA7 en vector TOPO **(Pág. 70)**
      - 2.1.2.2. Hibridación *in situ* para EphA7 en embriones completos de pollo **(Pág. 71)**
        - Expresión de EphA7 en embrión en estadio HH18 **(Pág. 71)**
        - Expresión de EphA7 en cerebro de embriones en estadio HH30 **(Pág. 72)**
      - 2.1.2.3. Expresión de EphA7 en cortes de diencéfalo **(Pág. 73)**
    - 2.2. Expresión proteica de EphA7 durante el desarrollo **(Pág. 78)**
      - 2.2.1. Análisis de la expresión de EphA7 en embriones completos en estadio HH18 **(Pág. 78)**
      - 2.2.2. Análisis de la expresión de EphA7 y OSC-espondina en cerebro completo en estadios HH25-HH29 **(Pág. 78)**
      - 2.2.3. Análisis de la expresión de EphA7 y OSC-espondina en cortes de PTD durante el desarrollo de la comisura posterior **(Pág. 79)**
      - 2.2.4. Estudio de la expresión de EphA7 en las regiones laterales del CoP y su relación con los axones de la comisura posterior **(Pág. 79)**
  3. Estudio de la expresión de los posibles ligandos para EphA7: efrina-A5 y efrina-A2. **(Pág. 85)**
    - 3.1. Expresión de efrina-A5 en el prosómero 1. **(Pág. 85)**
      - 3.1.1. Presencia de efrina-A5 en la región comisural pretectal (CoP) del prosómero 1. **(Pág. 85)**
      - 3.1.2. Identificación de efrina-A5 en cortes frontales de CoP y axones provenientes de núcleos pretectales. **(Pág. 85)**
    - 3.2. Determinación de la presencia de efrina-A2 en la región pretectal comisural (CoP). **(Pág. 86)**
      - 3.2.1. Detección de ARN mensajero para efrina-A2. **(Pág. 86)**
      - 3.2.2. Expresión de efrina-A2 en encéfalo de embriones durante distintos estadios de desarrollo. **(Pág. 86)**
  4. Ensayos de funcionalidad de EphA7. **(Pág. 92)**
    - 4.1. Efecto *in vitro* de EphA7 mediante ensayos de bandas. **(Pág. 92)**
    - 4.2. Estudios *in vivo*: Inhibición mediante la inyección de morfolino contra EphA7. **(Pág. 93)**

- **Discusión** (Pág. 104-118)
  - ✓ Miembros de la familia de las Eph/efrinas expresadas durante el desarrollo de la cp. **(Pág. 105)**
  - ✓ Moléculas de matriz extracelular en el P1. **(Pág. 112)**
  - ✓ Guía de los axones en la placa del techo diencefálica. **(Pág. 117)**
  
- **Conclusiones** (Pág. 119)
- **Agradecimientos** (Pág. 120)
- **Bibliografía** (Pág. 121-136)
- **Lista de figuras**
  - *Figura 1: Esquema de la distribución del citoesqueleto en las neuronas durante el desarrollo. (Pág. 3)*
  - *Figura 2: Esquema de los distintos mecanismos que guían al cono axónico. (Pág. 8)*
  - *Figura 3: Esquema del cruce de axones comisurales a través de la línea media en la médula espinal de vertebrados. (Pág. 12)*
  - *Figura 4: Esquema de la clasificación neuroanatómica del cerebro embrionario y de los dominios de la región comisural pretectal. (Pág. 16)*
  - *Figura 5: Cortes frontales de PTD de embriones de Gallus gallus en estadio HH32. (Pág. 19)*
  - *Figura 6: Estructura de receptores Eph y efrinas-A y B, mecanismos de señalización bidireccional y sus distintos efectos. (Pág. 21)*
  - *Figura 7: Esquema de algunos de los factores reguladores del crecimiento neurítico y de las interacciones entre distintas moléculas de superficie y moléculas de MEC. (Pág. 28)*
  - *Figura 8: Expresión de tenascina en CoP en embriones de estadio HH29 mediante microscopía confocal. (Pág. 57-58)*
  - *Figura 9: Patrón de expresión de osteopontina en CoP mediante microscopía confocal en estadio HH29. (Pág. 59-60)*
  - *Figura 10: Análisis de la expresión de laminina en CoP mediante microscopía confocal en embrión HH29. (Pág. 63)*
  - *Figura 11: Análisis de la expresión de fibronectina en CoP en embrión HH29. (Pág. 64)*
  - *Figura 12: Patrón de expresión del epítipo HNK-1 y CSPGs en corte frontal de CoP de embrión en estadio HH29 mediante microscopía confocal. (Pág. 65)*
  - *Figura 13: Expresión de perlecan y decorina en secciones frontales de CoP marcadas con OSC-espondina en estadio HH29. (Pág. 67)*
  - *Figura 14: Análisis de la expresión de laminina, tenascina, HNK-1, osteopontina y fibronectina en cortes frontales de CoP en estadio HH24. (Pág. 68)*
  - *Figura 15: Axones provenientes de neuronas de núcleos pretectales presentan distintos posibles receptores para moléculas de matriz extracelular. (Pág. 69)*

- *Figura 16: PCR para EphA7 en muestras tomadas de la PTD durante distintos estadios de desarrollo y análisis de plásmido TOPO-EphA7. (Pág. 74)*
  - *Figura 17: Expresión de EphA7 en la placa del techo diencefálica-mesencefálica. (Pág. 75)*
  - *Figura 18: Expresión de EphA7 en la línea media telencefálica y diencefálica-mesencefálica en embriones de 7 días (HH30). (Pág. 76)*
  - *Figura 19: Expresión de EphA7 en cortes frontales de prosómero 1 en embriones de 5 días (HH27) y comparación con el patrón de expresión OSC-espondina en el mismo estadio. (Pág. 77)*
  - *Figura 20: Inmunohistoquímica en bloque para tubulina  $\beta$ III y EphA7 en embriones estadio HH18. (Pág. 81)*
  - *Figura 21: Patrón de expresión proteica de EphA7 y OSC-espondina en estadios tempranos de desarrollo. (Pág. 82)*
  - *Figura 22: Expresión de EphA7 y OSC-espondina en corte frontal de CoP en estadio HH30. (Pág. 83)*
  - *Figura 23: Formación de corredores axonales delimitados por EphA7. (Pág. 84)*
  - *Figura 24: Análisis de la expresión de efrina-A5 en el diencefalo caudal. (Pág. 88)*
  - *Figura 25: Expresión de efrina-A5 en axones provenientes de núcleos pretectales. (Pág. 89)*
  - *Figura 26: Expresión de efrina-A2 en el encéfalo durante distintos estadios de desarrollo. (Pág. 90-91)*
  - *Figura 27: Estudio del efecto mecánico de microesferas sobre axones provenientes de núcleos pretectales en presencia de EphA7 bajo distintas situaciones experimentales. (Pág. 96)*
  - *Figura 28: Inhibición in vivo con morfolino contra EphA7 y posterior análisis en estadio HH27: reducción y desplazamiento anormal de los tractos axonales. (Pág. 97-98)*
  - *Figura 29: Inhibición de EphA7 induce un alto grado de malformación cefálica en los embriones. (Pág. 99)*
  - *Figura 30: Inhibición in vivo de EphA7 con morfolino y posterior análisis en estadio HH31: pérdida de la simetría bilateral y de la trayectoria axonal. (Pág. 100-101)*
  - *Figura 31: Esquema resumen mostrando patrones de expresión de las distintas moléculas en el parénquima y en los axones que forman la cp entre el día 5 y 6 de desarrollo. (Pág. 103)*
- **Lista de tablas**
    - **Tabla 1:** Tabla descriptiva de los anticuerpos primarios, secundarios y otros marcadores utilizados en este trabajo, características generales, diluciones y procedencia. (Pág. 35-36)

- **Tabla 2:** Descripción de los morfolinós usados y su secuencia correspondiente. **(Pág. 37)**
- **Tabla 3:** Secuencia de los partidores utilizados para la amplificación de los distintos transcritos a identificar, su temperatura de annealing experimental y el tamaño del producto de PCR esperado en pares de bases (pb). **(Pág. 37)**
- **Tabla 4:** Distintas combinaciones de sustratos utilizadas para los experimentos de preferencia en presencia o ausencia de microesferas fluorescentes (fluorescencia dada por anticuerpo-anti-hFc acoplado a Cy3). **(Pág. 54)**



## RESUMEN

El correcto ensamblaje de los circuitos neuronales formados durante el desarrollo embrionario depende intrínsecamente de la fina regulación en la expresión de diversas moléculas implicadas en la guía de los axones hacia su contraparte sináptica. En organismos con simetría bilateral es necesario que exista un intercambio de información entre ambos lados del sistema nervioso central (SNC), para ello los axones deben ser capaces de atravesar la línea media, formando estructuras bien definidas denominadas comisuras.

Durante este trabajo de tesis doctoral nos enfocamos en el estudio de moléculas involucradas en la guía de los axones de la comisura posterior, una estructura altamente conservada en vertebrados y que posee funciones accesorias sobre el sistema ocular. La comisura posterior se encuentra en el límite dorsal entre el diencéfalo y mesencéfalo en una región denominada pretectum comisural del prosómero 1, en donde se ha descrito la presencia de transcritos que codifican para proteínas de guía axonal durante el desarrollo comisural temprano. Una de estas moléculas es EphA7, una proteína transmembrana de la familia de receptores tipo tirosín quinasa relacionada principalmente con la formación del eje retino-tectal. En este trabajo nos dedicamos a estudiar el patrón de expresión génico y proteico de EphA7 en el prosómero 1 durante distintos estadios de desarrollo, en relación a la formación de la comisura posterior, así como también su función *in vitro* e *in vivo* sobre los axones provenientes de los núcleos pretectales que se proyectan por el pretectum comisural para formar esta estructura. Además, se quiso estudiar la presencia de sus posibles ligandos y moléculas de matriz extracelular que podrían jugar un rol conjunto en la formación de la comisura posterior.

Los resultados obtenidos muestran que EphA7 se expresa desde estadios tempranos de desarrollo en dos zonas del prosómero 1: 1) En la región alar, formando dos columnas que delimitan un espacio por el cual los axones

provenientes de los núcleos pretectales se desplazan hacia las zonas dorsales; 2) En la placa del techo diencefálica medial en donde los axones deciden si cruzan o no al lado contralateral. Estos mismos axones expresarían uno de los posibles ligandos propuestos, efrina-A5, y además se desplazarían en un medio rico en moléculas de matriz extracelular a través del eje ventro-dorsal. Más aun, los estudios *in vivo* sugieren que la función de EphA7 no solo estaría ligada a la guía de los axones de esta región, sino que también sería importante en la mantención de la integridad tisular en general.

En conclusión, EphA7 participa en la correcta formación de la comisura posterior y del prosómero 1 en general, manteniendo la organización celular y el eje de simetría bilateral en esta región. Dicha función se ve apoyada por la presencia de varios miembros de la familia de las efrinasA, así como por moléculas de matriz extracelular que presentan un patrón de expresión específico en el prosómero 1 en estadios tempranos del desarrollo.



## SUMMARY

Correct assembly of neuronal circuits during development relays intrinsically on the regulation of a diverse number of molecules involved in the formation of neuronal connections and structures. The exact mechanisms and molecules involved in the formation of several of these structures remains unknown.

The aim of this thesis was to study the molecules that contribute to the guidance of axons towards the posterior commissure, a highly conserved structure among vertebrates and involved in auxiliary visual functions. This structure is located in the prosomere 1 commissural pretectum, at the limit between diencephalon and mesencephalon. Recent studies have shown the presence of transcripts for different guidance cues during early development stages in this area. One of these cues is EphA7, a transmembrane receptor from the tyrosin kinase family, involved in the formation of the retino-tectal axis. This work is focus on the expression pattern of EphA7 at different stages of development along the prosomere 1 and the response of pretectal neurons to EphA7 *in vitro* and *in vivo*. Furthermore, the presence of described ligands for EphA7, as well as extracellular matrix molecules that might exert a combined effect on posterior commissure development was analyzed.

Results show that EphA7 is express since early developmental stages along the prosomere 1 in close contact with the axons arising from the pretectal nuclei. Moreover, EphA7 is forming lateral columns generating a corridor in where the axons navigate towards the diencephalic roof plate. In the roof plate EphA7 is expressed by the midline cells acting as a decision point for the axons that will form the posterior commissure. These same axons express one of the propose ligands, ephrin-A5, and they extend as well in a rich extracellular matrix environment along the ventro-dorsal axis. Furthermore, *in vivo* inhibition assays showed that the effect of this protein is

not only over preectal axons, but also in the parenchymal cells, affecting the destiny of the whole prosomere 1 region.

In conclusion, this study shows that EphA7 is an important regulator during posterior commissure formation and pivotal for maintaining the symmetry and integrity of prosomere 1.



## INTRODUCCIÓN

El sistema nervioso central (SNC) tiene su origen en el ectodermo, el cual durante la etapa de neurulación temprana, recibe señales inductivas desde la notocorda, una estructura cilíndrica formada por células mesodérmicas que se sitúa justo por debajo de éste, y que define la línea media embrionaria (Jacobson y Gordon 1976; Schoenwolf y Smith 1990; Smith y Schoenwolf 1997; Purves, 2005). Las señales emitidas desde la notocorda hacia el ectodermo suprayacente (o neuroectodermo) permite que éste se diferencie en células precursoras nerviosas, aumentando el grosor en la línea media y constituyéndose de esta forma la placa neural. A medida que la neurulación continúa, la placa neural comienza a plegarse, generando una elevación de sus extremos laterales hasta que convergen dorsalmente y se fusionan, dando lugar al tubo neural. El tubo neural es finalmente una estructura cilíndrica hueca rellena de líquido cefalorraquídeo y recubierta por las células neuroepiteliales (Smith y Schoenwolf, 1989; Harland y Gerhart, 1997; Muñoz-Sanjuan y Brivanlou, 2002; Stemple, 2005; Cearns y cols., 2016). A medida que las células neuroepiteliales se diferencian al linaje neuronal, extienden su axón a través de un ambiente química y mecánicamente complejo hasta llegar a su destino final y lograr la formación de conexiones específicas.

La importancia de estudiar como los axones encuentran su contraparte sináptica, no solamente radica en la comprensión de los procesos fisiológicos normales por los cuales muchas estructuras del SN se forman, sino también en el entendimiento de diversas problemáticas tras enfermedades asociadas con aberraciones en procesos de guía y navegación axonal que afectan a miles de personas. Dentro de estas patologías podemos encontrar achiasma, nystagmus congénito, parálisis horizontal congénita, movimientos en espejo congénito, disgénesis del cuerpo calloso y síndromes como el de Kallmann, L1,

Wildervanck, Duane y Marcus Gunn entre otras (Danek y cols., 2006; Schäfer y cols., 2010).

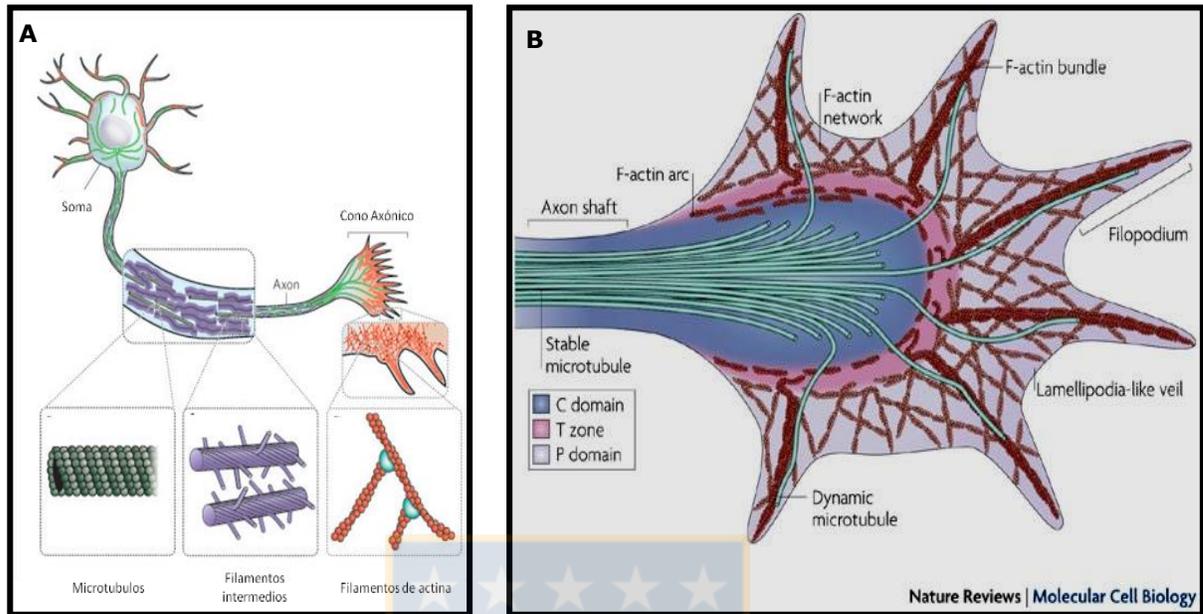
### **Guía y navegación axonal: procesos centrales durante el desarrollo embrionario del SN**

El correcto funcionamiento del SN depende de una compleja red de circuitos neuronales formada durante el desarrollo embrionario, en donde los axones se extienden hasta llegar a su célula blanco para llevar a cabo la formación de uniones intercelulares especializadas. Este proceso se lleva a cabo mediante la interacción entre los receptores de membrana del cono axónico con los presentes en su célula blanco, derivando finalmente en la estabilización y maduración de la sinapsis (Cullheim, 1996; Huber y cols., 2003; Robichaux y Cowan, 2014).

#### ***Cono axónico o de crecimiento***

El cono axónico, presente en el extremo del axón en crecimiento, es una estructura dinámica con la capacidad para detectar e interpretar una gran variedad de señales externas (Mueller y cols., 1999). En respuesta a las distintas señales presentes en el medio, el cono axónico va modificando su citoesqueleto, proceso que incluye tres etapas conocidas como: (1) formación de protrusiones (2) congestión de microtúbulos en la zona proximal y (3) consolidación mediante la compactación del cuello y eje del cono axónico (Dickson, 2002; Lowery y Van Vactor, 2009).

En función de los elementos del citoesqueleto, el cono axónico se divide en tres regiones: (1) Dominio periférico "P", (2) dominio central "C" y (3) dominio de transición "T" (Fig. 1 B). El dominio periférico está conformado por largos paquetes de filamentos de actina (actina-F), los cuales conforman las filopodias. Además, la actina-F forma una red ramificada tipo malla entre las filopodias encargada de separar a estas estructuras, denominada lamelipodia. En esta zona también existen microtúbulos pioneros altamente dinámicos que



**Figura 1:** Esquema de la distribución del citoesqueleto en las neuronas durante el desarrollo. A) Disposición de los distintos elementos del citoesqueleto en una neurona en crecimiento: microtúbulos (verdes), Filamentos intermedios (azul) y filamentos de actina (rojo) (Adaptado de Fletcher y Mullins, 2010). B) Estructura del cono axónico mostrando los tres dominios y sus componentes (Adaptado y modificado de Lowery y Van Vactor, 2009).

exploran esta región junto a los paquetes de actina (Lowery y Van Vactor, 2009). La motilidad y la capacidad de formar protrusiones por parte del cono en crecimiento dependen en gran manera de las propiedades dinámicas de la actina, las cuales son cruciales en los mecanismos exploratorios que controlan al cono axónico. El dominio central "C" está compuesto por paquetes estables de microtúbulos que entran al cono axónico desde el eje interno del axón. Además presenta numerosos organelos, vesículas, paquetes de actina y los recientemente identificados invadosomas, caracterizados por ser focos de f-actina que forman protrusiones basales. Los microtúbulos de este dominio son los encargados de fijar la dirección y el avance del cono en crecimiento (Santiago-Medina y cols., 2015). Por último, el dominio de transición "T", se sitúa en la interfase entre el dominio "P" y el "C" en donde se encuentran estructuras contráctiles de actomiosina, denominados arcos de actina, que yacen perpendicularmente a los paquetes de actina-F formando un anillo semicircunferencial. La dinámica de los componentes del citoesqueleto determina por lo tanto la forma del cono axónico y su movimiento por los distintos trayectos durante el desarrollo (Lowery y Van Vactor, 2009; Dent y cols., 2011).

### ***Mecanismos de guía axonal***

El movimiento de los conos axónicos se produce en respuesta a diversas moléculas, las cuales pueden estar presentes en la matriz extracelular (Ej: netrina y Slit) o bien asociadas a la membrana de células vecinas (Ej: Semafórina, Robo, efrina y sus receptores Eph). Estas moléculas son capaces de unirse a receptores presentes en la membrana del cono axónico activando cascadas de señalización intracelular que serán usadas por la maquinaria de este para producir cambios en el citoesqueleto, regulando la guía de los axones a través de trayectos largos o cortos (Tessier-Lavigne y Goodman, 1996; Dickson B., 2002; Tamariz y Varela-Echavarría, 2015). Las señales que comandan el movimiento de los conos axónicos se clasifican en 6 tipos: (1)

atracción mediada por contacto, (2) quimioatracción, (3) repulsión mediada por contacto, (4) quimiorrepulsión, (5) fasciculación y (6) acción de la matriz extracelular (MEC) (Fig. 2 A) (Goodman, 1996; Tessier-Lavigne y Goodman, 1996).

La atracción o repulsión mediada por contacto se basa en la interacción del cono axónico con moléculas asociadas a la superficie de células vecinas, y la quimioatracción o quimiorrepulsión estaría dada por la detección de gradiente generados por moléculas quimiotrópicas difusibles (Goodman, 1996). En la fasciculación, los axones se asocian con otros axones que previamente hayan realizado el mismo trayecto, facilitando y agilizando su movimiento (Bak y Fraser, 2003). Por último, la acción de la MEC está fundamentada en los diversos patrones de expresión espacio-temporal bien definidos de moléculas características de la MEC que se encuentran estrechamente ligadas a las fibras axonales, generando barreras mecánicas que delimitan zonas para el avance de los axones, así como espacios para arborización y formación de sinapsis (Fig. 2 B) (revisado en Pires-Neto y cols., 1999; Zimmermann y cols., 2008).

Sin embargo, las moléculas de matriz extracelular no solo actúan como sustratos más o menos permisivos, sino que también pueden modificar el efecto de otras moléculas de guía axonal. Un ejemplo de esta interacción se da en el caso de netrina-1, la cual en presencia de laminina-1 modifica su efecto en el cono axónico de atractivo a repulsivo. La matriz extracelular puede también potenciar el efecto de una proteína de guía axonal, como ocurre con Sema 3A que al interaccionar con proteoglicanos de heparán sulfato se produce un aumento en la unión a su receptor neuropilina potenciando el colapso del cono axónico (Höpker y cols., 1999; De Wit y cols., 2005). Interesantemente, evidencias recientes sugieren además que el cono axónico es capaz de remodelar la MEC circundante ya que poseen maquinarias celulares y moleculares similares a la de las células en migración (y a las cancerígenas), en donde estructuras denominadas invadosomas son capaces

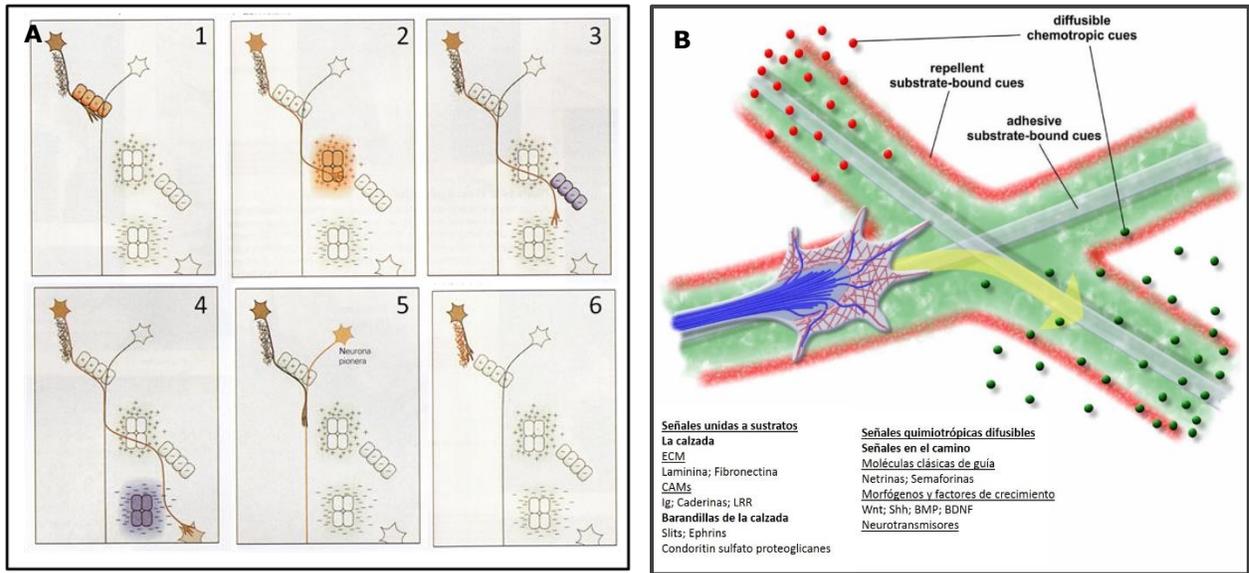
de generar una unión específica con moléculas de MEC y así marcarlas para su degradación, lo que serviría para facilitar la navegación del axón a través de la lámina basal y del tejido por el que debe avanzar en general (Santiago-Medina y cols., 2015; Short y cols., 2016).

El cono axónico posee en su membrana receptores especializados, los cuales interactúan con las moléculas presentes en el medio extracelular promoviendo así su movimiento (Tessier-Lavigne y Goodman, 1996; Vitriol y Zheng, 2012). Respecto a la función de las moléculas implicadas en guía axonal, originalmente se pensó que las moléculas descritas funcionarían siempre de la misma manera; por ejemplo, las netrinas como moléculas exclusivamente atractivas y las efrinas como moléculas repulsivas (Kennedy y cols., 1994; Drescher y cols., 1995; Meima y cols., 1997). Sin embargo, estudios posteriores avalan que los procesos de atracción o repulsión no son una propiedad intrínseca de las moléculas señal, sino de la matriz extracelular en la que el cono de crecimiento está inmerso, de los receptores y co-receptores específicos expresados en el cono axónico y del medio de señalización interna de este, por lo que cada una de estas estructuras tendría una identidad propia que reaccionará de forma específica a los distintos estímulos extracelulares (Lowery y Van Vactor, 2009; Short y cols., 2016).

Existen diversas formas por las cuales una molécula puede ejercer su función sobre el cono axónico, como por ejemplo mediante la iniciación, extensión, retracción o estabilización de una filopodia, o bien mediante la estabilización de los microtúbulos en alguna región específica del cono axónico (Cammarata y Cols., 2016; Kahn y Baas, 2016). Además, la motilidad del cono axónico en respuesta a moléculas de guía axonal también está relacionada con procesos de endocitosis y exocitosis espacialmente controlados, encargados de distribuir la membrana axonal y con ella moléculas funcionales tales como las moléculas de adhesión celular (CAMs) (Diefenbach y cols., 1999; Sann y cols., 2009; Itofusa y Kamiguchi, 2011).

Los mecanismos anteriormente descritos le permiten al axón alcanzar su contraparte sináptica independientemente de lo alejado que esta se encuentre. Sin embargo, la guía del cono axónico a través de trayectos extensos es un fenómeno complejo, ya que el axón no es dirigido desde el inicio hacia su blanco final, sino que divide su trayectoria en una serie de pequeños segmentos, en donde el final de uno y el principio de otro están dados por "puntos de decisión" o "blancos intermedios". Los puntos de decisión o blancos intermedios están compuestos por pequeños grupos de células especializadas y morfológicamente distintas a sus vecinas, que presentan al cono axónico la información necesaria para seguir hacia el próximo trayecto de su viaje (Bovolenta y Dodd, 1990 y 1991; Tessier-Lavigne y Goodman, 1996; Dickson y Zou, 2010).





**Figura 2:** Esquema de los distintos mecanismos que guían al cono axónico. A) 1) atracción mediada por contacto, 2) quimioatracción, 3) repulsión mediada por contacto, 4) quimiorrepulsión, 5) fasciculación, 6) acción de la matriz extracelular (Adaptado de principios de neurociencia, Kandel, Eric. 2008). B) Modelo de como un axón se ve enfrentado a los distintos mecanismos de guía axonal. El cono axónico avanza por una carretera permisiva hecha de moléculas adhesivas presentes en la MEC (Ej: lamina y fibronectina) o en la membrana de células vecinas (CAMs), delimitada por moléculas anti-adherentes unidas a la superficie celular (Ej: Slit, efrinas y CSPGs). Finalmente, los axones deben seguir la señalización en el camino, dado por moléculas quimiotrópicas difusibles (Ej: semaforinas y netrinas), morfógenos (Ej: Shh, Wnt y BMP), factores de crecimiento o neurotróficos (BDNF) y neurotransmisores (Ej: glutamato) (Adaptado y modificado de Lowery y Van Vactor, 2009).

## **Línea media del SNC, un punto de decisión durante la navegación axonal**

En los organismos que poseen simetría bilateral es necesario que exista intercambio de información entre ambos lados del SNC para permitir la correcta integración de la información sensorial y motora. Para que esto suceda, los axones deben ser capaces de atravesar la línea media, formando estructuras bien definidas denominadas comisuras, que se encargarán de coordinar ambos lados, siendo un proceso altamente conservado en invertebrados y vertebrados (Araujo y cols., 2003). La línea media del SNC es un importante punto de decisión para los axones durante el desarrollo, de tal forma que la pérdida de las células de la línea media mediante manipulación experimental como ablación laser o mutaciones genéticas, provoca que el paso de los axones se vea severamente interrumpido (Tear y cols., 1999; Dickson y cols., 2003). Al llegar a la línea media, los axones deben decidir si cruzan o no hacia el lado opuesto. Los axones que cruzan se denominan axones comisurales y los que se proyectan en paralelo a la línea media se denominan axones ipsilaterales. Interesantemente los axones que cruzan a través de la línea media no vuelven a recruzar una vez que empiezan a extenderse longitudinalmente (Tear y Cols., 1999; Kaprielian y cols., 2001; Neuhaus-Follini y Bashaw, 2015).

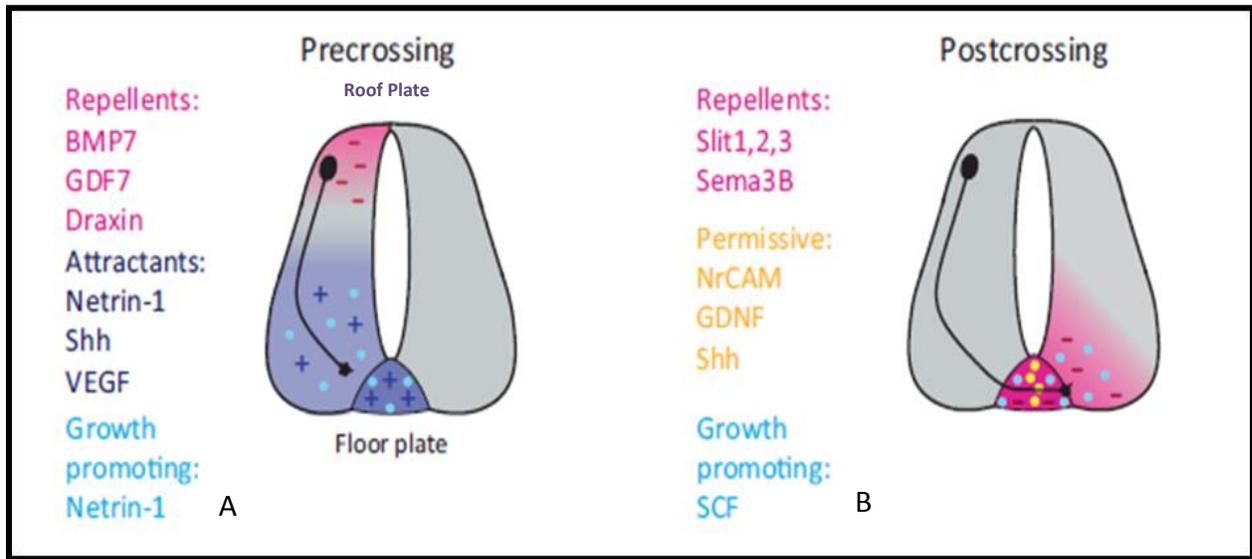
Los principales estudios acerca de las moléculas y mecanismos relacionados con el paso de los axones a través de la línea media, han sido desarrollados en el tubo neural a nivel de la médula espinal, en donde se han descrito una gran variedad de moléculas altamente conservadas tales como netrinas, DCC-Unc5, semaforinas, plexina-neuropilina, slits, Robo, F-spondina, efrinas y su receptor Eph (Matise y cols., 1999, Kaprielian y cols., 2001; Dickson B., 2002; Bovolenta, 2005). Los estudios de guía axonal en la médula espinal han evidenciado la existencia de grupos de células especializadas tanto en la línea media dorsal como ventral (placa del techo y placa del suelo

respectivamente), que participan en la secreción de moléculas de guía axonal (Kennedy y cols., 1994; Murakami y Shirasaki, 1997, Matisse y cols., 1999; Chao y cols., 2009) (Fig. 3). Tanto las células de la placa del techo como las de la placa del suelo tienen morfología de glía radial. Estas células se caracterizan por poseer el cuerpo celular orientado periventricularmente y un largo proceso que se extiende hasta la membrana pial. Estas células fueron identificadas y descritas a partir de los primeros estadios de desarrollo del SNC de vertebrados y clasificadas inicialmente como glía fetal (Golgi C., 1885; Ramón y Cajal 1909; Schmechel & Rakic; 1979a). En los últimos años se ha evidenciado que poseen múltiples funciones durante el desarrollo tales como migración y guía neuronal, así como también un rol fundamental como precursores durante la neurogénesis, gliogénesis y la regionalización del sistema nervioso central (Noctor y cols., 2001; Campbell y Gotz, 2002). En el caso de la placa del suelo de la médula espinal, la localización de diversos marcadores inmunohistoquímicos y moleculares, permite diferenciar dos poblaciones celulares; una ubicada centralmente, denominada placa del suelo medial (PSM) y otra posicionada bilateralmente, denominada placa del suelo lateral (PSL) (Schaffer y cols., 2007). La PSM y PSL presentan diferencias funcionales, ya que secretan distintas moléculas de guía axonal. En *Gallus gallus*, por ejemplo, sonic hedgehog (*Shh*) y netrina-1 se expresan exclusivamente en la parte lateral de la placa del suelo, mientras que Foxa2 tiene una expresión transitoria en la zona medial (Marti y cols., 1995; Charrier y cols., 2002; Schaffer y cols., 2007). En la médula espinal en desarrollo, la placa del techo también es una fuente rica en moléculas de guía axonal, como por ejemplo miembros de la familia BMP (*Bone Morphogenic Protein*) y Wnt (*wingless- related mouse mammary tumor virus integration site*), que estarían participando en el control proliferativo de las interneuronas dorsales, así como también en su migración y guía axonal (Chizhikov y Millen, 2004; 2005).

A pesar de los avances mencionados, los mecanismos exactos por los cuales se genera la reacción axonal de cruzar la línea media y permanecer en

el lado opuesto sigue siendo tema de investigación. Para que esto suceda, se requiere de una señal atrayente en la línea media, la cual debe dejar de ejercer esta atracción una vez que el axón se encuentra en el lado opuesto (Evans y Bashaw, 2010). Por ejemplo, la actividad repulsiva de slit sobre robo, demostrada en estudios llevados a cabo en *Drosophila*, señala que los axones para pasar la línea media deben tener bajos niveles de robo, y posteriormente, para que estos no vuelvan a recruzar se debe activar un mecanismo que permita nuevamente la repulsión, actividad ejercida por *Comm* (commissureless). En vertebrados se ha encontrado evidencia de la presencia de RabGDI, una GTPasa componente de la maquinaria de fusión vesicular, que permite la inserción de robo1 en la membrana del cono axónico regulando la expresión de robo1 en axones precomisurales de forma post-traducciona. La ausencia de RabGDI inhibe el paso de los axones a través de la línea media en la médula espinal de *Gallus gallus*, imitando lo que sucede cuando existe pérdida de función de slit (Philipp y cols., 2012). Estos estudios son un ejemplo de como el axón se encuentra con las señales de forma secuencial y va adaptando su maquinaria celular, y especialmente sus receptores de cono axónico, en función de la ruta que tenga que seguir (Evans y Bashaw, 2010).

Como se mencionó anteriormente, los mecanismos de guía axonal han sido estudiados principalmente en la médula espinal. Sin embargo, la placa del techo se extiende a zonas rostrales del SNC, específicamente hasta la lámina terminalis ubicada en la base del cerebro anterior o prosencéfalo. Distintos estudios indican que la señalización mediada por estas células de la placa del techo es esencial para el desarrollo de la zona rostral del SNC y en particular de la zona dorsal del diencefalo en desarrollo, región en la cual se desarrolla la comisura posterior (cp) (Chizhikov y Millen, 2005).



**Figura 3:** Esquema del cruce de axones comisurales a través de la línea media en la médula espinal de vertebrados. A) los axones comisurales son guiados inicialmente por factores repelentes presentes en la placa del techo (gradiente en rosa) y atraídos por atrayentes expresados en la región ventral o placa del suelo (gradiente en azul) y factores promotores de crecimiento (puntos celestes). B) Una vez que los axones cruzan la línea media se ven expuestos a factores permisivos (puntos amarillos) que los sensibilizan a los factores repelentes presentes en la línea media, que los ayudan en su avance hacia el lado opuesto. (Modificado de Dudanova y Klein., 2013).

### **Comisura posterior y placa del techo diencefálica**

Durante las primeras etapas del desarrollo, la zona rostral del tubo neural comienza a engrosarse generando tres vesículas, el prosencéfalo (que posteriormente se divide en telencéfalo y diencefalo), mesencéfalo y romboencéfalo (que posteriormente se divide en metencéfalo y mielencéfalo). En la región más caudal del diencefalo encontramos el prosómero 1, el cual está dividido en tres territorios: pretéctum pericomisural (PcP), pretéctum yuxtacomisural (JcP) y pretéctum comisural (CoP) siguiendo una orientación rostro-caudal respectivamente y siendo este último al que avocamos nuestro interés (Fig. 4 A). En la región dorso-caudal (pretéctum comisural) del prosómero 1, se encuentra la comisura posterior (cp), un haz redondo de fibras blancas que se extiende desde el receso pineal hasta la zona más caudal del diencefalo dorsal y está en contacto desde estadios tempranos de desarrollo con la placa del techo diencefálica. Hasta el momento, se ha descrito que la cp está compuesta por axones provenientes del núcleo de Darkschewitsch y de los núcleos intersticiales de la comisura posterior (magnocelular y parvocelular). Sin embargo, el área pretectal posee más de 30 núcleos neuronales que también podrían estar aportando a la formación de esta comisura lo cual explicaría la diversidad de los axones presentes en este tracto (Puelles y cols., 1993; Rubenstein y cols., 1994; Ferran y cols., 2009). El CoP ha sido dividido en diferentes zonas relativas a su expresión génica durante el desarrollo, llegando a su organización más compleja en el estadio HH25 (Fig. 4 B). Estas divisiones son de gran importancia al momento de localizar anatómicamente los distintos grupos celulares, patrones de expresión génica, proteica y fascículos axonales.

Aunque la función de la cp no está totalmente establecida, se sabe que sus axones participan en los reflejos pupilares y se conectan bilateralmente con el complejo oculomotor. La cp posee conexiones con los núcleos talámicos pretectales y el grupo talámico posterior, lo que media el reflejo pupilar consensuado (Bhidayasiri y cols., 2000). Además, recientemente ha sido

descrita la presencia de un fascículo frontotemporoccipital tanto en ovejas como en humanos que conectaría con la cp, relacionándolo directamente con su rol descrito en funciones visuales (Ozdemir, 2014).

La cp ha sido descrita desde estadios tempranos de desarrollo en todos los vertebrados, no siendo excepción el humano, en donde su presencia ha sido identificada claramente en embriones de 12 mm, sugiriendo que su desarrollo podría empezar antes de completar el segundo mes de gestación (Frazer, 1931; Keene, 1936).

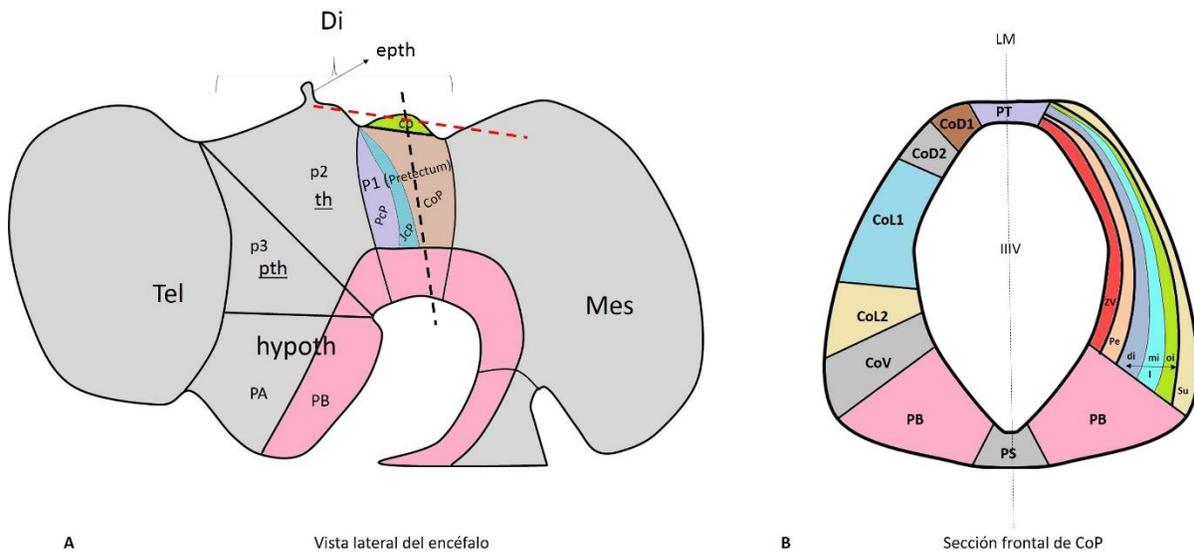
Morfológicamente la placa del techo diencefálica (PTD) del CoP está conformada por células de tipo glía radial, con largos procesos basales que atraviesan los fascículos axonales de la cp y permiten la unión a la membrana limitante externa (Sterba y cols., 1982; Rodríguez y cols., 1992; 1998). Las células de tipo glía radial presentes en esta zona crecen de forma simultánea a la cp, motivo por el cual esta agrupación de células de la placa del techo se ha denominado órgano subcomisural (OSC) (Rodríguez y cols., 1992).

La presencia de este grupo de células tan especializadas en esta región ha llevado a proponer que la PTD estaría involucrada en el desarrollo de la cp, lo cual se basa en el hecho de que mutaciones que afectan el desarrollo de la PTD traen consigo aberraciones en la cp. Este es el caso de animales homocigotos para el gen *Msx1*, los cuales presentan una pérdida de la integridad de la línea media diencefálica, en donde los genes normalmente expresados se ven desregulados, pudiendo evidenciar también grandes anomalías en la comisura posterior y la PTD, además de presentar serias deficiencias durante el desarrollo e hidrocefalia postnatal severa (Bach y cols., 2003; Ramos y cols., 2004). Anormalidades similares han sido también descritas en ratones mutantes que sobreexpresan *engrailed1* en la línea media dorsal del diencefalo, generando muerte celular en la placa del techo incluyendo a las células de los plexos coroideos, glándula pineal y OSC, además de presentar ausencia de cp (Louvi y Wassef, 2000). También se ha logrado observar que en ratones (*Sey/Sey*), que carecen del factor de

transcripción pax6 funcional, ocurre una pérdida del OSC, la cp y glándula pineal; extendiéndose el tectum por sobre esta región (Mastick y cols, 1997; Estivill-Torrús y cols., 2001). Los resultados antes expuestos sugieren la relación y la importancia de las células de la PTD, u órgano subcomisural, en el correcto desarrollo de la cp.

### **OSC-espondina y desarrollo de la comisura posterior**

Desde estadios tempranos de desarrollo, incluso antes de que comience a desarrollarse la cp, la PTD de pollo expresa y comienza a secretar una glicoproteína de alto peso molecular denominada OSC-espondina (Caprile y cols., 2009). Esta glicoproteína de matriz extracelular está conformada por 5146 aminoácidos (Didier y cols., 2007; Meiniel y cols., 2008) y pertenece a la superfamilia de las tromboespondinas, proteínas identificadas en el sistema nervioso central y periférico durante el desarrollo de vertebrados e involucradas en diversos procesos biológicos como guía axonal y migración de las células de la cresta neural (Adams, 2001; Tucker, 2004). Dentro de las proteínas pertenecientes a esta familia podemos incluir a la F-espondina, R-espondina, tromboespondina-1 y 2, UNC-5, semaforina F y G y semaforina-5. Estas proteínas pueden estar formando parte de la matriz extracelular como las tromboespondinas-1 y 2, o como proteínas transmembrana tales como semaforina F y G (Adams y cols., 1996; Tucker y cols., 1999). Las proteínas de esta familia presentes en el SNC tienen un rol importante en el crecimiento axonal, en donde los dominios de repetición de tromboespondina tipo 1 (TSR, Thrombospondin type 1 repeats) serían fundamentales para este propósito (Feinstein y Klar, 2004).



**Figura 4:** Esquema de la clasificación neuroanatómica del cerebro embrionario y de los dominios de la región comisural preteccal. A: visión lateral del cerebro embrionario mostrando las distintas áreas y las subdivisiones diencefálicas. B: Esquema de corte frontal del pretéctum comisural y sus distintos dominios a través del eje dorso-ventral y zonas laterales. En A, Tel: telencéfalo; hypoth: hipotálamo; PA: placa alar; PB: placa basal; Di: diencefalo; p3: pth, pretálamo; p2: th, tálamo; epht: epitálamo o glándula pineal p1: pretéctum; PcP: pretéctum pericomisural; JcP: pretéctum juxtacomisural; CoP: pretéctum comisural; cp: comisura posterior; Mes: mesencéfalo; línea punteada negra: eje de corte frontal; línea punteada roja: eje de corte horizontal. En B, LM: línea media; PT: placa del techo; CoD1: dominio comisural dorsal 1; CoD2: dominio comisural dorsal 2; CoL1: dominio lateral comisural 1; CoL2: dominio lateral comisural 2; CoV: dominio comisural ventral; PB: placa basal; PS: placa del suelo; ZV: zona ventricular; Pe: estrato periventricular; di: capa profunda del estrato intermedio; mi: capa medial del estrato intermedio; oi: capa externa del estrato intermedio; Su: estrato superficial; IIIV: tercer ventrículo. (Modificado de Neuroanatomía de Puelles L., 2008; Ferrán y cols., 2007 y 2009).

La OSC-espondina es una proteína multidominio que posee un arreglo de tipo mosaico, destacando la presencia de dominios altamente conservados dentro del *phylum* de los cordados, donde el gen codificante para OSC-espondina ha sido identificado en urocordados, cefalocordados, así como también en craniatas incluyendo al humano (Gobron y cols., 1999; Meiniel y cols., 2008). Dentro de los dominios presentes en esta proteína en *Gallus gallus* se destacan 27 dominios tipo TSR, 13 dominios del receptor de lipoproteínas de baja densidad tipo A, 1 dominio tipo EMI (dominio rico en cisteínas presentes en proteínas extracelulares), 3 dominios tipo D del factor de Von Willebrand, y 1 dominio tipo nudo de cisteína carboxi-terminal (Didier y cols., 2007).

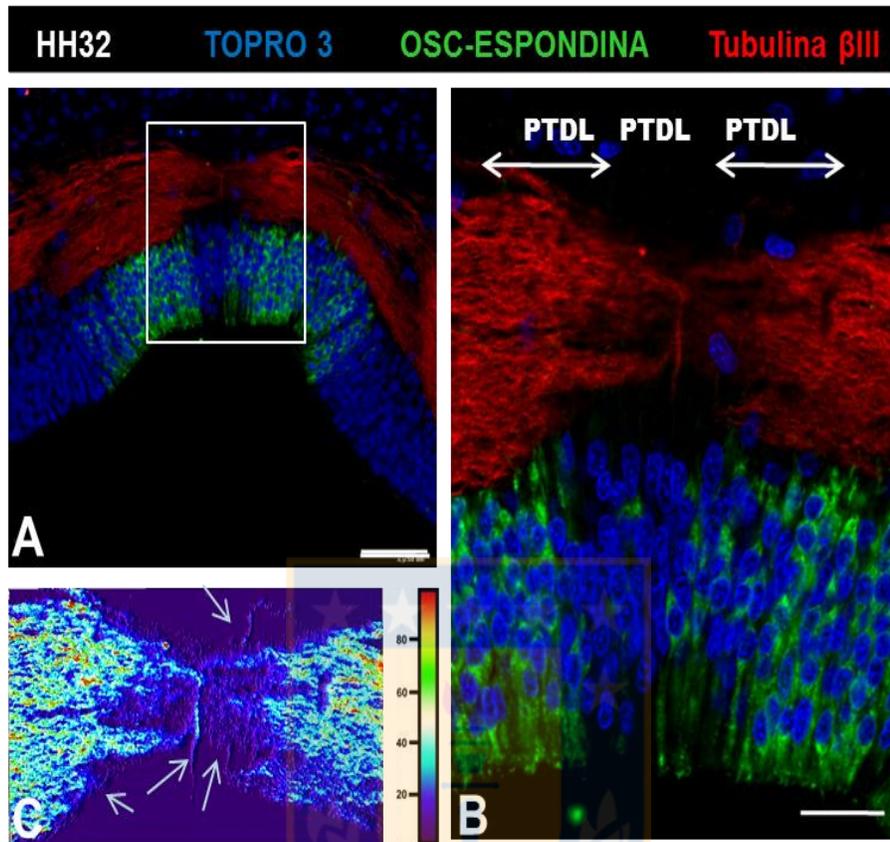
La presencia de numerosos dominios TSR en la OSC-espondina ha llevado a postular que esta proteína podría estar involucrada en procesos de desarrollo del sistema nervioso. Este hecho se ve apoyado por experimentos *in vitro*, en donde péptidos provenientes de los dominios TSR de la OSC-espondina promueven el crecimiento neuronal en células de neuroblastoma, además de una variedad de otros procesos como supervivencia neuronal y fasciculación (Gobron y cols., 2000; Meiniel, 2001; Meiniel y cols., 2003; Caprile y cols., 2009; Hoyo-Becerra y cols., 2010).

El mecanismo por el cual los dominios TSR presentes en los miembros de la familia de las tromboespondinas ejercen su función se desconoce; sin embargo, se ha logrado identificar la interacción de integrinas con dominios TSR de diversos miembros de la superfamilia de las tromboespondinas y se ha demostrado la importancia de esta interacción durante el crecimiento axonal de neuronas retinales (Leu y cols., 2004; Calzada y cols., 2004; Short y cols., 2005). Los miembros de la familia de las integrinas tienen una variada participación en diferentes procesos durante el desarrollo del SN, incluyendo crecimiento axonal, guía axonal y fijación de los procesos basales de las células de glía radial (Clegg y cols., 2000; Milner y Campbell, 2002; Clegg y cols., 2003; Denda y Reichardt, 2007). En el caso de los dominios TSR presentes en

la OSC-espondina se ha demostrado que su capacidad para promover el crecimiento axonal puede ser inhibida *in vitro* mediante el uso de anticuerpos contra integrina  $\beta 1$  (Bamdad y cols., 2004). La interacción integrina  $\beta 1$ -OSC-espondina se ve apoyada por antecedentes publicados por nuestro laboratorio donde se observa la secreción de OSC-espondina hacia la MEC en donde se encuentran los axones de la cp, los cuales expresan integrina  $\beta 1$ . Estos datos apuntan a que OSC-espondina cumpliría un rol fundamental en el desarrollo de la cp a través de su interacción con Integrina  $\beta 1$  (Caprile y cols., 2009). La participación de OSC-espondina se ve además apoyada por experimentos de inhibición *in vivo* mediante shRNA, los cuales conllevan a la ausencia total o disminución de axones de la cp (Vera & Stanic y cols., 2013).

Estos antecedentes confirmarían por lo tanto que OSC-espondina participa en la guía de axones de la comisura posterior. Sin embargo, análisis inmunohistoquímicos muestran que esta proteína se expresa únicamente en la placa del techo diencefálica lateral (PTDL), no siendo detectada en la placa del techo medial (PTDM). El comportamiento de los axones también varía dependiendo de si están sobre la PTDL en donde se encuentran altamente fasciculados (Fig. 5 B), o sobre la PTDM, donde se desfasciulan y algunos giran hacia el lado ipsilateral (Fig. 5 C) (Stanic y cols., 2010). ***Este hecho indica que en la línea media existe un punto de decisión llevado a cabo por moléculas y mecanismos aún desconocidos.***

Otra de las interrogantes respecto a la guía de axones de la cp es como los axones provenientes de la zona ventral ascienden por la placa alar hasta llegar a la placa del techo diencefálica. Observaciones realizadas en el laboratorio muestran como la gran mayoría, sino la totalidad, de los axones suben desde sus núcleos de origen hacia la zona dorsal, pero hasta el momento no ha sido descrito ningún mecanismo que explique este proceso.



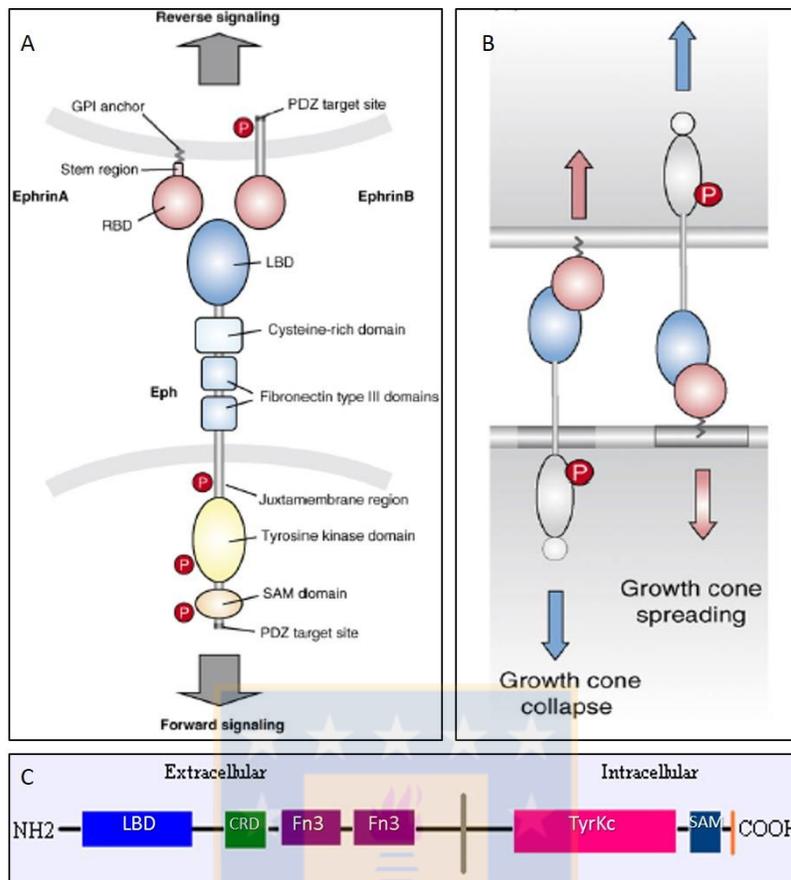
**Figura 5:** Cortes frontales de PTDL de embriones de *Gallus gallus* en estadio HH32. A, Bajo aumento mostrando como los axones avanzan fasciculados en las zonas positivas para OSC-espondina y se defasciculan en la línea media. B, Aumento mayor de la zona de la línea media mostrando como los axones al llegar a la línea media se defasciculan en el lugar donde no hay OSC-espondina. C, Imagen pseudocolor mostrando como los axones de la línea media cambian de dirección (flechas) (Modificado de Stanic y cols., 2010).

## **Moléculas de guía axonal expresadas en el prosómero 1**

### **Receptor EphA7**

A pesar de no existir evidencia concreta de la presencia de otras moléculas de guía axonal distintas a OSC-espondina en la zona de la placa del techo diencefálica, el análisis de hibridaciones *in situ* llevadas a cabo en embriones completos de *Gallus gallus*, sugiere la expresión de transcritos de otras proteínas desde estadios tempranos de desarrollo en la zona del prosómero 1. Uno de estos hallazgos es el caso de EphA7, proteína perteneciente a la familia de los receptores Eph tipo tirosina-quinasa, descritos como proteínas claves en diversos procesos de guía axonal. EphA7 fue identificado en distintos estadios de desarrollo, primeramente en el prosencéfalo, romboencéfalo y placa neural (HH8-11), posteriormente la expresión en estadios más avanzados (HH13-HH14) fue mantenida en romboencéfalo y diencefalo dorsal. Por último, se destaca la aparición en el tectum y pretectum en estadios tardíos (HH35-HH38), conservando aun la marca en la zona diencefálica (Marín y cols., 2001; Baker y Antin, 2003; García-Calero y cols., 2006).

La familia de las Eph (*Erythropoietin-producing hepatocellular*) está formada por proteínas de membrana pertenecientes a la familia de receptores tipo tirosina-quinasa; constituye una de las clases más grandes de este tipo de receptores y se caracteriza por poseer un dominio extracelular compuesto por dos motivos de fibronectina tipo III y un único motivo rico en cisteína (Tuzi y Gullick, 1994). El ligando de este receptor es una proteína de membrana denominada efrina. Hasta la fecha se han descrito por lo menos 8 tipos de efrinas y 14 tipos de receptores Eph, los cuales han sido clasificados en dos clases: (1) efrinas-A, ancladas a la membrana mediante un tallo de glicosilfosfatidilinositol (GPI) y que se unen a receptores tipo EphA y (2) efrinas-B, que poseen un dominio transmembrana y se unen en su mayoría a receptores tipo EphB, a excepción de efrina-B2 que también puede unirse a EphA4 (Dickson B., 2002; Lisabeth y Cols., 2013) (Fig. 6 A).



**Figura 6:** Estructura de receptores Eph y efrinas-A y B, mecanismos de señalización bidireccional y sus distintos efectos. A: Estructura del receptor Eph con sus distintos dominios y esquematización de efrina a y b destacando señalización bidireccional. B: asociación de efrinas A con su receptor Eph y los efectos que produce en cada célula dependiendo que proteína se encuentra en su superficie. C: Esquema de los dominios presentes en EphA7. Región extracelular, LBD: dominio de unión a ligando, CRD: dominio rico en cisteína, FN3: dominio fibronectina tipo III. Región intracelular, TyrKc: Dominio catalítico tirosina-proteín-quinasa de receptores tipo EphA, SAM: dominio de interacción proteína-proteína de la subfamilia tirosina-quinasa de EphA7, PDZ: motivo de unión PDZ. (Modificado de Klein R., 2004 y Egea y Klein., 2007; Mori y cols., 2007, Atlas of Genetic and Cytogenetics in Oncology and Hematology)

Las efrinas son capaces de unirse a la mayoría de los receptores de su tipo. Sin embargo, distintas combinaciones ejercen distintos efectos, además la interacción entre efrina y su receptor es bidireccional por lo tanto activa cascadas de señalización intracelular en ambas células, tanto la que expresa el receptor como la que presenta al ligando (Fig. 6 B). Las efrinas-B/EphB han sido caracterizadas principalmente por su capacidad en mediar la repulsión mediante contacto en una serie de sistemas neuronales, y han sido propuestas como importantes moléculas señal encargadas de la repulsión localizada en la línea media ventral (Kaprielian y cols., 2001; Kadison y cols., 2006; Noraz N., 2016). Esta familia de proteínas además ha sido implicada en otros procesos durante el desarrollo, como por ejemplo gastrulación, segmentación, fasciculación, guía axonal, crecimiento dendrítico y migración de las células de la cresta neural (Henkemeyer, 1994; Gale y cols., 1996; Dickson, 2002; Clifford y Cols., 2014; Cramer y Miko, 2016). A su vez, las efrinas-A/EphA han sido descritas en el mapeo topográfico del eje antero-posterior del tectum mediado por un gradiente de expresión de efrinas-A y sus receptores tipo EphA (Feldheim y cols., 2000, McLaughlin y cols., 2003). De esta forma, las células retino ganglionares (CRG) de la zona nasal que deben ser dirigidas hasta el tectum posterior se definen por la interacción repulsiva generada a través de las efrinas A expresadas en los axones de las CRG nasales y la acción de las células del tectum anterior que expresan EphA (señalización reversa). Esta señalización bidireccional lleva a que las CRG nasales sean guiadas a su destino, el tectum posterior, donde deben hacer sinapsis (McLaughlin y O'leary, 2005; Marler y cols., 2008) (Fig. 6). Cabe mencionar que en muchos de los procesos de guía axonal donde participan efrinas-A/EphA existe un efecto colaborativo con las efrinas-B/EphB como es el caso del mapeo topográfico de los axones retinales hacia el tectum óptico/colículo superior y en la guía de los axones motores hacia los miembros posteriores (Triplet y Feldheim, 2012; Bonanomi y Pfaff, 2010).

Reportes clínicos han descrito ciertas patologías asociadas a deleciones genómicas en el brazo largo del cromosoma 6. En estos pacientes se ha presentado una alta incidencia de retardo mental, características de autismo, anormalidades de las orejas, hipotonía, obesidad y retardo en el crecimiento postnatal (Hopkin y cols., 1997; Derwinska y cols., 2009; Kasher y cols., 2016). Los casos que presentan deleciones 6q han sido divididos en tres grupos (A), (B) y (C), de acuerdo a sus características fenotípicas. Los individuos pertenecientes al grupo B de los que se conoce con certeza 10 casos en el mundo, están caracterizados por poseer deleciones de tipo 6q16.1, las cuales fluctúan entre los 6–34 Mb (Hopkin y cols., 1997; Zherebtsov y cols., 2007; Klein y cols., 2007). Publicaciones recientes demostraron que una deleción 6q16.1 de aproximadamente 2.1 Mb involucraría al gen de EphA7. La comparación entre la clínica de este paciente con otros individuos con deleción 6q16.1 sugieren que la deleción de EphA7 jugaría un rol importante en el déficit del desarrollo neuronal (Taylor y cols., 2009). Respecto a la formación de comisuras en estos individuos, se observa una disminución en el tamaño del cuerpo calloso, comisura encargada de la integración inter-hemisférica de las cortezas sensoriales en mamíferos, y cuya función es suplida por el resto de las comisuras, entre ellas la cp en vertebrados no mamíferos como *Gallus gallus* (Mihreshahi, 2006).

Durante el desarrollo del SNC, EphA7 ha sido involucrado en diferentes procesos relacionados con guía axonal mediante la interacción con diferentes ligandos y también recientemente en la regulación de la proliferación celular (Rashid y cols., 2005; Torii y cols., 2013; Park y cols., 2013). Este receptor tiene la capacidad de interactuar con todas las efrinas-A, sin embargo, en el cerebro no todas son expresadas. Se ha reportado que las efrinas-A expresadas mayoritariamente en esta región corresponden a la efrina-A3 y efrina-A5 seguida en menor cantidad por efrina-A2, presentando afinidad decreciente por EphA7 respectivamente (Gale y Cols., 1996; Zhou y Cols., 1998). Los antecedentes anteriormente expuestos junto con la evidencia

experimental de que EphA7 está presente en la placa del techo diencefálica, nos indica la posibilidad que esta molécula este participando en el desarrollo de la cp.

En relación al efecto que EphA7 podría generar en los axones de la cp, cabe mencionar que la señalización mediada por EphA/efrinas-A se ve regulada por varios factores, por lo que las respuestas pueden variar dependiendo del tipo celular y del medio circundante. En primer lugar, la respuesta al interaccionar ligando y receptor está modulada por la presencia de co-receptores presentes en la membrana del axón, como es el caso de los axones motores durante el desarrollo de las extremidades posteriores en donde se encuentra el co-receptor RET (Rearrange During Transfection) junto a efrina-A en la membrana del axón y al interactuar con EphA genera una respuesta atractiva. En este mismo sistema también se ha visto que GDNF (Glial cell line-Derived Neurotrophic Factor) presente en el medio puede condicionar la respuesta atractiva del axón mediada por el reclutamiento de RET a compartimentos membranosos que poseen efrina-A, dado por la interacción de GDNF con GFR $\alpha$ 1 (GDNF Family receptor alpha1) presente en la membrana axonal (Bonanomi y cols., 2012). Otros casos de co-receptores en la señalización EphA/efrina-A se ha observado en retina, donde la presencia de p75<sup>ntr</sup> (Low-affinity Nerve Growth Factor) o TrkB (Tropomyosin receptor kinase B) junto a efrina-A en los axones genera repulsión (Lim y cols., 2008; Marler y cols., 2008). Segundo, las Eph/efrinas pueden modificar las integrinas o los complejos de adhesión asociados a ellas promoviendo o inhibiendo el crecimiento axonal (Nakamoto y cols., 2004; Sharfe y cols., 2008). Finalmente, se ha develado que no solo los co-receptores modulan la respuesta a la señalización medida por EphA/efrinas-A, sino que también esta depende del medio extracelular. Se ha observado en ensayos *in vitro* que axones provenientes de CRG pueden responder de forma distinta a la presencia de efrina-A5 si esta está acompañada por fibronectina o por laminina, generando repulsión y atracción respectivamente (Weinl y cols.,

2003; Woo y cols., 2009). Esto también ha sido observado en la señalización mediada por efrina-A3, en donde neuronas deficientes de *Ext-1* (deficientes para la síntesis de heparán sulfatos) la señalización de efrina-A3 mediada por EphA se encuentra reducida, presentando deficiencia en el colapso del cono axónico (Irie y cols., 2008). Estos antecedentes indican que el posible rol de Eph/efrina en el desarrollo de la comisura posterior podría estar modulado en parte por la matriz extracelular sobre la que los axones se extienden.

### **Proteínas de la matriz extracelular y su rol en la guía de axones en navegación**

La matriz extracelular (MEC) es un componente tisular acelular constituido por agua, proteínas (principalmente glicoproteínas) y polisacáridos. La MEC se encuentra presente en todos los tejidos y provee tanto un soporte físico para las células, como un medio biomecánico y bioquímico capaz de suministrar distintas moléculas requeridas para procesos como morfogénesis, diferenciación y homeostasis. La MEC del SNC está formada por una mezcla heterogénea de glicoproteínas y proteoglicanos, incluyendo laminina, fibronectina, tenascina, colágeno, osteopontina, heparán y condroitín sulfato. Estas moléculas tienen la capacidad de asociarse unas con otras o entre ellas mismas, generando un soporte para las fuerzas de adhesión y tracción (Rutka y cols., 1988; Barros y cols., 2011). Así mismo, diferentes estudios han demostrado la presencia de una gran variedad de moléculas de MEC durante el desarrollo del SNC con patrones altamente específicos, las cuales han sido descritas como elementos regulatorios en la guía de los axones durante el desarrollo, colaborando y asociándose con las moléculas clásicas de guía axonal o actuando como sustratos (Frantz y Cols., 2010; Myers y cols, 2011; Brown, 2011). Hasta el momento se desconoce qué otras moléculas presentes en la MEC aparte de OSC-espondina se expresan en el CoP y de ser

así, si estas se expresan en la zona de navegación de los axones de la cp y que función estarían ejerciendo en complemento con las moléculas de guía axonal presentes en esa región.

La adhesión célula-MEC es esencial para la formación y mantención de la estructura tisular, concediendo la fuerza mecánica al tejido. El tipo de adhesión varía de tejido a tejido, los casos más conocidos entre unión célula MEC incluyen las adhesiones focales mediadas por dímeros de integrinas que se unen a proteínas de unión como talina y vinculina asociadas a filamentos de actina, complejos asociados a distroglicano (asociados a actina) y hemidesmosomas (asociados a filamentos intermedios) (Gumbiner, 1996; revisado en Pokutta y Weis, 2002). Las asociaciones entre los receptores transmembrana de adhesión celular y la MEC son altamente dinámicas y esenciales para la conducción de señales regulatorias que comandan los distintos procesos en los que están involucrados tales como morfogénesis, división, migración y supervivencia celular.

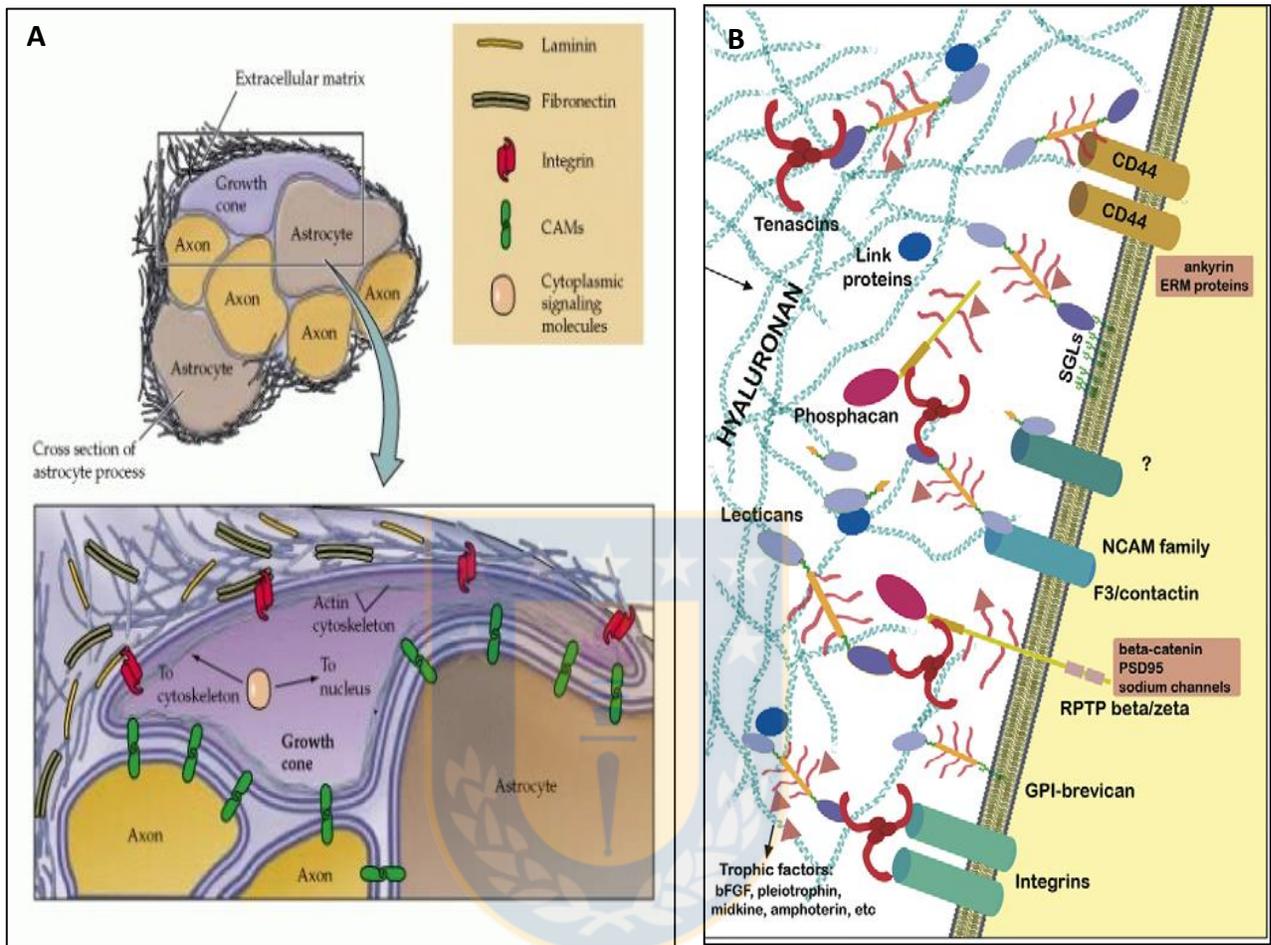
Durante el desarrollo del SNC la interacción con la MEC es crítica para la extensión de los axones pioneros, que utilizan la MEC y las células neuroepiteliales no diferenciadas como sustrato para su elongación y guía.

Existe una gran variedad de estudios que demuestran que distintas moléculas de MEC pueden influenciar de manera positiva o negativa el crecimiento neurítico tanto *in vitro* como *in vivo*. Estas moléculas además de proveer un ambiente propicio para la elongación de los axones pueden también unir proteínas secretadas al medio y funcionar cooperativamente con morfógenos o factores de crecimiento que influyen el crecimiento axonal (Charron y Tessier-Lavigne, 2008; Yam y Charron, 2013). Algunos ejemplos se observan con moléculas como laminina, que es capaz de guiar a axones pioneros positivos para TAG-1 o modular la respuesta del cono axónico hacia moléculas señal como netrina o EphB, proteoglicanos capaces de modificar las trayectorias axonales, colágenos involucrados en la guía de los axones desde la médula espinal a la periferia y efectos repulsivos de tenascina-N sobre

axones hipocampales entre otros (Paulus y cols., 2006; Wolman y cols., 2008; Neidhardt y Cols., 2003; Myers y Cols., 2011; Miller y Hsieh-Wilson; 2015).

### ***Proteínas matricelulares***

El término proteínas “matricelulares” es utilizado para describir a aquellas proteínas modulares y extracelulares con capacidad para interactuar tanto con moléculas presentes en el espacio extracelular, como factores de crecimiento, moléculas de señalamiento o proteínas clásicas de matriz extracelular, como con receptores de superficie celular. Las diversas interacciones ocurren de forma simultánea debido a su conformación modular, por lo que estas proteínas han sido calificadas como importantes reguladores en la interacción célula-MEC y catalogadas como moléculas con roles dinámicos en la comunicación entre las células y el ambiente circundante (Bornstein y cols., 1995). Cabe mencionar que las funciones atribuidas a estas proteínas son extremadamente variadas, participando en procesos como desarrollo embrionario, diferenciación tisular, crecimiento neurítico, guía axonal, regeneración nerviosa, crecimiento tumoral, metástasis y angiogénesis entre otros, principalmente mediante mecanismos como la regulación de disponibilidad de factores de crecimiento, conformación específica de la MEC mediante interacciones específicas con sus componentes e interacción con distintos receptores de superficie celular (Lawler, 2002; Kern y cols., 2005; Lund y cols., 2009; Midwood y Orend, 2009; Eroglu, 2009). Todos estos procesos descritos son dependientes de los distintos contextos tisulares, por lo que estas proteínas son reguladores cruciales de los fenotipos celulares y por tanto de la función específica de cada tejido (Roberts y cols., 2011).



**Figura 7:** Esquema de algunos de los factores reguladores del crecimiento neurítico y de las interacciones entre distintas moléculas de superficie y moléculas de MEC. A: descripción de los distintos componentes involucrados en la respuesta del cono axónico a moléculas presentes en la MEC. B: interacción de las distintas moléculas de superficie celular y elementos presentes en la matriz extracelular. (Modificado de Purves, Neuroscience, 3<sup>o</sup> edición, 2004; Viapiano y Mathews, 2006)

Dentro de las llamadas proteínas matricelulares se incluyen a SPARC, familia tenascina, osteopontina y miembros de la familia CCN (Malik y cols., 2015), algunas de las cuales se expresan durante el desarrollo del SNC y han sido relacionadas con mecanismos de guía axonal.

### Tenascina

La familia de las tenascinas consta de 6 miembros: tenascina C, R, W, X, Y y N, siendo las Tn-C y -R las que se encuentran en mayor proporción en el SNC participando en morfogénesis, desarrollo neural, regeneración nerviosa y migración celular (revisado en Kwok y cols, 2011). Estas proteínas poseen roles controversiales en el desarrollo axonal debido a la presencia de dominios tanto adhesivos como anti-adhesivos, a veces promoviendo y otras inhibiendo el crecimiento axonal dependientes del tipo de célula con la cual interaccionan, los receptores, las vías de señalización, la matriz circundante y el tiempo de interacción (Pesheva y Probstmeier, 2000). Sin embargo, cabe destacar que ratones nulos para Tn-C no poseen anomalías anatómicas aparentes en el SNC (Zhou y cols, 2001); similar a lo observado en los nulos cuádruples para TN-C, Tn-R neurocan y brevican, en donde se cree que la expresión de fibulina 1 y 2, normalmente no expresadas en el SNC, estaría supliendo la actividad de las tenascinas, al unir los dominios C-terminal de los lecticans presentes en el parénquima (Rauch y cols., 2005). Estas proteínas poseen 3 estructuras oligosacáridas sulfatadas (HNK-1, condroitin sulfato-o-linked y GalNac-3-SO<sub>4</sub>) las cuales afectarían la adhesión, movilidad y migración (Woodworth y cols., 2004). Además, sus dominios FNIII (dominio fibronectina tipo III) y EGF (dominio tipo factor de crecimiento epidermal) estarían encargados de interactuar con los receptores neuronales; EGF con F11, mientras que FNIII con neurofascina, anexina II, integrinas y CALEB (chicken acidic leucine-rich EGF domain containing Brain protein) por mencionar algunos. Los efectos descritos de esta proteína sobre las células granulares del cerebelo y sobre los axones corticales de humanos han demostrado acciones repelentes, lo cual

lleva a sugerir que jugaría un rol más bien organizador en vez de promotor del crecimiento axonal (Falk y cols., 2002; El ayachi y cols., 2011). Este efecto también ha sido observado en neuronas mesencefálicas e hipocampales de rata embrionaria (Faissner y Kruse, 1990). Sin embargo, la expresión de tenascina también ha sido relacionada con crecimiento axonal en el desarrollo del nervio óptico en ratones, en la corteza cerebelar, en el núcleo hipotalámico y en ensayos *in vitro* tanto con tenascina purificada como con la mezcla tenascina/laminina en cultivos de médula espinal del día 3 de desarrollo *Gallus gallus*, lo que indica que el crecimiento por zonas positivas para esta proteína no genera un impedimento total al crecimiento axonal (Bartsch y cols., 1992; Bartsch y cols., 1995; Wehrle y Chiquet, 1990).

### Osteopontina

La osteopontina, fue inicialmente caracterizada como una fosfoproteína secretada por los osteoblastos hacia la matriz ósea, donde participa activamente en la remodelación de la matriz mineralizada. Sin embargo, estudios realizados en rata, mostraron que tras un daño en el nervio óptico y el nervio ciático la osteopontina era altamente expresada alrededor del nervio óptico, en donde generaba una potente acción inhibitoria sobre el crecimiento axonal (Perry y cols., 1987; Küry y cols., 2004). Este tipo de función ha llevado a pensar en un posible rol como molécula señal durante el desarrollo. Estudios de expresión de esta proteína en embriones de rata mostraron su presencia en la notocorda temprana y romboencéfalo sugiriendo un rol en la formación del eje neural, posteriormente se describió en cerebelo y tronco cerebral (Thayer y cols., 1995, 1998; Lee y cols., 2001). Sin embargo, datos presentes en el *Allen brain developing mouse atlas* muestra la expresión del gen de osteopontina SPP1 desde estadio E13.5- 18.5 en la zona alar del diencéfalo dorsal. En *Gallus gallus* solo se ha estudiado la presencia de este gen en torno al desarrollo craneal (Holleville y cols., 2003). Los distintos autores postulan diferentes funciones, pero la única claramente comprobada es su efecto

inhibitorio sobre el crecimiento axonal post-injuria (Küry y cols., 2004). Esto, más la aparente expresión en la placa alar del diencéfalo dorsal durante el desarrollo, lleva a pensar que osteopontina podría estar actuando como molécula señal en la guía de los axones de la cp.

### ***Proteoglicanes de condroitín sulfato***

Los proteoglicanes de condroitín sulfato (CSPGs) poseen un rol crítico en el desarrollo, plasticidad y regeneración nerviosa. Los CSPGs constan de un núcleo proteico que posee una o más cadenas de glicosaminoglicanos (GAG), los cuales están formados por polímeros de disacáridos siendo el más común el de ácido-D-glucurónico y N-acetil-D-galactosamina. La función de estas moléculas puede estar dada por el componente proteico o por las cadenas laterales de GAGs, aunque por lo general se trata de un efecto conjunto. Las propiedades de unión de los GAGs dependen del grado de sulfatación de la cadena de disacáridos, que puede variar entre 1 y 2 en distintas posiciones de los carbonos de la N-acetil-D-galactosamina (Revisado en Carulli y cols., 2005; Kwok y cols., 2011). Estas moléculas han sido localizadas en altos niveles alrededor de la fisura óptica en la retina en desarrollo, funcionando como barreras, de tal forma que si estas moléculas no están presentes los axones pioneros se desorientan en la retina y no convergen a la cabeza del nervio óptico (Brittis y cols, 1992; Ring y cols, 1995). Además, cuando los axones retinales llegan al tectum óptico crecen alrededor y sobre él, pero son prevenidos de cruzar la línea media hacia el tectum contralateral debido a la existencia de una barrera rica en CSPGs (Hoffman-kim y cols., 1998). Los CSPGs se unen a moléculas de ácido hialurónico en la MEC generando macromoléculas con alta carga negativa lo que lleva al reclutamiento de una cantidad considerable de agua y cationes, generando una matriz más densa que impide estéricamente el paso de las filopodias del cono axónico, inhibiendo su crecimiento. Por lo tanto, los niveles de expresión, el tamaño del centro proteico y el porcentaje de GAGs modularían la consistencia de la matriz

y su efecto inhibitorio (Schmalfeldt y cols, 2000; Evanko y cols., 2007; Masu M., 2016).

## ***Proteínas clásicas de matriz***

### *Laminina y fibronectina*

Laminina y fibronectina son proteínas clásicas de MEC, cuyo rol en el SN es diverso ya que se encuentra ampliamente modulado por los componentes presentes en el medio circundante. La laminina es una proteína con múltiples dominios de adhesión, principal componente de la lámina basal y conocida por proveer óptimas condiciones para el crecimiento neurítico (Calof y cols., 1984; Lander y cols., 1985; Jones y Cols., 2000). Molecularmente está conformada por tres cadenas:  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ , que se unen en un resorte enrollado  $\alpha$ -helicoidal. Estudios han logrado demostrar que la porción C-terminal de la cadena  $\alpha$  estaría promoviendo el crecimiento neurítico mediante principalmente la interacción con integrina  $\beta 1$  y una subunidad  $\alpha$  específica de cada tipo neuronal (Belkin y Stepp; 2000). Investigaciones llevadas a cabo en médula espinal de *Gallus gallus* han demostrado la expresión de laminina por parte de las células endodermales de la placa del suelo, lo cual ha sugerido un posible rol como blanco intermedio para los axones comisurales de las neuronas intersegmentales (Shiga y Oppenheim., 1991; Colamarino y Tessier-lavigne., 1995; Wiksten y cols., 2003). Esta proteína además se encuentra en las rutas migratorias de los neuroblastos, alrededor de las fibras axonales en crecimiento, así como también promoviendo el crecimiento neurítico en células de la raíz dorsal y participando en la migración de células entéricas derivadas de la cresta neural, promoviendo el correcto desarrollo del sistema nervioso entérico (Hemond y Morest., 1991; Ichikawa y cols., 2009; Nakazawa y cols., 2013). Estudios en *Gallus gallus* y pez cebra han demostrado que las neuronas motoras extienden sus axones en crecimiento por caminos estereotípicamente definidos positivos para laminina y rodeado por límites de fibronectina (Rogers y cols., 1986; Frost., 1986; Westerfield, 1986; Masuda y cols., 2009). Esto

último apuntaría a que los axones evitarían el paso por zonas positivas para fibronectina. Sin embargo, estudios posteriores indicarían que, aunque los axones eviten el paso por fibronectina, cuando estos se encuentran en rutas con la presencia de esta proteína se genera disminución de la velocidad del cono de crecimiento permitiendo un mayor tiempo para sensor el ambiente, fenómeno observado *in vitro* en el crecimiento axonal de las neuronas del ganglio espiral del oído interno y en los axones retinales del pez dorado (Vielmetter y cols., 1990; Evans y cols., 2007).

Cabe mencionar además que laminina es capaz de modular la respuesta de los conos de crecimiento en presencia de moléculas de guía axonal, como es el caso de axones retinales que en presencia de laminina responden a EphB colapsando y en presencia de L1 se vuelven insensibles a esta molécula (Birgbauer y Cols., 2001). Sin embargo, cuando estos axones son expuestos a EphB en presencia tanto de laminina como L1 la respuesta es completamente distinta, generando una pausa en los axones sin generar colapso del cono de crecimiento (Suh y cols., 2004).

Los antecedentes planteados, resumidos en los siguientes puntos,

- 1) *Los axones de la cp provienen de neuronas localizadas en la zona ventral del prosómero 1, los cuales ascienden dorsalmente hasta la placa del techo donde algunos de ellos cruzan al lado contralateral.*
- 2) *Se desconocen las moléculas involucradas en la guía de estos axones a excepción de OSC-espondina que se expresa en la placa del techo lateral, pero no en la zona media.*
- 3) *La familia de las Eph/efrinas es importante en procesos de guía axonal, y su presencia en la línea media es clave en la correcta guía de los axones comisurales.*
- 4) *EphA7 se expresa en la zona del prosómero 1 durante el periodo de formación de la comisura posterior.*
- 5) *El efecto de Eph/efrinas es modulado por proteínas de matriz extracelular.*

nos llevan a formular la siguiente hipótesis:

## HIPÓTESIS

**“EphA7, en colaboración con moléculas de matriz extracelular, es requerida para la correcta formación de la comisura posterior”**

## OBJETIVOS

### Objetivo General

Estudiar la expresión y función de EphA7 y la matriz extracelular durante el proceso de formación de la comisura posterior en embriones de *Gallus gallus*.

### Objetivos Específicos

**Objetivo 1: Analizar la expresión de moléculas de matriz extracelular y moléculas pertenecientes a la familia de las Eph/efrinas durante la formación de la comisura posterior.**

- 1.1. Analizar el patrón de expresión proteica en el prosómero 1 de proteínas de matriz extracelular (laminina, fibronectina, osteopontina, tenascina, proteoglicanos de condrotín sulfato) durante el desarrollo de la comisura posterior.
- 1.2. Identificar posibles receptores, para las moléculas de matriz extracelular identificadas, en los axones de neuronas provenientes de núcleos pretectales.
- 1.3. Analizar el patrón de expresión génica y proteica de EphA7 en el prosómero 1 en estadios tempranos de desarrollo.
- 1.4. Estudiar de la expresión de efrina-A5 y efrina-A2 (posibles ligandos de EphA7) en el prosómero 1 durante estadios tempranos de desarrollo.

**Objetivo 2: Estudiar la funcionalidad *in vitro* e *in vivo* de EphA7.**

- 2.1. Estudiar el efecto *in vitro* de EphA7 sobre explantes de núcleos pretectales.
- 2.2. Analizar el efecto de la inhibición de EphA7 *in vivo* durante la formación de la comisura posterior.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### MATERIALES

- Anticuerpos y marcadores fluorescentes

<b>ANTICUERPO (Antígeno)</b>	<b>TIPO</b>	<b>DILUCIÓN</b>	<b>PROCEDENCIA</b>
<b>ANTICUERPOS PRIMARIOS</b>			
Afru (OSC-espondina)	Policlonal conejo	1:500 Tris-BSA	Donación Dr. Rodríguez
Rafu (OSC-espondina)	Policlonal rata	1:200 Tris-BSA	Donación Dr. Rodríguez
NCAM (4D)	Monoclonal ratón	Sin diluir	Developmental Studies Hybridoma Bank, University of Iowa (DSHB)
V2E9 (Integrina $\beta$ 1)	Monoclonal ratón	Sin diluir	DSHB
P2C62C4 (Integrina $\alpha$ 6)	Monoclonal ratón	Sin diluir	DSHB
8D9 (L1-CAM)	Monoclonal ratón	Sin diluir	DSHB
Tuj1 (Neuron-specific Tubulina $\beta$ III)	Monoclonal ratón	1:500 Tris-BSA	R&D Systems, Inc., Minneapolis, USA.
4H6 (neurofilamento)	Monoclonal ratón	Sin diluir	DSHB
23.4-5 (TAG1)	Monoclonal ratón	Sin diluir	DSHB
NCAM Anti-Neural Cell Adhesion Molecule	Policlonal conejo	1: 1000 en Tris-BSA	Merck Millipore
M1B4 (tenascina)	Monoclonal ratón	Sin diluir	DSHB
B3D6 (fibronectina)	Monoclonal ratón	Sin diluir	DSHB
9BA12 (condroitin sulfato proteoglicanos)	Monoclonal ratón	Sin diluir	DSHB
1C10 (HNK1)	Monoclonal ratón	Sin diluir	DSHB

MPIIB10 <sub>1</sub> (osteopontina)	Monoclonal ratón	Sin diluir, según Devoll y cols., 1997.	DSHB
Anti-EphA7	Policlonal conejo	1:200 en Tris- BSA	Abcam, Inc. Cambridge, MA, USA.
Anti-Efrina A5	Monoclonal ratón	1:500 en Tris- BSA	Abcam, Inc. Cambridge, MA, USA.
<b>ANTICUERPOS SECUNDARIOS</b>			
Anti-IgG Conejo marcado con Alexa fluor®488	Anticuerpo de cabra	1:200 Tris-BSA	Invitrogen, Carlsbad, CA.
Anti-IgG Ratón marcado con Alexa fluor®488	Anticuerpo de cabra )	1:200 Tris-BSA	Invitrogen, Carlsbad, CA.
Anti-IgG Conejo marcado con Alexa fluor®546	Anticuerpo de cabra	1:200 Tris-BSA	Invitrogen, Carlsbad, CA.
Anti-IgG Ratón marcado con Alexa fluor®546	Anticuerpo de cabra	1:200 Tris-BSA	Invitrogen, Carlsbad, CA.
Anti-IgG Ratón marcado con peroxidasa	Anticuerpo de burro	1:100 Tris-BSA	Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA.
Anti-IgG Conejo marcado con peroxidasa	Anticuerpo de burro	1:100 Tris-BSA	Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA.
Anti-IgG Conejo marcado con fosfatasa alcalina	Anticuerpo de burro	1:100 Tris-BSA	Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA.
<b>OTROS MARCADORES</b>			
Faloidina (marcaje actina)	Alexa fluor 488-faloidina	1:500 PBS-BSA 2%	Thermo Fisher Scientific Inc., IL, USA
DAPI (marcaje nuclear)	420nm emisión 406nm excitación	1:10 en TRIS- BSA	Thermo Fisher Scientific Inc., IL, USA
TOPRO-3 (marcaje nuclear)	661nm emisión 642nm excitación	1:1000 en TRIS- BSA	Invitrogen, Carlsbad, CA.

**Tabla 1:** Tabla descriptiva de los anticuerpos primarios, secundarios y otros marcadores utilizados en este trabajo, características generales, diluciones y procedencia. (Fuente: Elaboración propia)

- Morfolinos

Morfolino	Secuencia
EphA7-fluor	5'-GAGGGAGCCGAGCCGACTTCGCAAACCAT-3'
Control- fluor	5'- CCTCTTACCTCAGTTACAATTTATA-3'

**Tabla 2:** Descripción de los morfolinos usados y su secuencia correspondiente. (Fuente: Elaboración propia)

- Partidores

Mensajero a detectar	Secuencia partidores	T (°C) de annealing experimental	Producto PCR (pb)
EphA7	5'-TTGGCCGATATGGGATATGT-3' (Fw) 5'-GCAAACGATAGCCTTCTTCG-3' (Rv)	57	322
efrina-A5	5'- CGTCTACTGGAACAGCACCA-3' (Fw) 5'- ACGCACGGTATCATCTGCTG-3' (Rv)	59	481
efrina-A2	5'-CTATTGGAACCGCAGCAACC-3' (Fw) 5'-CGGAACTCGAAGCCCAAAGA-3' (Rv)	59	291
$\beta$ -actina (Housekeeper)	5'-ACGTCGCACTGGATTCGAG-3' (Fw) 5'-TGTCAGCAATGCCAGGGTAC-3' (Rv)	56	282

**Tabla 3:** Secuencia de los partidores utilizados para la amplificación de los distintos transcritos a identificar, su temperatura de annealing experimental y el tamaño del producto de PCR esperado en pares de bases (pb). (Fuente: Elaboración propia)

- Plásmidos

- pCR<sup>®</sup>II-TOPO<sup>®</sup>-EphA7
- pCR<sup>®</sup>II-TOPO<sup>®</sup>-efrina-A2

- Concentraciones ribosondas

- DIGRNA-EphA7: 76.9 ng/ $\mu$ L
- DIGRNA-efrina-A2: 287 ng/ $\mu$ L

## MÉTODOS

### 1. Modelo animal de investigación

Como modelo animal se utilizaron embriones de *Gallus gallus* adquiridos al Instituto de Salud Pública (ISP) o en granjas de la región. Los huevos fertilizados se incubaron a 37° C hasta alcanzar el estadio de desarrollo requerido, determinado de acuerdo a Hamburger & Hamilton (1951). Los experimentos se llevaron a cabo acorde al manual de Bioseguridad y Bioética de la Comisión Nacional de Investigación de Ciencia y Tecnología (CONICYT, Gobierno de Chile) y el Comité de Ética de la Universidad de Concepción.

### 2. Manejo de muestras mediante técnicas histológicas

#### 2.1. Procesamiento histológico para inmunohistoquímica en corte

Los cerebros de animales en diferentes estadios de desarrollo fueron procesados mediante la utilización de Carnoy como fijador durante 24h. La inclusión en parafina se realizó mediante un lavado en alcohol 100% durante 10min, benzoato de metilo I, II y III por 15, 30min y 3h respectivamente, benzol I y II por 5 min cada uno y finalmente embebidos en Paraplast I, II, III, IV por 30, 30, 45 y 45 min respectivamente, posteriormente se procedió a hacer el taco de los especímenes. Durante la inclusión el cerebro fue orientado de forma de obtener cortes sagitales o frontales de 7-8  $\mu\text{m}$  (Microtomo Reicher-Jung autocut 2040). El seriado se realizó mediante la desparafinación de los cortes en Xilol y alcoholes en concentración decreciente y realizando tinción de hematoxilina-eosina para la posterior ubicación y selección de los cortes pertenecientes a la comisura posterior. Los cortes conteniendo la zona de interés se montaron en portaobjetos tratados con poli-L-lisina.

#### 2.2. Procesamiento histológico para hibridación *in situ*

Los embriones utilizados para hibridación *in situ* fueron fijados en paraformaldehído al 4% en PBS-DEPC (Merck, Darmstadt, Germany), siguiendo distintos protocolos según el tipo de hibridación a realizar. La

concentración del tampón fosfato salino (PBS) utilizada fue de 0,1M (1x) compuesto por: NaCl 0,14 M, KCl 2,6 mM, 8 mM, 1,4 mM ajustado a pH 7,4.

### 2.2.1. Procesamiento histológico para hibridación *in situ* en corte

Los embriones previamente fijados durante la noche en paraformaldehído al 4% en PBS-DEPC (Merck, Darmstadt, Germany) fueron deshidratados con alcohol al 100% por 10 min., y benzoato de metilo I, II y III por 15min., 30min y 3h respectivamente. Luego sumergidos en benzol I y II por 5min cada uno y finalmente embebidos en Paraplast I, II, III, IV por 30, 30, 45 y 45min respectivamente. Posteriormente se procedió a hacer el taco de los especímenes. Durante la inclusión fueron orientados de forma de obtener cortes frontales de 7-8  $\mu\text{m}$  (Microtomo Reicher- Jung autocut 2040), tras lo cual se realizó el seriado utilizando tinción de hematoxilina- eosina de forma de ubicar la zona del diencefalo dorsal. Previo a la hibridación los cortes de CP fueron montados utilizando agua-DEPC (Dietilpirocarbonato, Sigma, Sigma Aldrich Co, St. Louis, USA) en portaobjetos tratados con Vectabond® y mantenidos durante la noche en estufa humidificada a 60°C.

### 2.2.2. Procesamiento histológico para hibridación *in situ* en bloque

Embriones enteros de 3 y 7 días de desarrollo, fueron fijados por dos horas en paraformaldehído al 4% en PBS-DEPC (Sigma, Sigma Aldrich Co, St. Louis, USA) a temperatura ambiente o bien fijados durante la noche a 4°C. Posteriormente se deshidrataron en concentraciones crecientes de metanol en PBT (PBS1x + Triton X-100 0,5%) (25%, 50%, 70%, 100%) y rehidratados al momento de utilizar en concentraciones decrecientes de metanol en las mismas proporciones. En algunos casos se realizó una perforación en la pared mesencefálica para facilitar el flujo de solución durante los lavados.

## 3. Detección de expresión génica

### 3.1. RT-PCR

Para analizar la expresión génica de las distintas moléculas a estudiar se llevó a cabo la generación de cDNA de diferentes estadios de desarrollo mediante la disección de la zona de la comisura posterior en el área pretecal mediante cortes transversales. Posteriormente se disecó la zona dorsal y alar de la sección extraída anteriormente y fue guardada en RNAlater (Ambion, Austin, Tx) mientras se obtenía la cantidad necesaria (entre 10 y 20 embriones dependiendo el estadio), tras lo cual se llevó a cabo la purificación del RNA desde el tejido. Posteriormente se eliminó la posible presencia de DNA genómico utilizando DNase I por 50min a 37°C y a continuación se inactivó mediante la utilización de EDTA por 10 min a 65°C. Una vez realizado esto, el RNA purificado (2 µg) (o mismo volumen de agua para control negativo) fue incubado con oligodT (2.5 µM) (Fermentas, Life Sciences) por 5 min a 70 °C seguido de hielo por 2 min. Posteriormente se incorporó los dNTPs (0.0125 mM) (Fermentas, Life Sciences) y buffer 10x para MuV e incubó a 42°C por 2 min y a continuación se adicionó la transcriptasa reversa MuV incubando la reacción a 42°C por 60 min y luego 70° por 15 min para inactivar la enzima, obteniendo así las muestras positivas y negativas de cDNA.

### 3.2. Obtención de producto de PCR

Para la obtención del producto de PCR de EphA7, se diseñaron partidores específicos para EphA7 de *Gallus gallus* (Y14271) utilizando como herramienta Primer-BLAST de la página NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), obteniendo como resultado los partidores detallados en la tabla 3.

La reacción de PCR se realizó en un volumen final de 25µL conteniendo 1 µg del cDNA correspondiente, 2.5µL de tampón Taq 10X, 1.6 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,4 mM de dNTPS, 0,08 U de Taq DNA polimerasa (Fermentas, Life Sciences) y 0,4 µM de partidores. Esta solución fue incubada en un termociclador (Techne, Mod: Progene, England) siguiendo el siguiente programa: 95°C por 10min., 35 ciclos de 95°C por 30seg., 56 °C por 60seg, y 72°C por 20seg., finalizando con 5min a 72°C.

#### 4. Inmunohistoquímica

##### 4.1 Inmunofluorescencia e inmunoperoxidasa en cortes

La inmunohistoquímica fue llevada a cabo mediante el montaje de los cortes en portaobjetos tratados con poli-L-lisina (Sigma, Sigma Aldrich Company Ltd, Irvine Ayrshire, UK), y posteriormente desparafinados en Xilol, y luego por concentraciones decrecientes de alcohol hasta llegar a agua. Los cortes utilizados para inmunofluorescencia fueron tratados con borohidruro de sodio 10 mg/mL (Merck, Darmstadt, Germany) para eliminar la fluorescencia endógena. En el caso de los cortes utilizados para inmunoperoxidasa fueron tratados con peróxido de hidrogeno (Merck, Darmstadt, Germany) al 3% en metanol (Merck, Darmstadt, Germany) para eliminar la peroxidasa endógena. Una vez realizado este procedimiento los cortes fueron lavados en tampón fosfato pH 7,8 ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  8,4 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  3,5mM, NaCl 120 mM, Tris 10 mM) 3 veces por 10min. Posteriormente los cortes fueron incubados con los anticuerpos primarios correspondientes en cámara húmeda durante toda la noche. Los tipos de anticuerpos utilizados, así como sus diluciones se describen en la tabla 1.

Tras la incubación con anticuerpo primario se procedió a realizar nuevamente 3 lavados por 10min. cada uno con tampón fosfato 1x pH 7.8 y posteriormente se incubaron las muestras con los anticuerpos secundarios correspondientes acoplados a fluoróforo o peroxidasa de rábano picante, también descritos en la tabla 1 por 2h a temperatura ambiente y bajo oscuridad. En el caso de la inmunofluorescencia se utilizó la tinción nuclear TOPRO-3 o Dapi (Invitrogen, Carlsbad, CA; Thermo Fisher Scientific Inc., IL, USA) en dilución 1:500 en TRIS-BSA (Tampón fosfato más 1% de BSA) junto a los anticuerpos secundarios. Una vez realizada la incubación de los anticuerpos secundarios nuevamente se llevaron a cabo 3 lavados de 10min cada uno en tampón fosfato pH 7,8.

Finalmente, los cortes para inmunofluorescencia fueron montados en medio de montaje acuoso Fluoromount (Sigma, Sigma Aldrich Co, St. Louis,

USA), y guardados en oscuridad hasta su visualización y análisis mediante microscopía confocal (CMA BIO-BIO). Para la inmunoperoxidasa, los cortes fueron revelados con DAB 0,7 mg/mL (Diaminobenzidina, Sigma, Sigma Aldrich Chemical Co, St.Louis, USA) y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Merck, Darmstadt, Germany) al 0,1% por un tiempo máximo de 15 min, posteriormente deshidratados en concentraciones crecientes de alcohol y montados en entellán. En el caso de las inmunohistoquímicas con doble marcaje se reveló primero con vector-blue (vector laboratorios, Inc., Burlingame, CA, USA) como sustrato para la fosfatasa alcalina, posteriormente con DAB y montados en medio de montaje acuoso Faramount (Dako North America Inc., Carpinteria, CA USA). La visualización se realizó por microscopía de campo claro con microscopio Leica DME (Leica microsystem Inc.).

#### 4.2 Inmunohistoquímica en bloque

Se utilizaron encéfalos de embriones de pollo en estadio HH25, HH26 y HH28 los cuales fueron disecados cortando la zona ventral dejando la zona dorsal intacta. El tejido fue fijado en Carnoy durante la noche a 4°C, y luego tratado con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Merck, Darmstadt, Germany) al 30% en PBS por un periodo de 2 h. Posterior a esto se procedió a bloquear con suero normal de oveja al 10% en PBS con Triton X-100 (Bioworld) al 0,5% (PBTx) durante toda la noche. Tras esto se incubó el tejido con anticuerpo anti OSC- espondina (AFRU) en dilución 1:500, anti tubulina  $\beta$ III en dilución 1:500 (Tuj1, Promega, Madison, WI) o anti-EphA7 (1:100) durante 48 h, seguido de 5 lavados de 1 hora en PBTx. Se procedió posteriormente a incubar con anticuerpo contra IgG de conejo (para AFRU) o de ratón (para Tuj1 y para EphA7) acoplado a peroxidasa durante la noche a 4°C (Jackson Immunoresearch, West Grove, PA) en dilución 1:200. A continuación se realizaron nuevamente 5 lavados de 1 hora en PBTx previos al revelado, el cual fue realizado utilizando DAB 0,7mg/ml (Sigma, Sigma Aldrich Co, St.Louis, USA) en presencia de 0,001% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Merck, Darmstadt, Germany) para visualizar el patrón de

reconocimiento del anticuerpo. Una vez revelado, el tejido fue lavado en PBS y luego guardado en Glicerol al 50% (Bioworld) en PBS.

Durante todo este proceso los embriones fueron lavados con agitación para facilitar la penetración de los anticuerpos y el lavado de los mismos.

## 5. Inmunocitoquímica

### 5.1 Cultivo primario de neuronas o explantes de núcleos pretectales

Para la realización de los cultivos primarios de neuronas y explantes de los núcleos pretectales se procedió a desinfectar los materiales de disección a utilizar con alcohol de 70° y posterior aplicación de luz UV por 20 min. Para el cultivo de neuronas se utilizaron huevos fecundados de 6 días en donde se disecó la zona comisural del p1 de forma transversal, luego se cortó la zona ventral y dorsal, quedándonos con las zonas laterales, todo esto en placa de disección bajo hielo. El tejido cortado en cubos fue traspasado a placas estériles con PBS 1x estéril luego llevado a cámara de flujo laminar (Esco Biotech, Streamline class II BSC) para su tripsinización con tripsina 0.25% 1:250 (Gibco, Grand Island, NY, USA) durante 10 min a 37°C en estufa de cultivo. Una vez pasado el tiempo en la estufa se procedió a inhibir la tripsina mediante dilución en DMEM (HyClone laboratories, Inc., UT, USA) con suero bovino fetal 10%, 1x de L-glutamina y 1x de penicilina/streptomina. El tejido después fue disgregado mecánicamente, las células fueron contabilizadas utilizando cámara de Neubauer, sembradas en placas de 6 pocillos con cubreobjetos cubiertos de poli-l-lisina (Sigma-Aldrich Company, Ayrshire, UK) e incubadas por 30 min en DMEM completo y luego cambiadas a medio neurobasal-B27 (Gibco, Grand Island, NY, USA).

El cultivo de explantes se realizó utilizando embriones de 5 días de desarrollo, estos fueron disecados como se mencionó anteriormente, cortando la zona comisural de forma transversal, extrayendo la zona dorsal y ventral y cortando en cubos las zonas laterales. Estos cubos de tejido fueron depositados en placas con HBSS estéril (BI Biological Industries, Israel) y

luego fueron depositados en placas con cubre-objetos con poli-l-lisina o sobre placas con stripes previamente hechas, y cultivadas con medio neurobasal-B27-metilcelulosa 4 mg/mL.

## 5.2 Inmunocitoquímica de cultivos

Para la realización de inmunocitoquímica se procedió a fijar los cultivos neuronales o los explantes de núcleos pretectales por 15 min con PFA al 8% en volumen igual al del medio de cultivo (1:1, 4% volumen final). Una vez realizada la fijación se procedió a lavar con PBS 1x pH7.4 por 3 veces. Posteriormente se incubó con cloruro de amonio por 15 min (50mM) y consiguiente lavado en PBS 1X pH7.4 2 veces. Se bloqueó en PBS-BSA 2% por 1h y a continuación se permeabilizó con Tritón X-100 por 4 min seguido de 2 lavados en PBS 1x pH 7.4. Una vez llevado a cabo este proceso se incubó con la solución de anticuerpo primario en dilución adecuada en PBS-BSA 2% durante 1h y posterior lavado en PBS 1x 3 veces. Finalmente se procedió a incubar con anticuerpo secundario, marcador nuclear Dapi (Sigma Aldrich Co. LLC, St Louis, MO, USA) o faloidina-488 (Thermo Fisher Scientific Inc., IL, USA) durante 45 min, seguido de 4 lavados en PBS 1x y montados con Fluoromount (Sigma-Aldrich Co, St.Louis, USA).

Para la tinción de superficie se procedió a adicionar al cultivo el anticuerpo primario contra antígeno de superficie en el mismo medio del cultivo presente en las placas y bajo cámara de flujo laminar, posteriormente se incubó entre 5-10 min en estufa a 37°C y 5% CO<sub>2</sub> antes de la fijación con PFA al 4% volumen final. Una vez realizado el procedimiento se siguió como una inmunocitoquímica normal.

## 6. Hibridación *in situ*

### 6.1 Construcción de plásmido TOPO-EphA7

Una vez obtenido el Producto de PCR de EphA7 se procedió a su purificación utilizando el kit Qiaquick PCR purification kit (Quiagen, GmbH, Hilden,

Germany), para su posterior clonamiento en el vector pCR<sup>®</sup>II-TOPO<sup>®</sup> dual promoter (Invitrogen, Carlsbad, CA) siguiendo el protocolo establecido por los fabricantes. Posteriormente se transformaron las bacterias *E.coli* químicamente competentes Oneshot<sup>®</sup> Top10 (Invitrogen, Carlsbad, CA) utilizando el protocolo establecido en el kit, seguido de la siembra en placas selectivas conteniendo ampicilina [100 mg/mL] (1:100) (USBiological, Swampscott, MA) y X-GAL (30 µg/µL) (Merck, Darmstadt, Germany) y crecidas a 37°C por toda la noche. Finalmente, las colonias de color blanco, indicando la presencia del plásmido correctamente clonado, fueron elegidas para ser crecidas en medio LB (MO BIO Laboratories, Inc. Carlsbad, Ca, USA) + Kanamicina [100 mg/mL] (1:100) toda la noche. Posteriormente se procedió a purificar el plásmido utilizando el kit E.Z.N.A.<sup>™</sup> Plasmid mini kit II (OMEGA bio-tek Inc, USA). Una vez purificado el plásmido fue cuantificado utilizando un espectrofotómetro (UV-mini 1240, Shimadzu) y almacenado a -20 °C hasta su posterior análisis.

#### 6.2. Análisis del plásmido TOPO-EphA7 y síntesis de la ribosonda

Una vez obtenido el plásmido pCR<sup>®</sup>II-TOPO<sup>®</sup>-EphA7 se procedió a realizar distintos análisis de restricción con el fin de verificar la presencia y direccionalidad del inserto. Para esto el producto de PCR junto con el vector fue analizado utilizando el mapa de corte enzimático del plásmido entregado por el proveedor. Tras este análisis se procedió a elegir a EcoRI (Invitrogen, Carlsbad, CA) para analizar la presencia del inserto. El plásmido fue incubado con EcoRI a 37°C por 1h y luego visualizado en un gel de agarosa al 1,2% con bromuro de etidio en un transiluminador utilizando como marcadores de pb MassRuler<sup>™</sup> DNA Ladder low range (Fermentas) y O'Range Ruler 100bp+500bp DNA Ladder (Fermentas).

Para analizar la orientación del inserto se llevó a cabo una reacción de PCR en donde se combinaron partidores externos al inserto presentes en los extremos del lugar de inserción del vector pCR<sup>®</sup>II-TOPO<sup>®</sup> dual promoter (Invitrogen, Carlsbad, CA), provistos por el fabricante, junto con los partidores

de EphA7. Como control se realizó también PCR utilizando ambos Fw y Rv de M13 y EphA7. Para ello se utilizó plásmido TOPO-EphA7 en un volumen final de 25µL conteniendo 2,5µL de tampón Taq 10X, 1.6 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,4 mM de dNTPS, 0,08 U de Taq DNA polimerasa (Fermentas, Life Sciences) y 0,4 µM de partidores. Esta solución fue incubada en un termociclador (Techne, Mod: Progene, England) siguiendo el siguiente programa: 95°C por 10min, seguido de 35 ciclos de 95°C por 30seg., 58 °C por 60seg., y 72°C por 20seg., y finalmente 5 min a 72 °C.

Una vez obtenido el producto de PCR este fue visualizado mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,2% con bromuro de etidio en un transiluminador, utilizando como marcador de pb 1Kb DNA Ladder (Invitrogen, Carlsbad, CA). Finalmente, con el fin de corroborar la información obtenida, el plásmido fue enviado a secuenciar a la Facultad de Ciencias Biológicas, Departamento de Ecología de la Pontificia Universidad Católica de Chile, utilizando los partidores M13 que amplificarían corriente arriba y corriente abajo del producto de PCR insertado en el vector pCR®II-TOPO® .

Para la síntesis de la ribosonda, el plásmido purificado pCR®II-TOPO-EphA7 fue incubado por 4h a 37°C con las enzimas de restricción SPEI o NOT1 (Invitrogen, Carlsbad, CA), con el fin de linearizarlo para permitir que tanto la enzima T7 como SP6 transcribieran el inserto, y así obtener tanto la sonda sentido como antisentido. Una vez obtenidos los linearizados se procedió a purificarlos antes de realizar la síntesis de RNA utilizando Qiaquick PCR Purification Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) visualizado y semicuantificado en gel de agarosa al 1,2% utilizando como marcador de pb para cuantificar MassRuler™ DNA Ladder low range (Fermentas) y también O'Range Ruler 100bp+500bp DNA Ladder (Fermentas) como marcador de fragmentos de mayor longitud.

La síntesis de RNA con marcaje de digoxigenina (DIG) fue realizada con DIG RNA Labeling Kit (SP6/T7) (Roche Applied Science, Mannheim, Germany), de acuerdo a lo establecido en las instrucciones del fabricante. Una vez

obtenidas las sondas marcadas fueron analizadas en un gel de agarosa al 1,2% con Bromuro de etidio y posteriormente fueron almacenadas a -80°C hasta su utilización en la hibridación. El mismo procedimiento fue utilizado para la generación del plásmido pCR®II-TOPO®-efrina-A2 y su posterior análisis.

### 6.3 Hibridación *in situ* en corte

Los cortes obtenidos de acuerdo al procedimiento descrito en la sección 2.2.1 de materiales y métodos se rehidrataron en concentraciones crecientes de alcohol/ PBS-DEPC hasta PBS-DEPC. Posteriormente el tejido fue tratado con proteinasa K (USBiologicals, Swampscott, MA) en concentración 1µg/mL durante 5min., vueltos a fijar en paraformaldehído al 4% (Merck, Darmstadt, Germany), y luego acetilados con una solución compuesta por Trietanolamina 1,26 % v/v (Sigma, Sigma Aldrich Co, St.Louis, USA), HCl 36% 0,19 % v/v (Merck, Darmstadt, Germany) y ácido CH<sub>3</sub> – COOH 0,26 % v/v (Merck, Darmstadt, Germany) en H<sub>2</sub>O-DEPC durante 10 min con agitación lenta. Posteriormente los cortes fueron permeabilizados utilizando una solución de Triton X-100 (Bioworld) al 1% en PBS durante 30min. Entre los pasos anteriormente descritos los cortes fueron lavados en PBS 3 veces por 10 min cada lavado. Todas las soluciones descritas fueron previamente preparadas con agua tratada con DEPC (Bioworld), y el material utilizado previamente autoclavado.

Posteriormente se procedió a pre-hibridar en cámara húmeda a temperatura ambiente por 4 horas con solución de prehibridación compuesta por solución salina (10x) (2,8M NaCl; 0,01M Tris-Base; 0,09M Tris-HCl; 0,034M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,05M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, Formamida, Dextran sulfato (50% en H<sub>2</sub>O-d), Solución de Denhart's (50mg/ml H<sub>2</sub>O-d), H<sub>2</sub>O-DEPC. Para 10mL de solución de prehibridación se necesita 1 mL de solución salina, 5 mL de formamida, 2 mL de dextrán sulfato, 0,5 mL de tRNA, 0,2 mL de solución de Denhart's y 1,3 mL de H<sub>2</sub>O.

Luego de realizada la pre-hibridación se procedió a cambiar por solución de hibridación conteniendo las sondas de RNA marcadas en distintas diluciones 1:20, 1:50 y 1:100. Los portaobjetos fueron puestos en una estufa humidificada (Labtech LIB-080M, Daihan LabTech Co, Ltd. Korea) a 65°C durante toda la noche para llevar a cabo la hibridación.

Tras la hibridación los cortes fueron lavados en solución SSC 5X y 0,2X (usando como solución madre la correspondiente a SSC 20x: 3 M NaCl, 0.3 M citrato sodio, pH 7,0) y B1 (0,1M Tris pH 7,5; 0,15M NaCl; Triton X-100 0,1% pH 7,5), y posteriormente fueron bloqueados con Suero normal de oveja (SON) al 10% y lisina 0,1 M (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany) en solución B1 por 4h a temperatura ambiente. Una vez bloqueado el tejido se procedió a incubar con anticuerpo conjugado a fosfatasa alcalina anti-DIG (Anti-Digoxigenin-AP Fab Fragments, Roche Applied Science, Mannheim, Germany) en dilución 1:2000 en solución B1 con SON al 1% durante toda la noche en cámara húmeda y oscuridad.

El revelado se llevó a cabo tras lavados en solución B1 y posteriormente equilibrado en solución B2 (0,1 M Tris pH 9,5, 0,1 M NaCl, 50 mM MgCl<sub>2</sub> + 1 mL (0,001 %) de Tween 20). Los cortes fueron incubados en oscuridad con NTB/BCIP en agua (NTB/BCIP tablets, Roche Applied Science, Mannheim, Germany) hasta visualizar la marca. La reacción se paró utilizando solución B1 o PBS, los cortes fueron montados en medio de montaje acuoso y observados bajo microscopía de campo claro utilizando un microscopio Leica DME (Leica microsystem Inc.)

#### 6.4 Hibridación *in situ* en bloque

Los embriones mantenidos en metanol/PBT fueron rehidratados hasta PBT (PBS + Triton X-100 0,1%) y tratados con peróxido de hidrógeno al 1% en PBT por 1 hora. Posteriormente los embriones fueron tratados con proteinasa K 10 µg/mL (USBiological, Swampscott, MA) en PBT por 5min y tratados con glicina 2mg/mL (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany) en PBT por otros 5min. Tras esto los embriones fueron refijados en

paraformaldehído al 4% (Merck, Darmstadt, Germany), posteriormente lavados en PBT y a continuación equilibrados en solución de prehibridación por 5 min., la cual fue cambiada por solución fresca para pre-incubar los embriones durante toda la noche a 60°C.

Una vez realizada la prehibridación, los embriones fueron guardados a -20°C hasta su posterior uso. La hibridación de los embriones fue llevada a cabo intercambiando la solución de prehibridación por la solución de hibridación conteniendo las correspondientes sondas sentido o antisentido en una dilución 1:1000 para su posterior incubación a 60°C durante 48 horas. Una vez llevada a cabo la hibridación los embriones fueron lavados en solución SSC 0,1% + Triton X-100 0.1% (Bioworld) a 60° y con solución KTBT (50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,1% Triton X-100) a temperatura ambiente y posteriormente bloqueados utilizando SON (suero normal de oveja) al 15% y Blocking Reagent Powder (Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Germany) al 0,7 % en KTBT por 3 h a 4°C para su posterior incubación con el anticuerpo conjugado a fosfatasa alcalina anti-DIG (Anti-Digoxigenin-AP Fab Fragments, Roche Applied Science, Mannheim, Germany) en dilución 1:2000 en solución de bloqueo durante toda la noche a 4°C. Pasado este tiempo, se procedió a lavar en solución KTBT (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0,3% Triton X-100) 8 veces por 1 h cada lavado y posteriormente lavados en la misma solución durante toda la noche a temperatura ambiente. Los embriones fueron luego lavados con solución NTMT (100 mM Tris-HCl, pH 9.5, 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM NaCl, 0.1% Triton X-100, 1 mM levamisol) y posteriormente incubados con solución de revelado NTB/BCIP en agua (NTB/BCIP Tablets, Roche Applied Science, Mannheim, Germany) hasta visualizar marca. Una vez obtenida la señal los embriones fueron lavados en KTBT y guardados en glicerol 50% en PBS a 4°C hasta su posterior análisis bajo lupa (OLYMPUS, SZ51).

Todos los pasos descritos se realizaron con agitación suave con la finalidad de facilitar la penetración de las soluciones y la sonda.

## 7. Inhibición de EphA7 mediante inyección al tubo neural de morfolin

Para los experimentos de inhibición se procedió a inyectar mediante una micropipeta capilar morfolino contra EphA7 (GeneTools LLC, Philomath, OR, USA) en concentración 1mM al tubo neural en animales en estadio HH10, seguido por la electroporación en la zona de interés utilizando un electroporador Ovodyne electroporator TSS20 (Intracel, Royston Herts, UK) y electrodos de platino (Intracel, Royston Herts, UK). La electroporación se realizó posicionando los electrodos en la zona de interés (región dorsal del prosómero 1), orientando el ánodo hacia el techo diencefálico y el cátodo en dirección opuesta a este, proporcionando 12 pulsos de 11 V con intervalos de 100 msec. Los embriones electroporados fueron cubiertos con Parafilm y vueltos a incubar a 38°C hasta su visualización bajo lupa fluorescente 24-36 h después, con el fin de seleccionar los embriones que presentaron fluorescencia en el techo diencefálico. Los embriones con fluorescencia en la PTD permanecieron en incubación bajo las condiciones anteriormente descritas hasta estadios más avanzados de desarrollo (HH29, aproximadamente 4 días después de la inyección) y luego fijados en Carnoy, incluidos en parafina y analizados mediante técnicas histológicas e inmunohistoquímicas utilizando anticuerpos contra EphA7 con la finalidad de determinar el grado de inhibición de esta proteína.

## 8. Análisis *in vitro* del efecto de EphA7 sobre los axones de la región pretectal: ensayos de preferencia

Para la realización de los ensayos de stripe se utilizó una matriz que posee canales de silicona polimerizada. Los canales horizontales son de 50  $\mu$ m de ancho y 9 mm de largo y están separados cada uno por 50 $\mu$ m pudiendo crear carriles intercalados de dos proteínas a elección. Esta matriz posee un canal de entrada por donde se inyectó la solución de proteína (150  $\mu$ L) mediante la utilización de una jeringa de tuberculina con punta roma, una pequeña porción de solución debe permanecer en el canal de salida para prevenir la evaporación

del sistema. Una vez realizado este procedimiento, la placa fue incubada a 37°C y 5% CO<sub>2</sub> por 45 min y posteriormente lavados en 500 uL de HANK's. La matriz puede ser retirada después de esto y la placa Petri puede volver a ser incubada con otra proteína (Ej.: BSA o laminina como control negativo y positivo) bajo las mismas condiciones rellenando los espacios entre los carriles formados por la matriz. En este caso se llevó a cabo la formación de agrupaciones proteicas con la quimera recombinante EphA7-Fc (R&D Systems, Inc., Minneapolis, USA), incubando en agitación la solución de EphA7-Fc (10 µg/mL) más anti-hFc (2.5 µg/mL) (Jackson Immunoresearch Laboratories, Inc., Baltimore Pike, PA, USA) y fragmento Fc de IgG (10 µg/mL) (Jackson Immunoresearch Laboratories, Inc., Baltimore Pike, PA, USA) más anti-hFc (2.5 µg/mL) en una razón 4:1 durante 6 horas a temperatura ambiente. Las incubaciones fueron con anti- hFc sin fluoróforo y con anti-hFc acoplado con Cy3 (Jackson Immunoresearch Laboratories, Inc., Baltimore Pike, PA, USA) dependiendo del diseño experimental (Tabla 4) (Modificado de Bonhoeffer y Hufs, 1982). Además, se quiso estudiar el efecto mecánico que tendría sobre los axones en la presencia de la quimera para EphA7-Fc. Para esto se procedió a adicionar a la agrupación preformada con anti-hFc sin marcaje microesferas fluorescentes "FluoSphere" de 0.5 µm (Invitrogen, Eugene, Oregon, USA) al 2% generando así las distintas combinaciones (Tabla 4).

Tras la obtención de las stripes se dispuso a cultivar explantes de núcleos pretectales obtenidos de embriones de estadio HH27 mediante la disección del área del prosómero 1, observando la presencia de la cp y posteriormente extrayendo la placa alar y cortándola en pequeños cubos (1mm<sup>3</sup> aprox) los cuales se posicionaron sobre las stripes. Una vez sembrados los explantes las placas fueron dejadas en una estufa de cultivo (Sanyo CO<sub>2</sub> Incubator Mod: MCO-17AC, SANYO Electric Co, Ltd, Japan) con medio Neurobasal-B27 (Gibco, Invitrogen Co, UK) + Penicilina [100 UI/mL]/Estreptomicina [100 µg/mL] + metilcelulosa (Sigma Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA) 0.0004% a 37 °C con 5%CO<sub>2</sub> por 72h. Finalmente los explantes fueron fijados en PFA 4% y

analizados mediante la utilización de tinción vital Calceina AM 1 ng/ $\mu$ L (1:400) (Invitrogen, Eugene, Oregon, USA). Realizado esto se analizó la preferencia de los axones por uno u otro sustrato utilizando lupa fluorescente (Axio Zoom.V16, Zeiss).

Los ensayos de stripes se realizaron utilizando distintas combinaciones de EphA7-Fc y Fc, con el propósito de validar los controles mediante el análisis del comportamiento de los axones en relación a las diferentes combinaciones para luego identificar el efecto de EphA7 sobre los axones de los núcleos pretectales mediante análisis estadísticos.

El análisis de la formación de la agrupación proteica fue realizado mediante un gel de poli-acrilamida al 10% no denaturante en Buffer Tris-Borato 1x pH 8.5. Se utilizó glicerol estéril como buffer de carga al 15%, todas las muestras quedaron en concentración final de 200  $\mu$ g/mL. Como estándar de pesos moleculares se utilizó Pageruler plus (Thermo Fisher Scientific Inc., IL, USA). La visualización fue mediante la tinción del gel con azul de Coomassie 0.25% O.N. e incubado con solución de desteñido ( $H_2O$  + metanol + ácido acético en proporción 50/40/10 v/v/v), hasta visualizar las bandas.

## 9. Análisis de datos

### 9.1 Análisis de Inmunohistoquímica

El análisis de inmunohistoquímica en bloque se realizó con el software ImageJ 1.45. La generación de imágenes en pseudocolor se llevó a cabo utilizando las herramientas de imagen en 16 bits y look up tables en modalidad Spectrum denotando las áreas con mayor intensidad de inmunoreactividad como rojas y las de menor intensidad como azules. El análisis de intensidad de inmunoreactividad mediante plots se realizó con la utilización de trazos en escala de grises y utilizando los mismos puntos de referencia en los distintos embriones a lo largo del eje x o eje y correspondientemente y aplicando la herramienta análisis de Plot profile generando así un gráfico de Intensidad de inmunoreacción versus distancia (píxeles). Mediciones de longitud también fueron llevadas a cabo con ImageJ.

## 9.2. Análisis estadístico de experimentos de preferencia de sustratos

El área axonal fue medida mediante la herramienta "measure area" del programa "FIJI-ImageJ" (64bits), en donde primero se abrió la imagen en formato "TIFF" duplicándola y separando los canales, posteriormente se dejó solo el canal correspondiente a la fluorescencia verde y se ajustó el umbral de fluorescencia escogiendo la herramienta "Threshold", posteriormente se procedió a seleccionar el área con la herramienta "Freehand selection" y se obtuvo la medición del área ocupada por los axones en las distintas stripes. Una vez medido un  $n=5$  para cada situación se normalizaron los valores a porcentajes y se calculó el promedio, la desviación estándar y el error estándar de cada medición, además de la aplicación del test t de student para términos pareados y ANOVA unidireccional utilizando la herramienta VassarSTATs.net.



<u>Experimento</u>	<u>Efecto EphA7 sin la presencia de microesferas</u>	<u>Efecto mecánico proporcionado por las microesferas</u>
<b>Fc vs Fc</b>	Banda 1: Fc (hFc+ anti-hFc Cy3) Banda 2: Fc (Fc+ anti-hFc)	Banda 1: Fc (hFc + anti-hFc + microesferas) Banda 2: Fc (hFc+ anti-hFc)
<b>EphA7 vs EphA7</b>	Banda 1: EphA7-Fc (EphA7-Fc + anti-hFc Cy3) Banda 2: EphA7-Fc (EphA7-hFc + anti-hFc)	Banda 1: EphA7-Fc (EphA7-hFc + anti-hFc + microesferas) Banda 2: EphA7-Fc (EphA7-hFc + anti-hFc)
<b>EphA7 vs Fc</b>	Banda 1: EphA7-Fc (EphA7-hFc + anti-hFc Cy3) Banda 2: Fc (Fc+ anti-hFc)	Banda 1: EphA7-Fc (EphA7-hFc + anti-hFc + microesferas) Banda 2: Fc (hFc+ anti-hFc)
<b>Fc vs EphA7</b>	Banda 1: Fc (hFc + anti-hFc Cy3) Banda 2: EphA7-Fc (EphA7-hFc + anti-hFc)	Banda 1: Fc (hFc + anti-hFc + microesferas) Banda 2: EphA7-Fc (EphA7-hFc + anti-hFc)

**Tabla 4:** Distintas combinaciones de sustratos utilizadas para los experimentos de preferencia en presencia o ausencia de microesferas fluorescentes (fluorescencia dada por anticuerpo-anti-hFc acoplado a Cy3). (Fuente: Elaboración propia)

## RESULTADOS

### 1. Expresión de moléculas de matriz extracelular en el prosómero 1 en estadios tempranos de desarrollo

Debido al efecto que las proteínas de matriz extracelular tienen sobre los axones en crecimiento, y dado que no existe ningún estudio en relación a estas moléculas durante el desarrollo de la CP, se llevó a cabo el estudio de expresión de diversas proteínas de matriz extracelular en distintos estadios de desarrollo. Inicialmente se llevaron a cabo estudios en estadio HH29, periodo donde la cp alcanza su mayor desarrollo, para luego observar el comportamiento de estas moléculas en estadios más tempranos.

#### 1.1. Expresión de proteínas matricelulares: tenascina y osteopontina

##### 1.1.1. Análisis de expresión de tenascina

Los estudios de expresión de tenascina mediante inmunofluorescencia confocal en cortes de embriones de 6 días (HH29) denotan un patrón específico a través del eje ventro-dorsal. En la región entre p2 y el mesencéfalo se identificaron dos columnas positivas para esta proteína extendiéndose desde la placa basal hasta la región dorsal (CoD1, Fig. 8 F-J). Una de ellas en el estrato superficial y la otra en el estrato periventricular hasta llegar al límite con la placa del techo diencefálica (Fig. 8 L, flechas punteadas) donde la expresión de esta proteína desaparece (Fig. 8 N). En la región medial del prosómero 1 encontramos, a partir del tercio superior de la placa alar, una tercera columna en la capa medial del estrato intermedio (Fig. 8 L-M, flecha sólida). Al analizar la relación de los axones que van subiendo hacia la placa del techo se observa que esta tercera columna en conjunto con la que se encuentra en el estrato periventricular estarían generando un corredor en donde los axones avanzan a través de la capa profunda del estrato intermedio (Fig. 8 M flecha doble). Cabe mencionar que en el límite entre CoD1 y PTD todos los axones en crecimiento se encontrarían con esta proteína para luego

avanzar por la PTD positiva para OSC-espondina (Fig. 8 O). Destacamos además la expresión en la en la placa del suelo en p2 y p1 (Fig. 8, F-J).

### 1.1.2. Análisis de la expresión de osteopontina

La osteopontina se encuentra altamente expresada a través de todo el p1 (Fig. 9, B-D), a diferencia de sus límites cefálico (p2, Fig. 9, A) y caudal (mesencéfalo, Fig. 9, E) en donde disminuye drásticamente. En el prosómero 1, osteopontina fue identificado a lo largo del estrato intermedio, pero no en el estrato superficial o periventricular (flechas continuas y discontinuas en Fig. 9 K y L respectivamente). La expresión de esta proteína aumenta a través del eje de trayectoria axonal, en donde tanto axones como osteopontina co-localizan en la región lateral (flechas en Fig. 9 M y N). En la placa del techo, osteopontina se encuentra localizada entre los axones que conforman la cp, en donde las células de la PTD también son positivas para esta proteína, sugiriendo la posible secreción de osteopontina por estas células (flechas en Fig. 9 P). Los cortes horizontales a través de la PTD muestran a la osteopontina entre los axones que están atravesando la línea media (Fig. 9 Q-T).

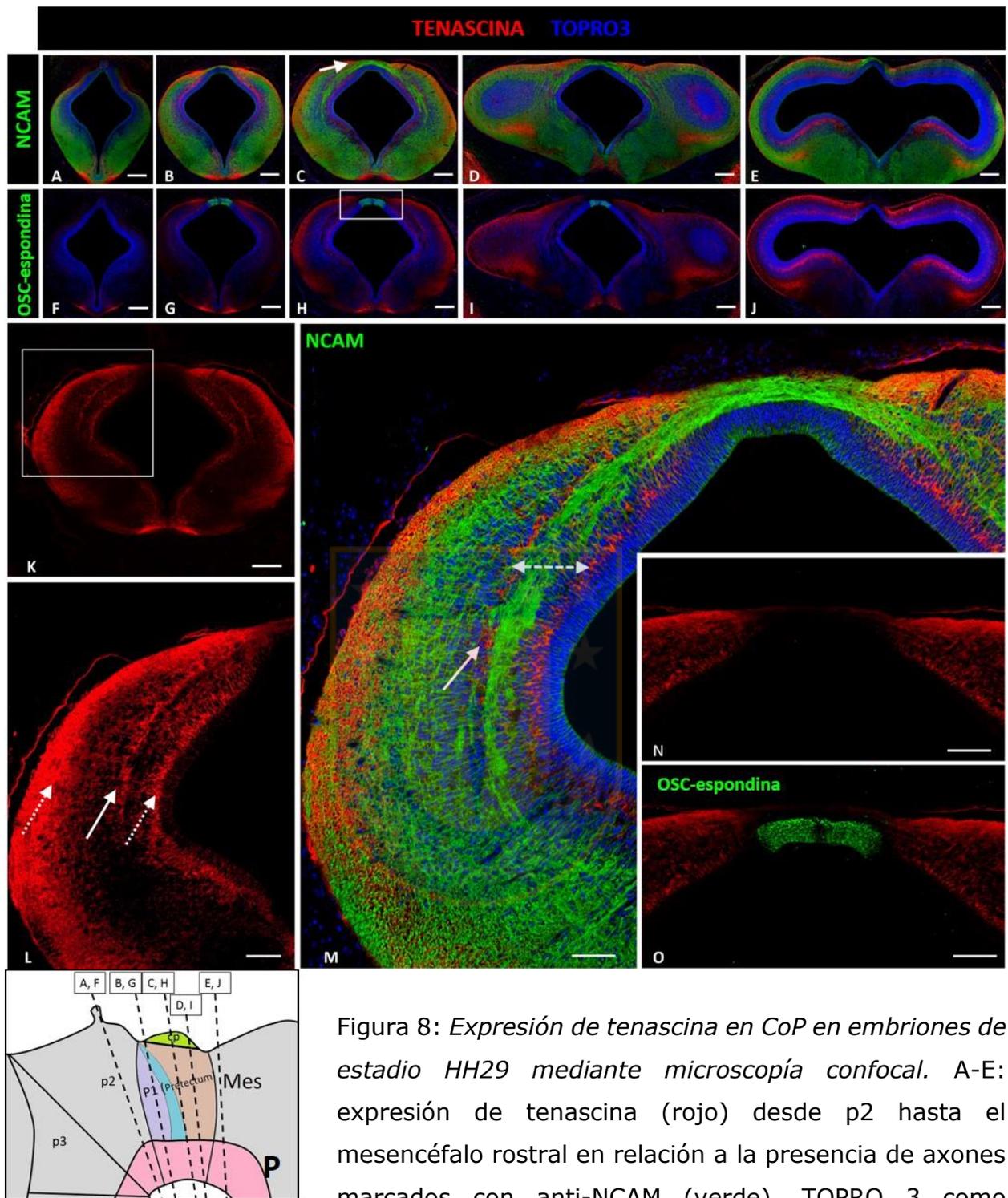


Figura 8: Expresión de tenascina en CoP en embriones de estadio HH29 mediante microscopía confocal. A-E: expresión de tenascina (rojo) desde p2 hasta el mesencéfalo rostral en relación a la presencia de axones marcados con anti-NCAM (verde), TOPRO 3 como marcador nuclear (azul). F-J: expresión de tenascina (rojo) desde p2 hasta el mesencéfalo rostral en comparación con la expresión de OSC-espondina (verde). K-M: aumento de la imagen en (C), mostrando el patrón de expresión de tenascina (rojo) organizado en tres columnas (flechas en L). M: fascículos axonales se dirigen

hacia la cp por un corredor (doble flecha punteada) delimitado por las columnas de tenascina. N-O: magnificación del recuadro en (H) mostrando la ausencia de tenascina en la PTD, en donde se expresa OSC-espondina. P: esquema visión lateral de encéfalo embrionario de acuerdo a Fig.4, mostrando la zona de corte con línea punteada. [Barras: A-K, 200 um; L, 100 um; M-O, 50 um]



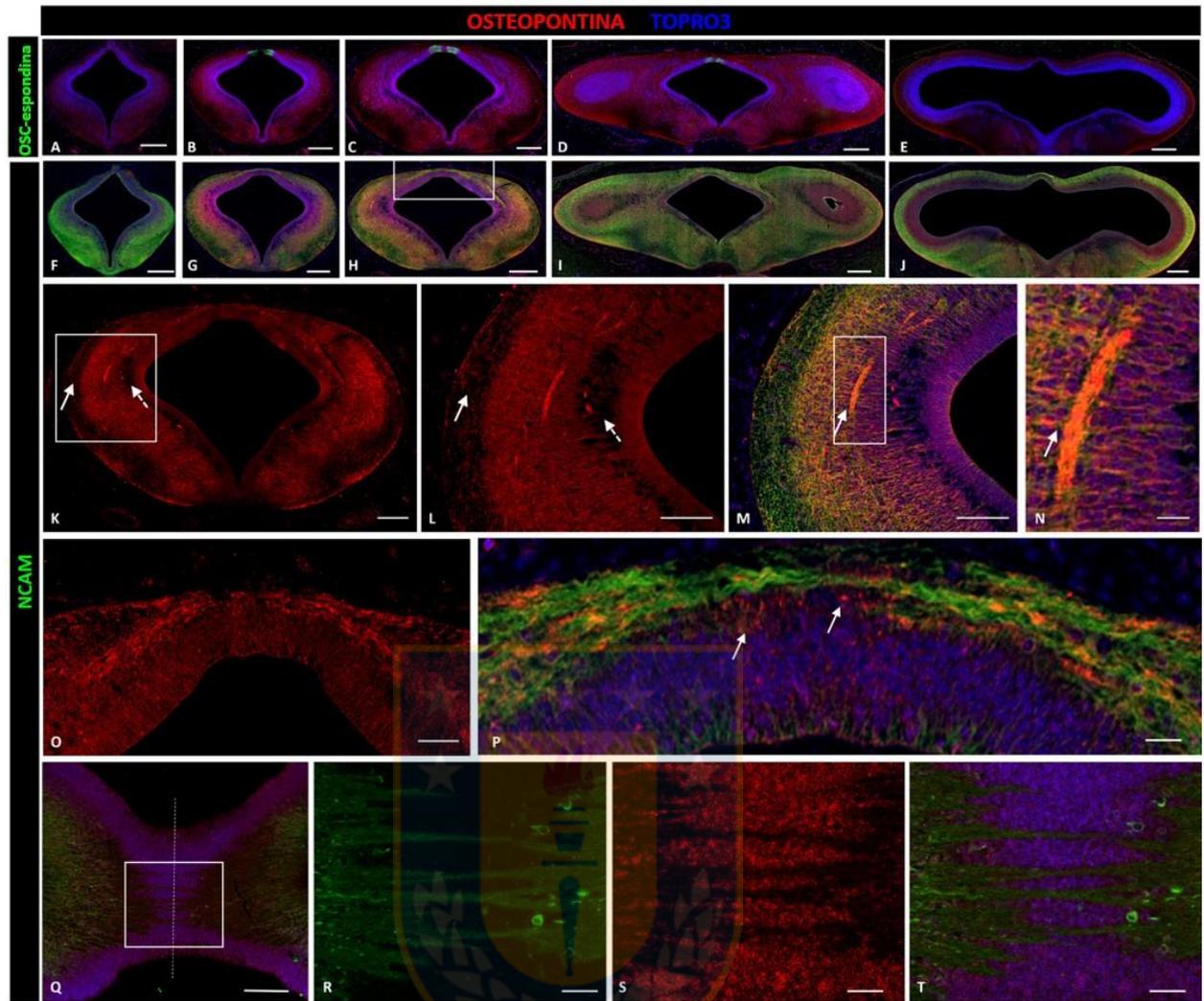


Figura 9: Patrón de expresión de osteopontina en CoP mediante microscopía confocal en estadio HH29. A-E: expresión de osteopontina (rojo) desde p2 hasta el mesencéfalo rostral en comparación con la expresión de OSC-espondina (verde), TOPRO 3 como marcador nuclear (azul). F-J: expresión de tenascina (rojo) desde p2 hasta el mesencéfalo rostral en relación a la presencia de axones marcados con anti-NCAM (verde). Osteopontina se ve altamente expresada en p1 (B-D), pero no en p2 (A) o en el mesencéfalo (E). K: expresión de osteopontina en la región medial de p1. L-N: magnificación del recuadro en (K), mostrando la amplia expresión de osteopontina en la región alar con la excepción del estrato preiventricular y superficial (flecha punteada y continua en K y L respectivamente). N: magnificación del recuadro en (M) mostrando la co-localización de NCAM con osteopontina en los fascículos axonales. O-P: magnificación

del área marcada en (H) mostrando la expresión de osteopontina en la región dorsal y en la PTD, entre los axones comisurales. Q-T: corte horizontal de p1 mostrando como los axones cruzan la línea media (línea punteada) y los axones entran a un medio rico en osteopontina. R-T: magnificación del recuadro en (Q). U: esquema visión lateral de cerebro embrionario de acuerdo a Fig.4, mostrando la zona de corte frontal (líneas punteadas negra) y horizontal (línea punteada roja). [Barras: A-J, 200  $\mu\text{m}$ ; K, 100  $\mu\text{m}$ ; L, M, O y Q, 50  $\mu\text{m}$ ; N, P, R y S: 10  $\mu\text{m}$ ]



## 1.2. Proteínas clásicas de matriz extracelular

### 1.2.1. Análisis de expresión de laminina

El análisis de expresión de laminina en la sección medial del p1 muestra la presencia de esta proteína desde la placa basal, específicamente alta en las regiones laterales y en la PTD (Fig. 10 A, flechas) y una expresión menor en las regiones dorsales (Fig. 10 A, Flechas discontinuas). Para analizar con mayor detalle la expresión en la PTD se realizaron cortes horizontales de esta región (Fig. 10 D-F), los cuales permitieron observar laminina co-localizando con OSC-espondina en la matriz extracelular que rodea a los axones comisurales (Fig. 10 D y E, flechas en ambos respectivamente). Esta expresión fue analizada también en relación a EphA7, mostrando un estrecho contacto con la laminina ubicada en el espacio extracelular (Fig. 10 F, flechas). Laminina también se encontró altamente expresada en la membrana limitante externa (Fig. 10 A, puntas de flecha y B, flecha).

### 1.2.2. Análisis de expresión de fibronectina

Esta proteína fibrilar de matriz no fue detectada en la sección media del p1 a excepción de las paredes de los vasos sanguíneos (Fig. 11 D y E, flechas), la membrana limitante externa (Fig. 11 C, flecha) y región apical de las células neuroepiteliales (Fig. 11 A, flecha; D y E, flechas discontinuas), con excepción de las células que expresan OSC-espondina (Fig. 11 A, flecha discontinua). Sin embargo, esta proteína está altamente expresada en el tejido mesenquimal circundante (Fig. 11 A-C, asteriscos).

## 1.3. Expresión de epítipo específico HNK-1 y CSPGs

### 1.3.1. Análisis de expresión para HNK-1

El patrón de expresión de HNK-1 en la zona medial del p1 va desde la placa basal hasta CoD1 de forma casi idéntica al patrón de tenascina, presentando las tres columnas a través del eje ventro-dorsal localizada en los estratos periventricular, medio intermedio y superficial (Fig. 12 A, punta de flechas). Las columnas periventricular y medial intermedia delimitan a los

axones que se extienden hacia la región dorsal (Fig. 12 D, flechas). Además, HNK-1 colocaliza con los axones en el estrato intermedio del dominio L1 (Fig. 12 E, flecha discontinua), desapareciendo cuando los axones llegan a la PTD (Fig. 12, flecha sólida en C y E). Esta proteína también se encuentra en la zona apical de las células neuroepiteliales (Fig. 12 A, flecha continua) con excepción de las células de la PTD secretoras de OSC-espondina (Fig. 12 A, flecha discontinua).

### 1.3.2. Patrón de expresión de CSPGs

La presencia de proteoglicanos de condrotín sulfato en la sección medial del p1 se localiza en el estrato intermedio de la región lateral disminuyendo a medida que avanza dorsalmente (Fig. 12 A', flecha discontinua) para volver a expresarse en la región dorsal (CoD1) (Fig. 12 A', flecha continua) pero sin mostrar colocalización con los axones (Fig. 12 D', flechas). CSPGs no se encuentran expresados en la PTD, pero si en el mesénquima supra-adyacente (Fig. 12 A', punta de flecha; B', asterisco). Además, podemos encontrar inmunorreacción en la placa del suelo y en el mesénquima subyacente a este (Fig. 12 A', flecha punteada).

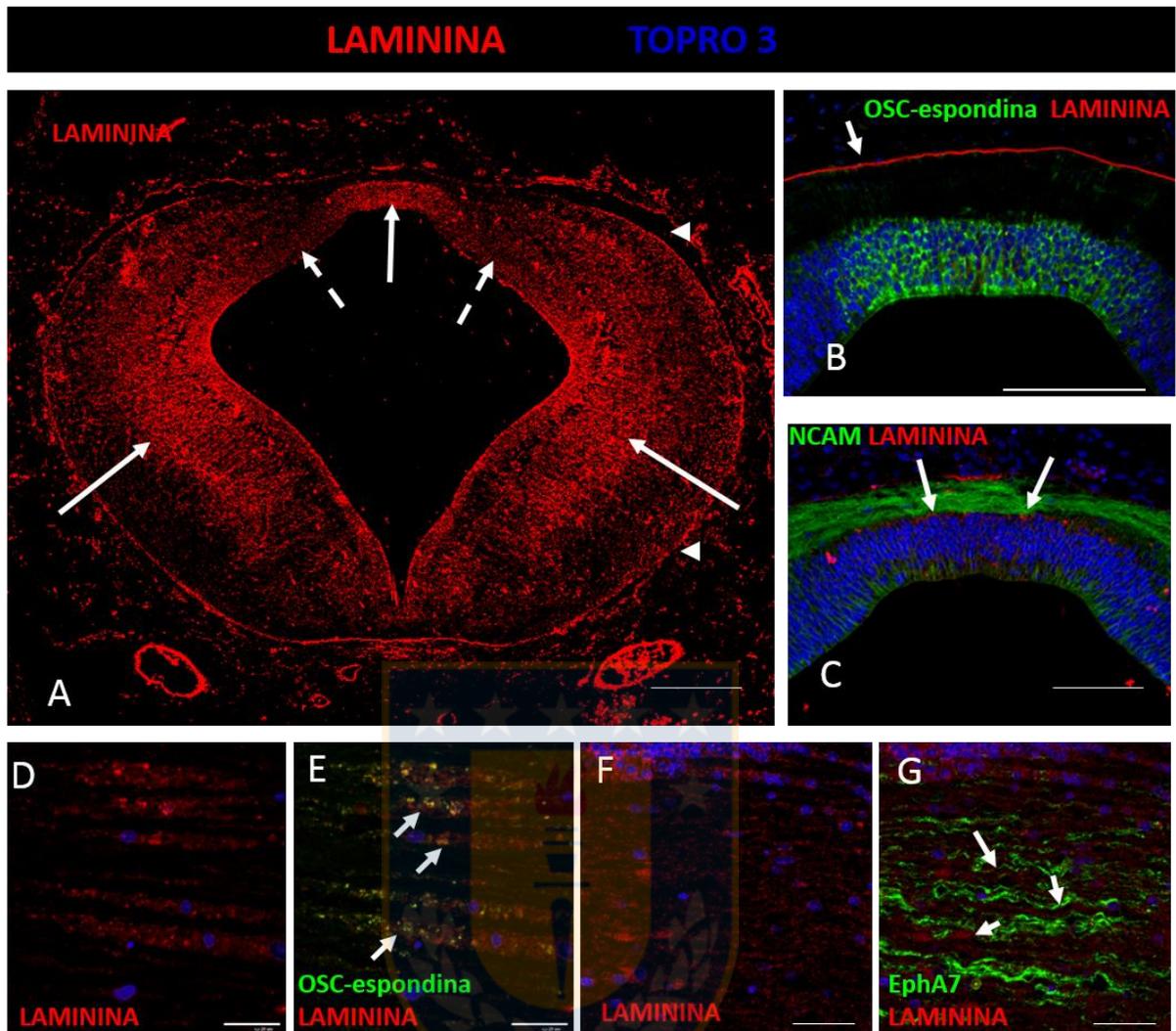


Figura 10: Análisis de la expresión de laminina en CoP mediante microscopia confocal en embrión HH29. A: imagen en bajo aumento de corte frontal mostrando las zonas con alta inmunorreactividad para laminina (rojo, flechas. B y C: expresión de laminina en la PTD en relación a la expresión de OSC-espondina (verde), NCAM (verde, axones) y TOPRO 3 como marcador nuclear (azul), aquí se puede observar que laminina estaría presente en la PTD (flecha en C) y en la membrana limitante externa (flecha en B). D-F: corte horizontal de CoP, mostrando la expresión de laminina en el espacio extracelular. D: expresión de laminina y OSC-espondina mostrando co-localización entre ambas en el espacio extracelular (flechas). E: relación de la expresión entre laminina (rojo) y los axones (verde), mostrando como estos (flecha continua) están rodeado por la laminina extracelular (flecha punteada). F: expresión de EphA7 (verde) y laminina (rojo) en estrecho contacto en la PTD (flechas). [Barras: A. 200 μm; B y C. 100 μm, D-F, 20 μm]

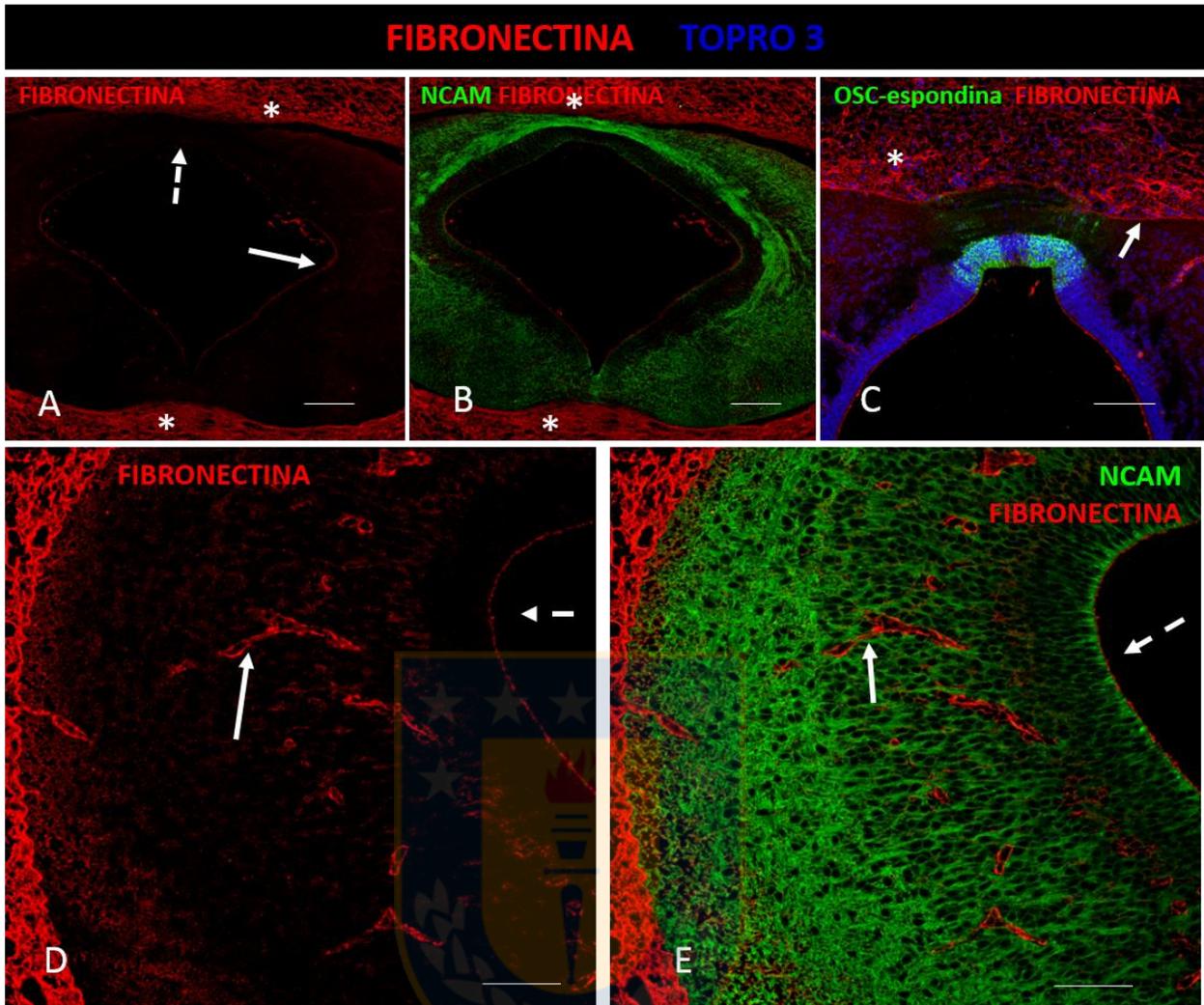


Figura 11: Análisis de la expresión de fibronectina en CoP en embrión HH29. A: imagen en bajo aumento de corte frontal de CoP mostrando la expresión de fibronectina, la presencia de esta proteína se encuentra principalmente en el mesénquima (asterisco) y en el borde de las células neuroepiteliales en contacto con el III ventrículo (flechas discontinuas). B: expresión de fibronectina y NCAM, mostrando que no existiría una co-localización entre ellas. C: expresión de fibronectina y OSC-espondina, se puede observar la presencia de esta proteína de MEC en la membrana limitante externa (flecha), TOPRO 3 como marcador nuclear (azul). D y E: expresión de fibronectina en la región apical de las células neuroepiteliales (flecha discontinua) y también en las paredes de los vasos sanguíneos de la región (flecha continua en D y E). [Barras: A, 200 um, B y C: 100 um, D y E: 50 um]

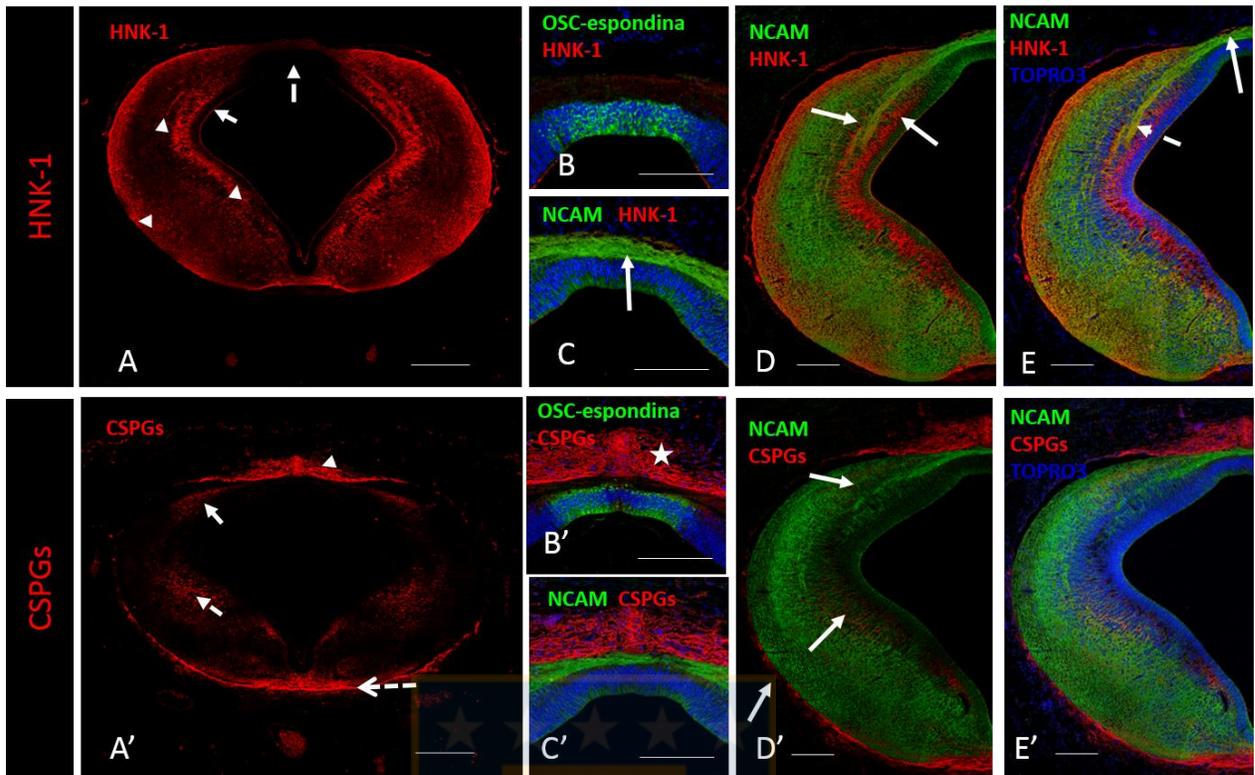


Figura 12: Patrón de expresión del epítipo HNK-1 y CSPGs en corte frontal de CoP de embrión en estadio HH29 mediante microscopia confocal. A y A': imagen en aumento menor del área mostrando expresión para HNK1 y CSPGs respectivamente (flechas y puntas de flecha). B-B' y C-C': magnificación del área de la PTD marcada con OSC-espondina y NCAM (verde), HNK-1 y CSPGs (rojo) y TOPRO 3 como marcador nuclear (azul). D-D' y E-E': imagen aumentada de la zona lateral mostrando como los axones (NCAM, verde) se encuentran dispuestos en relación a la expresión de HNK-1 y CSPGs (rojo). [Barras: A-A', 200 um; B-E y B'-E': 100 um]

#### 1.4. Moléculas presentes en la membrana limitante externa

Durante el estudio de posibles proteínas de MEC implicadas en el crecimiento neurítico se quiso estudiar si existía la presencia de perlecán y decorina. Los resultados de inmunofluorescencia confocal nos mostraron que tanto perlecán como decorina están fuertemente expresados en la membrana limitante externa (Fig. 13, A y D, flechas) y en los grandes vasos sanguíneos circundantes en el mesénquima (Fig. 13, A y D puntas de flecha). En el caso específico de perlecán podemos observar claramente su presencia alrededor del fascículo retroflexus (Fig. 13, A flecha discontinua).

#### 1.5. Expresión de proteínas de matriz extracelular en p1 en estadio HH24

El análisis de la expresión de laminina, HNK-1 y osteopontina durante este estadio de desarrollo, momento en el que ya han llegado los primeros fascículos que conforman la cp, muestra un patrón poco definido, abarcando regiones laterales desde la placa basal hasta la región dorsal (CoD1), careciendo de un patrón específico en relación a los axones que formarán la cp (Fig. 14 F, H e I). En tanto las otras moléculas de MEC analizadas como tenascina y fibronectina no muestran expresión durante este estadio (Fig. 14, B y G; E y J respectivamente).

#### 1.6. Posibles receptores presentes en los axones

Para estudiar los posibles receptores presentes en los axones provenientes de los núcleos pretectales se llevó a cabo tinción de superficie en cultivo de neuronas provenientes de los núcleos pretectales para distintos marcadores. Los resultados demostraron la presencia de al menos 4 marcadores de superficie tales como TAG-1, L1-CAM, integrina  $\alpha 6$  e integrina  $\beta 1$ , los cuales se presentaron a lo largo de la extensión del axón (Fig. 15, A-A'''). Al observar las imágenes con aumento mayor, se detectó la presencia de estos marcadores en el cono axónico (Fig. 15, C-C''').

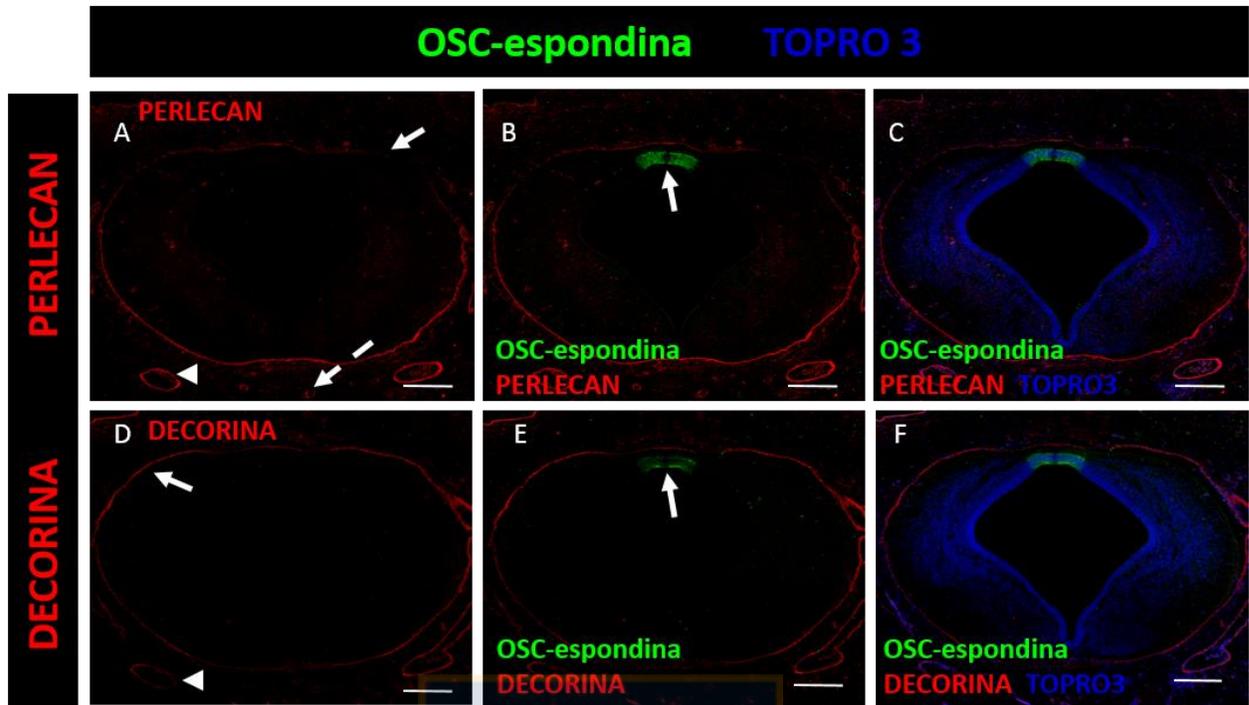


Figura 13: *Expresión de perlecan y decorina en secciones frontales de CoP marcados con OSC-espondina en estadio HH29. A-C: expresión de perlecan (rojo). A: muestra como perlecan está presente en la membrana limitante externa (flecha), también se puede observar su presencia alrededor del fasciculus retroflexus (flecha discontinua) y alrededor de los vasos sanguíneos del mesénquima (punta de flecha). D-F: expresión de decorina (rojo). D: muestra cómo está presente en la membrana limitante externa (flecha) y alrededor de los vasos sanguíneos (punta de flecha). OSC-espondina (verde) y TOPRO 3 como marcador nuclear (azul). [Barras: 200  $\mu$ m].*

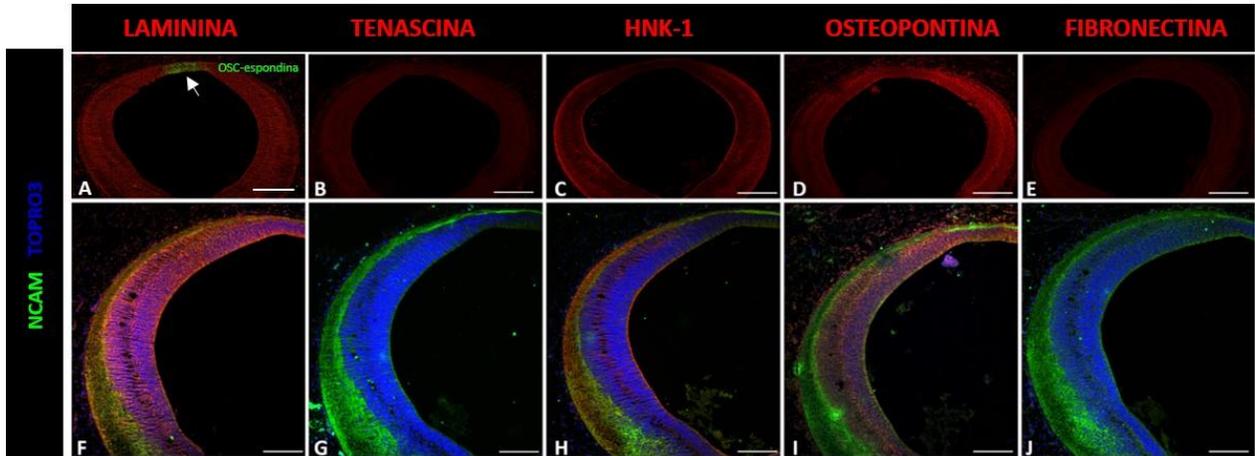


Figura 14: Análisis de la expresión de laminina, tenascina, HNK-1, osteopontina y fibronectina en cortes frontales de CoP en estadio HH24. A-E: imágenes mediante microscopia confocal mostrando la localización de las distintas moléculas de MEC analizadas (rojo) y la presencia de OSC-espondina (verde) solo en la placa del techo (flecha en A). F-J: análisis de la expresión de las moléculas de MEC (rojo) en relación a los axones marcados con anti-NCAM (verde), TOPRO 3 como marcador nuclear (azul). Laminina (A, F), HNK-1 (C, H) y osteopontina (D, I) están presentes durante este estadio de desarrollo, pero no presentan un patrón de expresión específico en relación a los axones de la cp. Tenascina (B, G) y fibronectina (E, J) no se detectaron durante este estadio. [Barras: A-E, 200  $\mu\text{m}$ ; F-J, 100  $\mu\text{m}$ ]

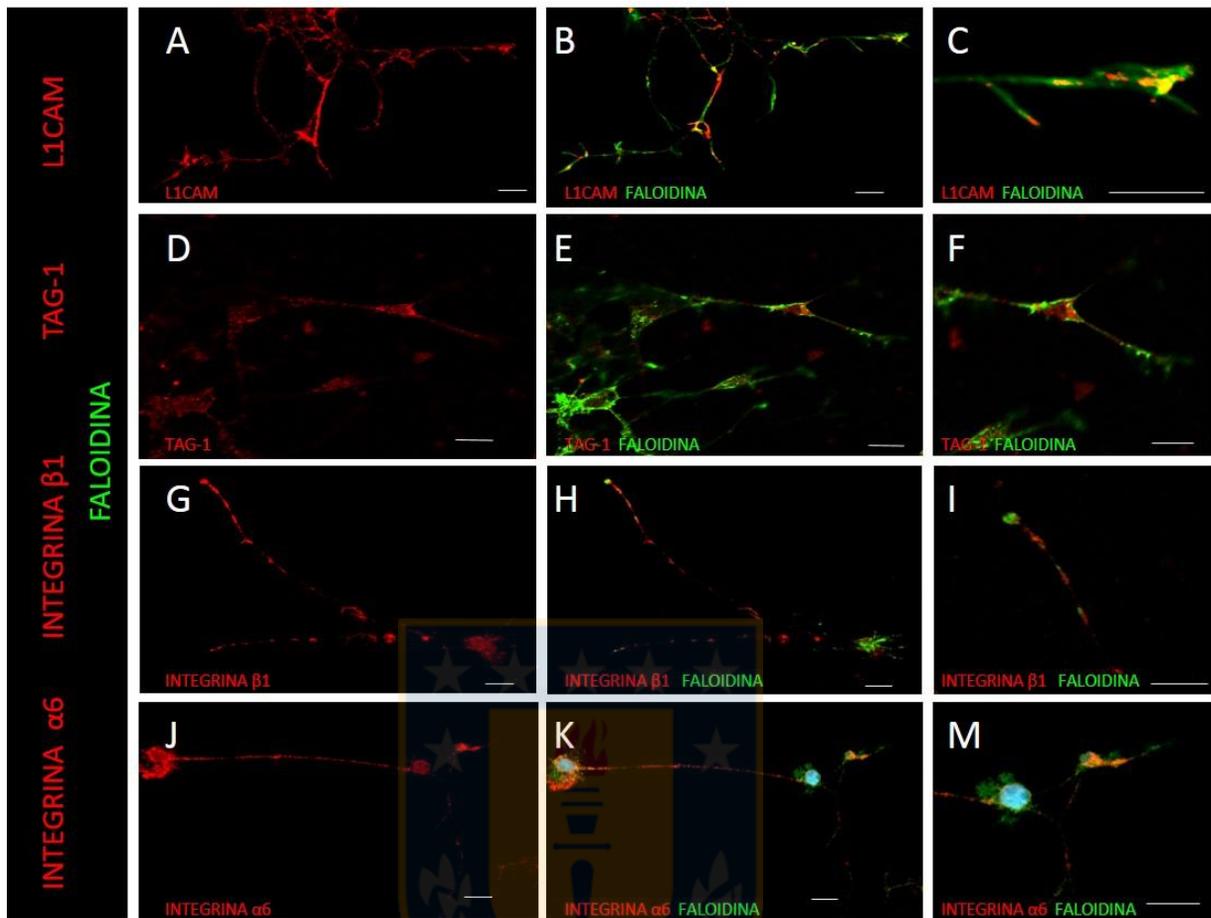


Figura 15: Axones provenientes de neuronas de núcleos pretectales presentan distintos posibles receptores para moléculas de matriz extracelular. A-J: axones marcados con anticuerpos específicos para moléculas de superficie (rojo). A-C, marcaje del cultivo de neuronas con anti-L1CAM. D-F: marcaje de las neuronas con anti-TAG-1. G-I: marcaje de las neuronas con anti-integrina  $\beta$ 1. J-M: marcaje de las neuronas con anti-integrina  $\alpha$ 6. B-K: superposición entre faloidina (verde) y los distintos marcadores de superficie (rojo). C-M: aumento de la zona que contiene al cono axónico, mostrando la co-localización de las distintas moléculas con la estructura. [Barras: 10  $\mu$ m]

## 2. Caracterización del patrón de expresión génica y proteica de EphA7 en estadios tempranos de desarrollo embrionario.

### 2.1. Análisis de la expresión génica de EphA7 en la placa del techo diencefálica

#### 2.1.1. RT-PCR para EphA7

Como primera aproximación para estudiar la expresión de EphA7 en la placa del techo diencefálica, se realizó RT-PCR utilizando ARNm obtenido de la zona de la PTD de los días 4, 5 y 6 (HH22, HH25, HH28), etapa en que la comisura posterior presenta su mayor crecimiento. Como control positivo se utilizó ADNc obtenido a partir de cerebro total de embrión de 6 días. Para descartar una posible contaminación con ADN se analizaron también los ADNcs obtenidos en ausencia de transcriptasa reversa y como control de la técnica se utilizaron los partidores de  $\beta$  actina en las mismas muestras. Los resultados (Fig. 16, A) muestran que EphA7 se expresa en la zona estudiada, mostrando una banda de 322 pb, tanto en las reacciones con ADNc de la PTD de 4, 5 y 6 días como en el control de cerebro completo de 6 días (Fig. 16 A, carriles 2-5), dicha banda no está presente en los controles sin transcriptasa reversa (Fig. 16 A, carriles 6-9). Este resultado tiene dos consecuencias, en primer lugar, comprueba que EphA7 se expresa en el diencefalo dorsal, aunque no indica su patrón de expresión tisular, y en segundo lugar genera el producto de PCR a partir del cual generamos las sondas necesarias para hibridación *in situ*.

#### 2.1.2. Estudio mediante hibridación *in situ* de la expresión de mensajero para EphA7 en cortes y en embriones completos

##### 2.1.2.1. Clonamiento del producto de PCR de EphA7 en vector TOPO

El producto de PCR para EphA7 obtenido de la PDT de animales de 4 días fue clonado en el vector pCR<sup>®</sup>II-TOPO<sup>®</sup> dual promoter (Invitrogen, Carlsbad, CA) obteniendo así el plásmido TOPO-EphA7, el cual fue crecido en bacterias One shot top10. La linearización del plásmido purificado se realizó con las enzimas de restricción SPEI y NotI de acuerdo a lo descrito en el manual del

vector (Fig. 16 B, carriles 3 y 4). La inserción del producto de PCR de EphA7 fue comprobada mediante digestión con enzima de restricción EcoRI indicado por el programa NebCUTTER2.0 de NEB, lo que nos generó el producto esperado de 340 pb (322pb correspondiente a EphA7 mas 18pb de plásmido ubicado entre zona de corte de EcoRI y zona de inserción) (Fig. 16 B, carril 5).

La orientación del inserto se analizó mediante PCR utilizando como partidores los oligonucleótidos diseñados para generar el producto de PCR de EphA7, en combinación con partidores internos del plásmido incluidos en el kit del vector denominados M13 forward y reverse respectivamente. Los resultados de la reacción de PCR demuestran que el producto está inserto como el inverso complementario del producto de PCR original (Fig. 16 C), debido a la inexistencia de amplificación al utilizar el partidor M13 forward junto con EphA7 forward en una misma reacción de PCR y presencia de un fragmento al utilizar M13 Reverse junto con EphA7 forward, indicando que ambos partidores se complementan durante la amplificación, no estando ubicadas las secuencias en un mismo extremo. Los controles usando ambos partidores para EphA7 y para M13 generaron los productos del tamaño esperado (322 pb y 566 pb respectivamente). Estos resultados finalmente indican que la ribosonda antisentido será sintetizada por la SP6 RNA polimerasa, mientras que la sonda sentido sería sintetizada por T7 RNA polimerasa. La clonación y el sentido fueron corroborados mediante secuenciación (ver materiales y métodos), dando como resultado la secuencia esperada y corroborando la información obtenida con PCR sobre la orientación del fragmento.

#### 2.1.2.2. Hibridación *in situ* para EphA7 en embriones completos de pollo

- Expresión de EphA7 en embrión en estadio HH18

La llegada de los axones pioneros a la línea media de CoP se observa durante el día 3 de desarrollo (HH18) como se puede observar en cortes

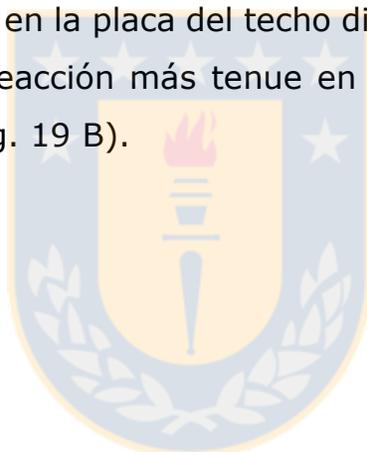
sagitales de embriones de ese estadio marcados con anticuerpos contra tubulina  $\beta$ III (Fig. 17 A, recuadro y B, Flecha), encontrando al cuarto día (HH23) la presencia de fascículos axonales (Fig. 17 A', recuadro y B', flecha). Por lo tanto, una vez sintetizada la sonda para EphA7 se llevó a cabo la hibridación *in situ* en embriones completos de 3 días de desarrollo (HH18) momento del desarrollo en donde empiezan a arribar los axones. Los resultados de la hibridación muestran que la marca se restringe a la zona cefálica del SNC, destacando específicamente reacción en la zona telencefálica anterior con marcada presencia a su vez en la línea media (Fig. 17 C, flechas incompletas), mesencefálica y diencefálica caudal, especialmente a nivel dorsal (Fig. 17 C, recuadro). Esto revela, por lo tanto, la expresión de EphA7 en la región mesencefálica-diencefálica incluyendo la zona de la placa del techo diencefálica desde estadios tempranos de desarrollo, coincidiendo con la llegada de los primeros axones que conforman la comisura posterior.

- Expresión de EphA7 en cerebro de embriones en estadio HH30

Una vez visto que el transcrito para EphA7 se encontraba en estadios tempranos de desarrollo, se quiso analizar su permanencia en estadios más avanzados, cuando se produce la llegada masiva de los axones de la cp. Los resultados del análisis de expresión de EphA7 en embriones de 7 días (HH30) mostraron una alta expresión del transcrito en la zona telencefálica (Fig. 18 B-C, flechas), tanto en la línea media como en las zonas laterales, lo que se correlaciona con datos bibliográficos que describen la presencia de esta proteína durante el desarrollo del sistema retino-tectal (Marín y cols., 2001). Además, de forma interesante podemos ver que la expresión en la línea media dorsal sigue tenuemente hasta la zona del diencefalo caudal, restringiéndose solo a la zona medial en este lugar (Fig. 18 D). La expresión mesencefálica desaparece en este estadio, quedando presente solo entre el límite diencefálico-mesencefálico (Fig. 18 B-D, flechas discontinuas).

### 2.1.2.3. Expresión de EphA7 en cortes de diencefalo

Para analizar con más detalle la expresión de EphA7 se realizó hibridación *in situ* en cortes frontales del prosómero 1 en estadio HH27. Los resultados obtenidos demuestran la expresión del transcrito de EphA7 en la zona de la PTDM (Fig. 19, A y B), justo en la locación donde existe una depleción de OSC-espondina (Fig. 19, D y E). La expresión del ARNm en las células de la línea media, tanto en el cuerpo como en las prolongaciones, sugiere que los axones que formarán la cp se encontrarán con esta molécula en la línea media. Estos resultados nos permiten además correlacionar la depleción de OSC-espondina en la PTDM con la expresión de EphA7 en esta zona, mostrándonos un patrón de expresión complementario entre ambas proteínas de guía axonal en la placa del techo diencefálica. Además de la línea media se observa una reacción más tenue en la zona alar del prosómero 1 (flechas discontinuas, Fig. 19 B).



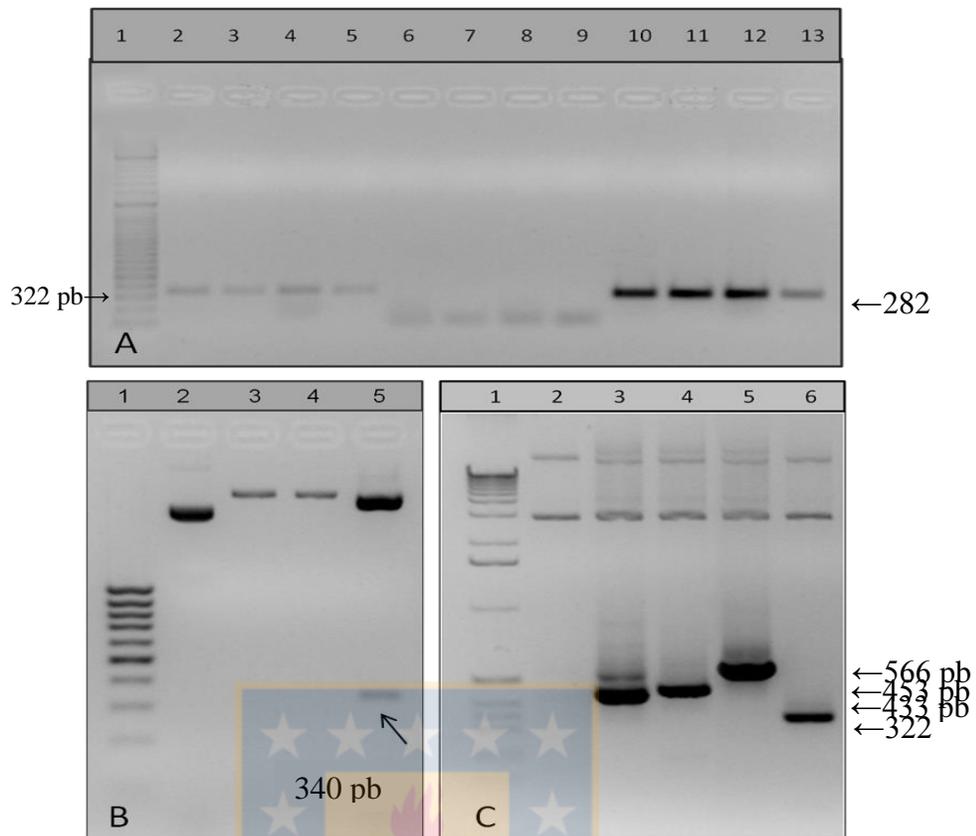


Figura 16: A: PCR para *Epha7* en muestras tomadas de la PTD durante distintos estadios de desarrollo y análisis de plásmido TOPO-*Epha7*. Carril 1, Estándar de pares de bases (Fermentas). Carril 2-5: PCR para *Epha7* usando cDNA obtenido a partir de PTD de estadio HH23, HH27, HH29, y cerebro completo HH29, respectivamente. Carril 6-9: PCR con los controles negativos sin transcriptasa reversa de las muestras corridas en 2-5 respectivamente. Carril 10-13: PCR usando los partidores para *Bactina Gallus gallus* de las mismas muestras utilizadas en 2-5. B: Análisis de plásmido linearizado mediante semicuantificación en gel de agarosa. Carril 1, Estándar de pares de bases (Fermentas). Carril 2: Plásmido sin linearizar. Carril 3: Plásmido linearizado con NotI, Carril 4: Plásmido linearizado con SpeI. Carril 5: Plásmido cortado con EcoRI liberando un fragmento de 340 pb que contiene al inserto del producto de PCR de *Epha7*. C, PCR de orientación del inserto; Carril 1: estándar de pares de bases 1Kb; Carril 2: no hay amplificación con partidores M13F/*Epha7*F; Carril 3: partidores M13F/*Epha7*R, amplifican un fragmento esperado de 433pb; Carril 4: M13R/*Epha7*F, amplifican fragmento esperado de 453 pb; Carril 5: M13F/M13R (566pb), Carril 6: *Epha7*F/*Epha7*R (322pb), el inserto está orientado como el inverso complementario del producto PCR original.

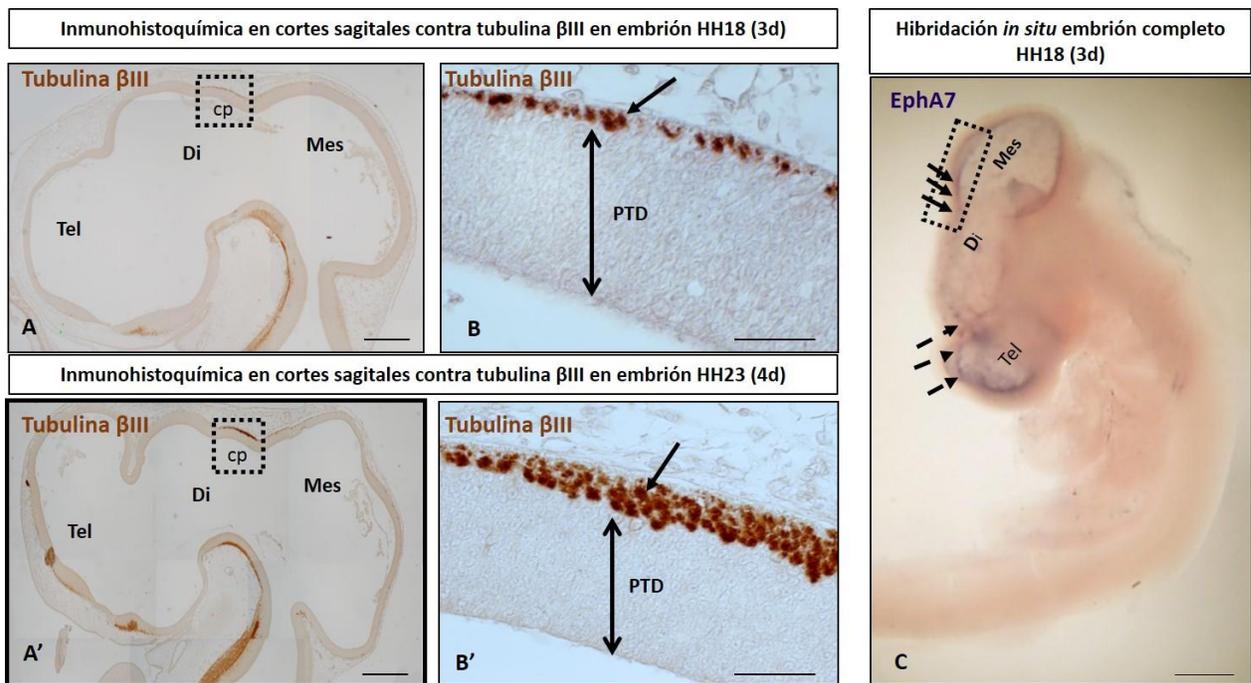


Figura 17: *Expresión de EphA7 en la placa del techo diencefálica-mesencefálica.* A y A': Inmunohistoquímica para tubulina  $\beta$ III en corte sagital de cerebro completo de embrión HH18 (3 días) y HH23 (4 días) respectivamente. B y B': Imagen aumentada de A y A' en donde se muestran los axones pioneros (flechas). C: Hibridación *in situ* para EphA7 en embrión completo de 3d (HH18) mostrando la expresión del mensajero en la zona diencefálica-mesencefálica (Flecha entera). Tel: telencéfalo; Di: diencefalo; Mes: mesencefalo; cp: comisura posterior; PTD: Placa del techo diencefálica. [Barras: A y A', 200  $\mu$ m; B y B': 50  $\mu$ m; C: 1mm]

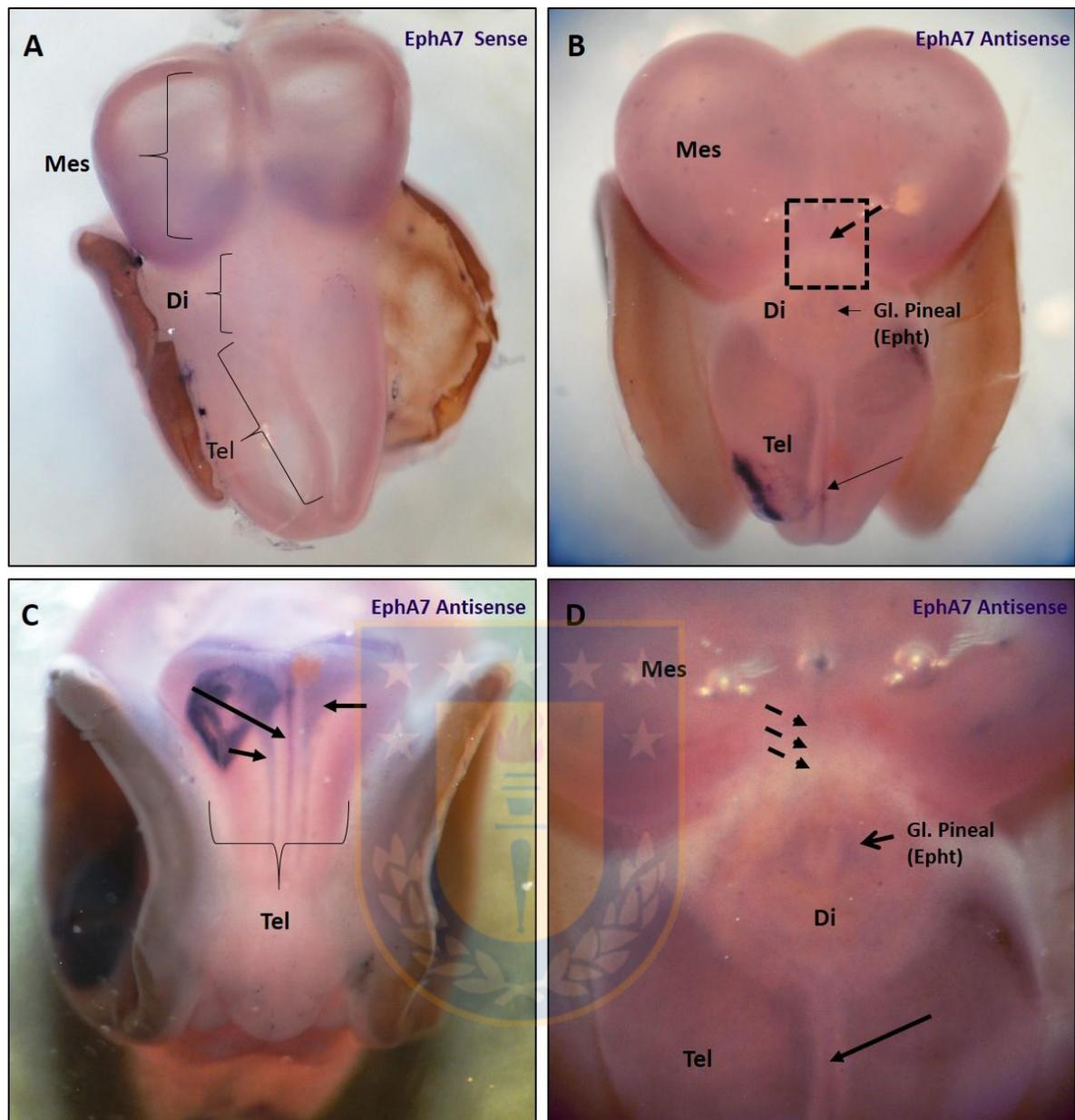


Figura 18: *Expresión de EphA7 en la línea media telencefálica y diencefálica-mesencefálica en embriones de 7 días (HH30)*. A: vista superior de embrión control hibridado con ribosonda sentido para EphA7. B: vista superior de embrión hibridado con sonda antisentido para EphA7, mostrando un patrón característico de distribución del transcrito. C: vista frontal del mismo embrión mostrando marca en la línea media telencefálica y vesículas telencefálicas (flechas). D: aumento de imagen de B, las flechas indican reacción positiva en la línea media dorsal telencefálica (flecha continua) y diencefálica-mesencefálica (flechas discontinuas). Tel: telencéfalo; Di: Diencefalo; Mes: Mesencéfalo.

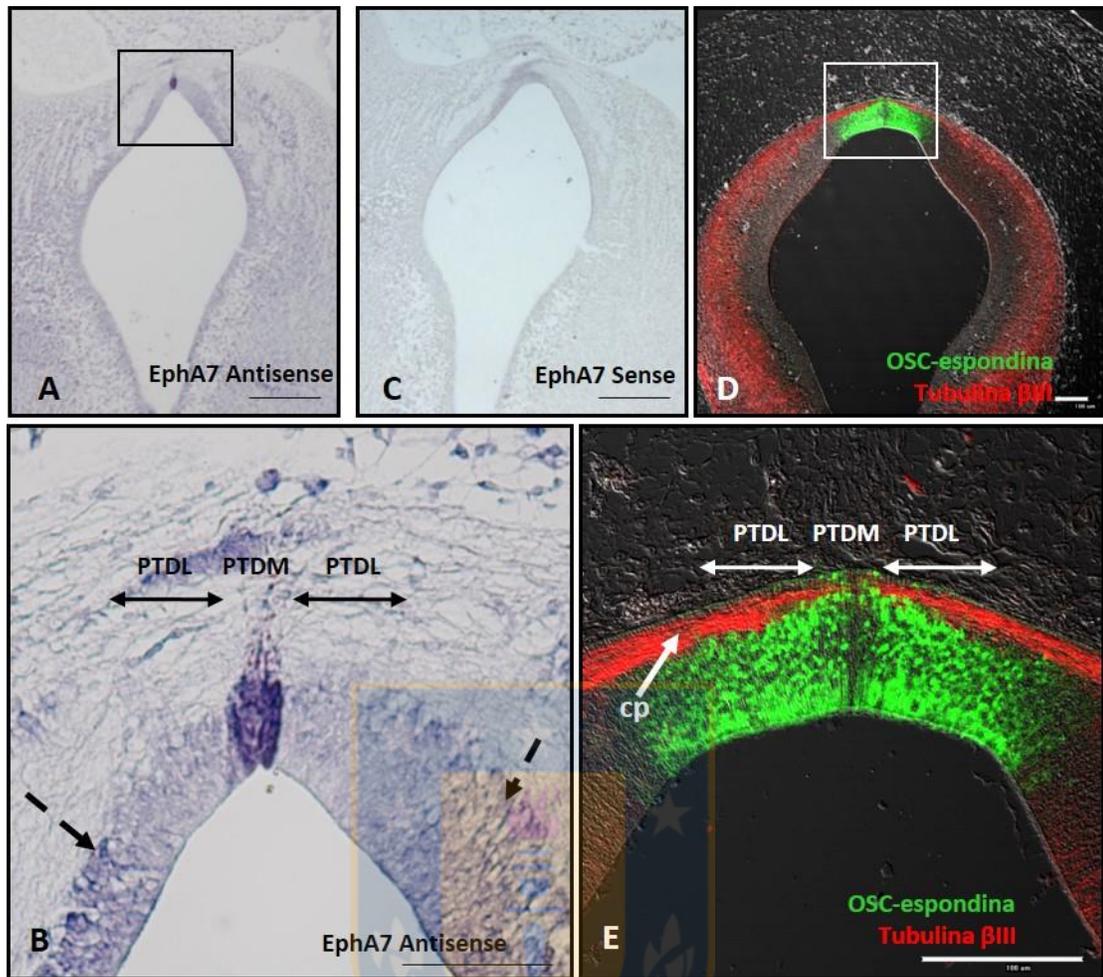


Figura 19: *Expresión de EphA7 en cortes frontales de prosómero 1 en embriones de 5 días (HH27) y comparación con el patrón de expresión OSC-espondina en el mismo estadio. A: hibridación *in situ* corte de prosómero 1 tratado con sonda antisentido con reacción positiva en la línea media dorsal (recuadro). B: aumento de recuadro en A mostrando la zona medial de la placa del techo (PTD) positiva para EphA7 y las zonas laterales (PTDL) carentes de reacción, observando también una tenue reacción en las placas alares (flechas discontinuas). C: hibridación *in situ* en corte control tratado con sonda sentido para EphA7 sin reacción específica. D y E: inmunofluorescencia con anticuerpo anti OSC-espondina (verde) y anti tubulina  $\beta$ III (rojo) que relaciona la depleción de la inmunorreactividad de OSC-espondina con la reacción positiva de la hibridación *in situ* para EphA7 en esa zona.*

## 2.2. Expresión proteica de EphA7 durante el desarrollo

### 2.2.1. Análisis de la expresión de EphA7 en embriones completos en estadio HH18

El estudio de EphA7 mediante inmunohistoquímica en bloque en embriones en estadio HH18 revela la presencia de esta proteína en la PTD (Fig. 20 B flecha con punta sólida azul) durante la aparición de los primeros axones comisurales (Fig. 20 A y B flecha y punta de flecha café respectivamente). Además, se observa inmunorreacción en regiones donde ya ha sido descrito con anterioridad tales como en la retina, vesícula ótica, corazón y espacios intersomitas, lo que comprueba la especificidad de la inmunorreacción (Fig. 20 B flechas azules).

### 2.2.2. Análisis de la expresión de EphA7 y OSC-espondina en cerebro completo en estadios HH25-HH29

Al realizar el análisis de la presencia de EphA7 mediante inmunohistoquímica en bloque podemos observar que en estadio HH25 el patrón de expresión de la proteína está restringido a la línea media dorsal. Si comparamos estos resultados con los obtenidos previamente en el laboratorio sobre la expresión de OSC-espondina en el mismo estadio (Stanic et al, 2010) podemos observar que se complementan, es decir OSC-espondina es expresada con mayor intensidad en las zonas laterales de la placa del techo diencefálica (PTDL) mientras que EphA7 se expresa exclusivamente en la placa del techo medial (PTDM) (Fig. 21, E-F). Así mismo, podemos observar mediante imágenes de pseudocolor la intensidad de cada proteína en las distintas zonas de la placa del techo y la distribución de la intensidad de la reacción observadas en las gráficas, mostrando un patrón de distribución complementario entre ambas proteínas (Fig. 21, D y H).

En estadios posteriores del desarrollo la inmunohistoquímica en bloque arrojó como resultado la expresión de EphA7 conservada en la zona de la línea media tanto en HH27 (Fig. 21 I-J, flecha) como en HH29 (Fig. 21 K-L, flecha);

sin embargo, esta expresión va decayendo en sentido céfalo-caudal a medida que avanza el estadio de desarrollo (Fig. 21 I-L).

### 2.2.3. Análisis de la expresión de EphA7 y OSC-espondina en cortes de PTD durante el desarrollo de la comisura posterior

El análisis de cortes frontales del CoP en embriones en estadio HH30 revela que en este estadio se mantiene la expresión de EphA7 en las células de la línea media dorsal (Fig. 22 B), las cuales se encuentran flanqueadas a ambos lados por células inmunopositivas a OSC-espondina (Fig. 22 C). Es importante destacar que es precisamente en este lugar donde algunos axones giran hacia el lado ipsilateral, sugiriendo que EphA7 podría tener un efecto repulsivo sobre estos axones (Fig. 22 A).

Además de la línea media dorsal, la presencia de EphA7 también se observa en columnas en la placa alar, localizadas en la zona más externa en el estrato superficial (su) y en la zona periventricular o estrato periventricular (Pe) como se observa en la figura 22 D (flechas discontinuas).

### 2.2.4. Estudio de la expresión de EphA7 en las regiones laterales del CoP y su relación con los axones de la comisura posterior

Se realizaron cortes frontales de embriones en estadio HH24 y HH30 (4 y 6 días respectivamente) los cuales fueron analizados mediante inmunohistoquímica para EphA7 y tubulina  $\beta$ III. En ambos estadios se muestra la formación de dos columnas (Fig. 23, A-D cuadros), una externa localizada en el estrato superficial (Su), que va desde la placa basal hasta el inicio de los dominios comisurales y una interna que estaría por encima de las células neuroepiteliales en el estrato periventricular (Pe) de la placa alar en estadio HH24. Sin embargo, en HH30 podemos observar que existe una prolongación de la columna más interna ubicada en Pe al tercio superior de la placa basal. Al observar con mayor magnificación podemos ver como los axones que se desplazan en esta región en sentido ventro-dorsal, lo hacen

navegando en la región flanqueada por ambas columnas positivas para EphA7, sugiriendo que esta molécula podría tener un efecto repulsivo que estaría delimitando un corredor axonal. (Fig. 23 B' y D')



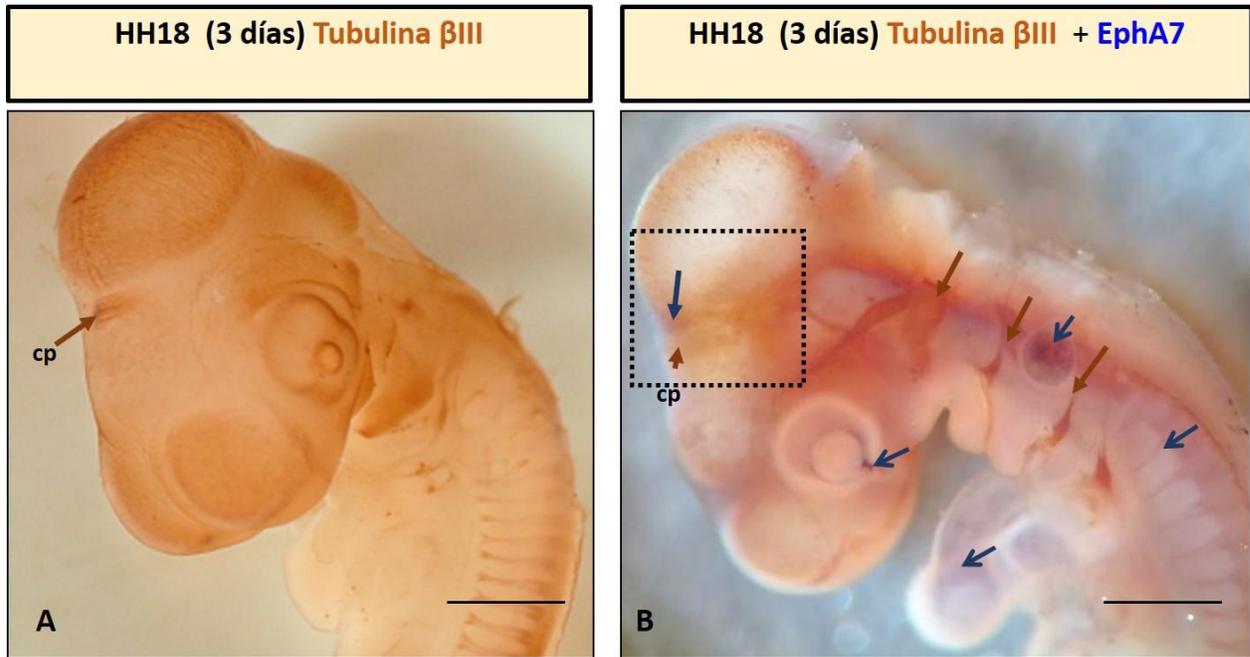


Figura 20: *Inmunohistoquímica en bloque para tubulina  $\beta$ III y EphA7 en embriones estadio HH18. A: tinción de tubulina  $\beta$ III mediante reacción DAB-peroxidasa (café), mostrando la cp como la primera comisura encefálica en ser formada. B: Inmunohistoquímica doble mostrando tubulina  $\beta$ III con reacción DAB-peroxidasa (flechas cafés) y EphA7 mediante reacción NTB/BCIP- fosfatasa alcalina (azul oscuro), esta última mostrando expresión en ojos, vesícula ótica, corazón, y espacios intersomitas (flechas azules), así como también expresión en el límite diencefálico-mesencefálico (flecha solida azul).*

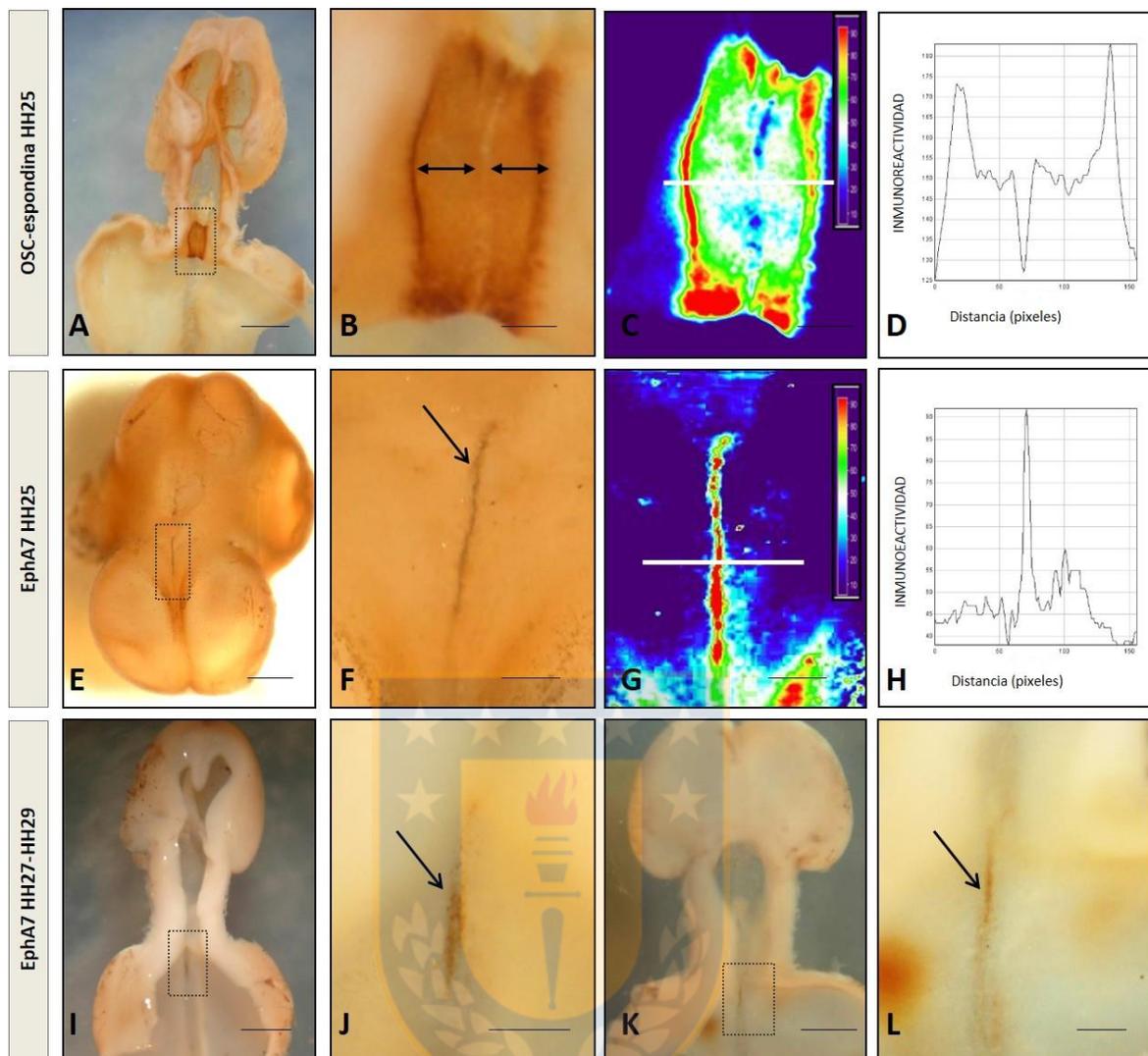


Figura 21: Patrón de expresión proteica de EphA7 y OSC-espondina en estadios tempranos de desarrollo. A-B, E-F: Inmunohistoquímica en bloque de cerebros de pollo en estadio HH25 para OSC-espondina (A-B) y EphA7 (E-F) mostrando el patrón de expresión complementario de ambas proteínas en la PTD (flechas en B y F). C-G: imágenes en pseudocolor de B y F mostrando el nivel de expresión de OSC-espondina y EphA7 respectivamente. La intensidad de inmunorreacción demarcada por la línea blanca en C y G fue analizada en D y H. I-J y K-L: inmunorreacción para EphA7 en estadios más avanzados de desarrollo (HH26 y HH28, respectivamente), mostrando que esta expresión se mantiene en el tiempo, pero con una menor intensidad (flechas en J y L). B, F, J y L: Magnificación del recuadro en A, E, I y K respectivamente. [Barras: A, E, I y K: 1 mm; B, C, F, G, J y L: 0.25 mm]

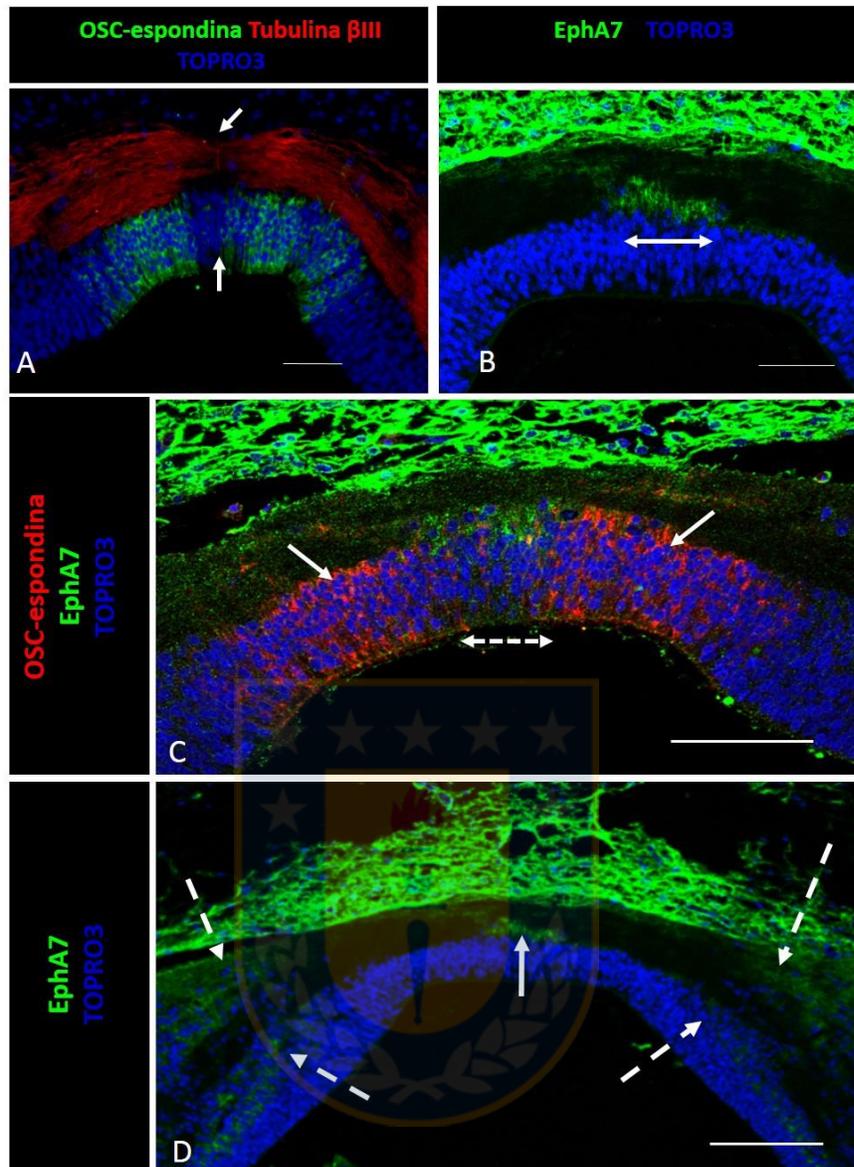


Figura 22: *Expresión de EphA7 y OSC-espondina en corte frontal de CoP en estadio HH30.* A: inmunohistoquímica con anti OSC-espondina (verde) mostrando su expresión en la placa del techo diencefálica lateral (PTDL) y anti tubulina  $\beta$ III (rojo) mostrando los axones de la cp y como en la línea media éstos se defasciulan y algunos giran al lado ipsilateral. B: inmunohistoquímica mostrando la expresión de EphA7 (verde) restringida a la placa del techo diencefálica medial (PTDM). C: se muestra la complementariedad en la expresión de OSC-espondina presente en la PTDL (flechas) y EphA7 ubicada en la PTDM (flechas dobles). D: inmunohistoquímica para EphA7 mostrando columnas laterales positivas en la placa alar de CoP (flechas discontinuas). [Barras: A, B y C: 50  $\mu$ m; D: 100  $\mu$ m]

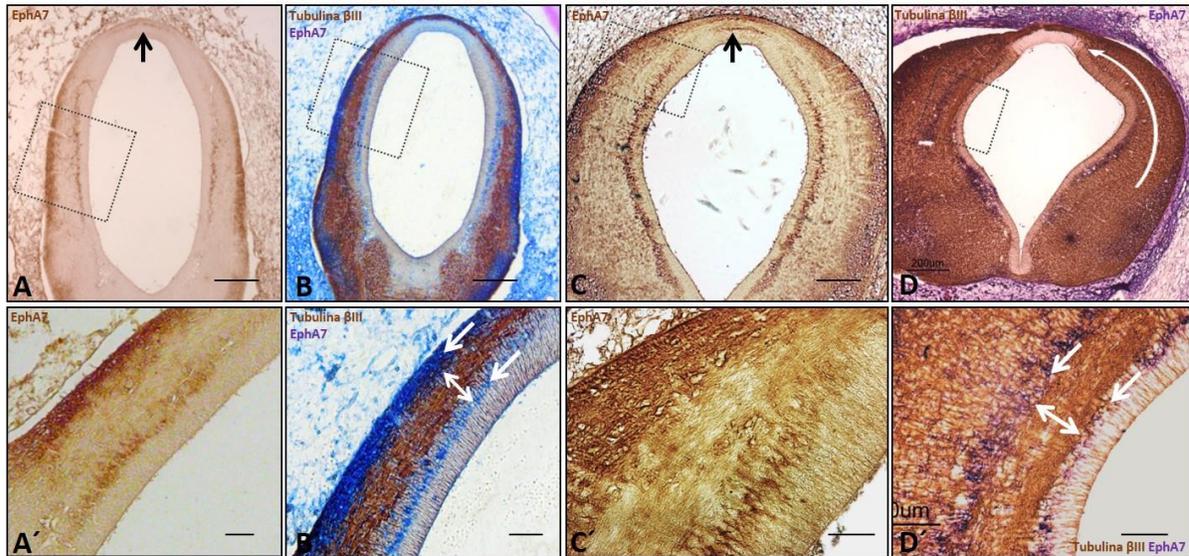


Figura 23: *Formación de corredores axonales delimitados por EphA7*. Cortes frontales de CoP en estadio HH24 (A-B) y HH30 (C-D) mostrando la expresión de EphA7 (A, C) y tubulina  $\beta$ III (B, D). En ambos estadios de desarrollo, EphA7 mantiene el mismo patrón de expresión en las células de la placa del techo diencefálica medial (flechas negras en A y C) y en las columnas observadas a través del eje ventro-dorsal que recorren las paredes diencefálicas (flechas blancas en C, D, A'-D'). Estas columnas delimitan corredores en donde los axones avanzan hacia la región dorsal (flecha doble en B' y D'). A'-D': magnificación de los recuadros en A-D. [Barras: A, B, C y D: 200  $\mu$ m; A', B', C' y D': 50  $\mu$ m]

### 3. Estudio de la expresión de los posibles ligandos para EphA7: efrina-A5 y efrina-A2

#### 3.1. Expresión de efrina-A5 en el prosómero 1

##### 3.1.1. Presencia de efrina-A5 en la región comisural pretectal (CoP) del prosómero 1

Para analizar la presencia de efrina-A5, uno de los posibles ligandos para EphA7, se procedió a la realización de PCR convencional en distintos estadios de desarrollo desde HH18 (3 días) hasta HH32 (7.5 días). El resultado demuestra la expresión del mensajero para efrina-A5 desde HH18 hasta al menos HH29 (6 días), estadios que comprenden el periodo de mayor crecimiento de la cp (Fig. 24 A).

##### 3.1.2. Identificación de efrina-A5 en cortes frontales de CoP y axones provenientes de núcleos pretectales

Tras observar la presencia del transcrito para efrina-A5 en la PTD mediante PCR, se procedió a localizar la proteína mediante inmunohistoquímica en cortes frontales de CoP en estadio HH27 (5 días) en donde se observó la presencia de efrina-A5 en las proyecciones axonales que viajan ventrodorsalmente por el estrato intermedio hasta llegar a la cp (Fig. 24 B flechas). Al analizar con detalle la zona dorsal de PTD, se puede ver con mayor claridad la presencia de efrina-A5 en los axones que confoman la cp (Fig. 24 C, flecha) que además se encontrarían en estrecho contacto con EphA7 en la PTDM (Fig. 24 E, flecha discontinua mostrando EphA7).

Con el fin de determinar la expresión de efrina-A5 en los axones y la localización de esta proteína en ellos, se realizó inmunocitoquímica en explantes de núcleos pretectales que presentaban crecimiento neurítico. Los resultados obtenidos muestran la presencia de esta proteína formando cúmulos a través del axoplasma (Fig. 25 B y C), así como también en el cono axónico, colocalizando con faloidina (flechas Fig. 25 D).

### 3.2. Determinación de la presencia de efrina-A2 en la región pretecal comisural (CoP)

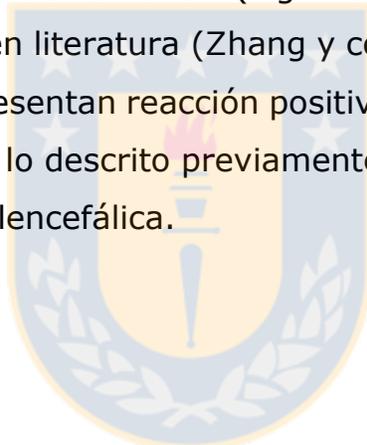
#### 3.2.1. Detección de ARN mensajero para efrinaA2

Se analizó la expresión de ARNm para efrinaA2 mediante PCR convencional, utilizando ADNc provenientes de la PTD y placa alar de CoP en distintos estadios de desarrollo entre HH18 (3 días) y HH29 (6 días). Los resultados muestran la presencia del transcrito en todos los estadios analizados (Fig. 26 I).

#### 3.2.2. Expresión de efrina-A2 en encéfalo de embriones durante distintos estadios de desarrollo

La localización del mensajero fue analizada en el tejido mediante hibridación *in situ* en embriones completos en distintos estadios de desarrollo (HH24-27). Los resultados demuestran un patrón de expresión específico para efrina-A2 que va modificándose a medida que avanza el desarrollo, pero que se encuentra restringido especialmente a la región dorsal del telencéfalo y diencefalo. En estadios tempranos de desarrollo, HH24 (4 días), se puede observar un gradiente rostro-caudal en la expresión del transcrito concentrándose en la zona más rostral del telencéfalo (Fig. 26 B, flechas continuas) para ir decayendo a medida que avanza caudalmente por esta región. Además de la expresión telencefálica podemos observar la presencia de este transcrito en la región de la línea media dorsal del diencefalo, en el tercio más caudal, donde se ubica la cp, coincidiendo en su expresión con la de EphA7 en la línea media y por lo tanto complementaria a la expresión de OSC-espondina ubicada en la PTDL (Fig. 26 B' flecha discontinua). El análisis de efrina-A2 en embriones HH25 (4,5 días) muestra la pérdida del gradiente rostro-caudal presentado anteriormente en el telencéfalo, sin embargo, la expresión del transcrito continua en esta región a través del eje rostro-caudal y con una mayor intensidad comparada con el estadio previo (Fig. 26 C, flechas continuas). La región diencefálica también presenta variaciones, en donde se

identifican dos franjas positivas paralelas a la línea media en la región dorsal del diencefalo, con mayor intensidad en la porción más rostral de este (Fig. 26 C' flecha discontinua). El patrón de expresión descrito en HH25, se mantiene en HH26 (4.5-5 días) en el telencefalo y diencefalo (Fig. 26 D), pero en este último la marca se prolonga hacia zonas más caudales, llegando hasta el prosómero 1 (Fig. 26 D' flecha discontinua). Durante el estadio HH27 (5 días) la expresión telencefálica se vuelve muy tenue (Fig. 26 E' flechas continuas), sin embargo, en el diencefalo se mantiene la expresión de las dos franjas paralelas a la línea media dorsal, las cuales se extienden hasta la región más caudal del diencefalo donde está comprendida la cp (Fig. 26 E' flechas discontinuas). En este estadio además se observa reacción en las extremidades superiores del embrión (Fig. 26 E flecha discontinua) lo que coincide con lo descrito en literatura (Zhang y cols., 1996). Además, todos los embriones analizados presentan reacción positiva en la retina (Fig. 26 B flecha blanca) concordante con lo descrito previamente (Takahashi y cols., 2003), al igual que la expresión telencefálica.



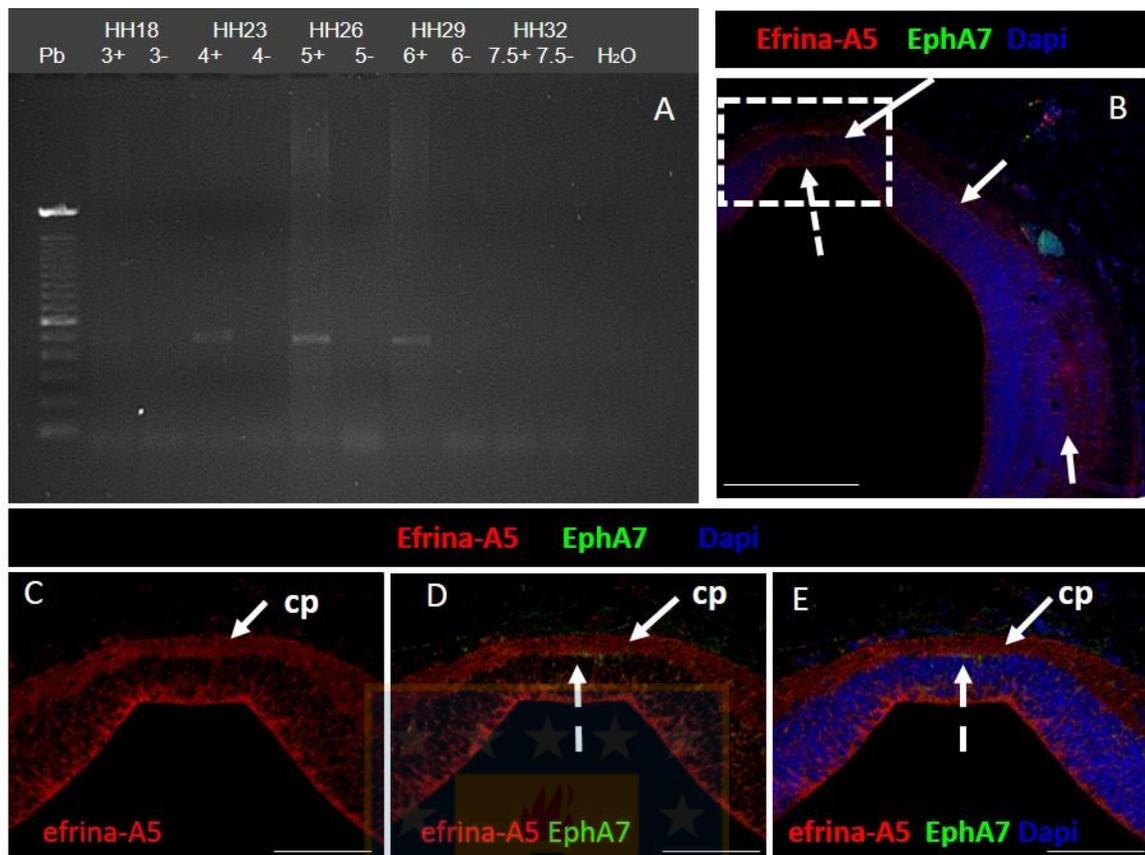


Figura 24: Análisis de la expresión de *efrina-A5* en el diencéfalo caudal. A: RT-PCR para *efrina-A5* utilizando muestras de PTD entre los estadios HH18-32 de desarrollo (tamaño de la banda esperado: 481 pb). B-E: inmunohistoquímica en corte frontal de CoP en estadio HH27 utilizando anticuerpo anti *efrina-A5* (rojo) y anti EphA7 (verde), junto con marcador nuclear dapi. B: corte frontal de CoP mostrando los fascículos axonales positivos para *efrina-A5* (rojo, flechas continuas) y la presencia de EphA7 en la PTDM (verde, flecha discontinua). C-E: imagen aumentada del recuadro en B. C: muestra la expresión en rojo de *efrina-A5* concentrada en los axones de la cp (flecha continua). D y E: axones positivos para *efrina-A5* en la cp (rojo, flecha continua) en contacto con EphA7 en la PTDM (flecha discontinua). [Barras: en B, 200  $\mu$ m; C-E, 100  $\mu$ m]

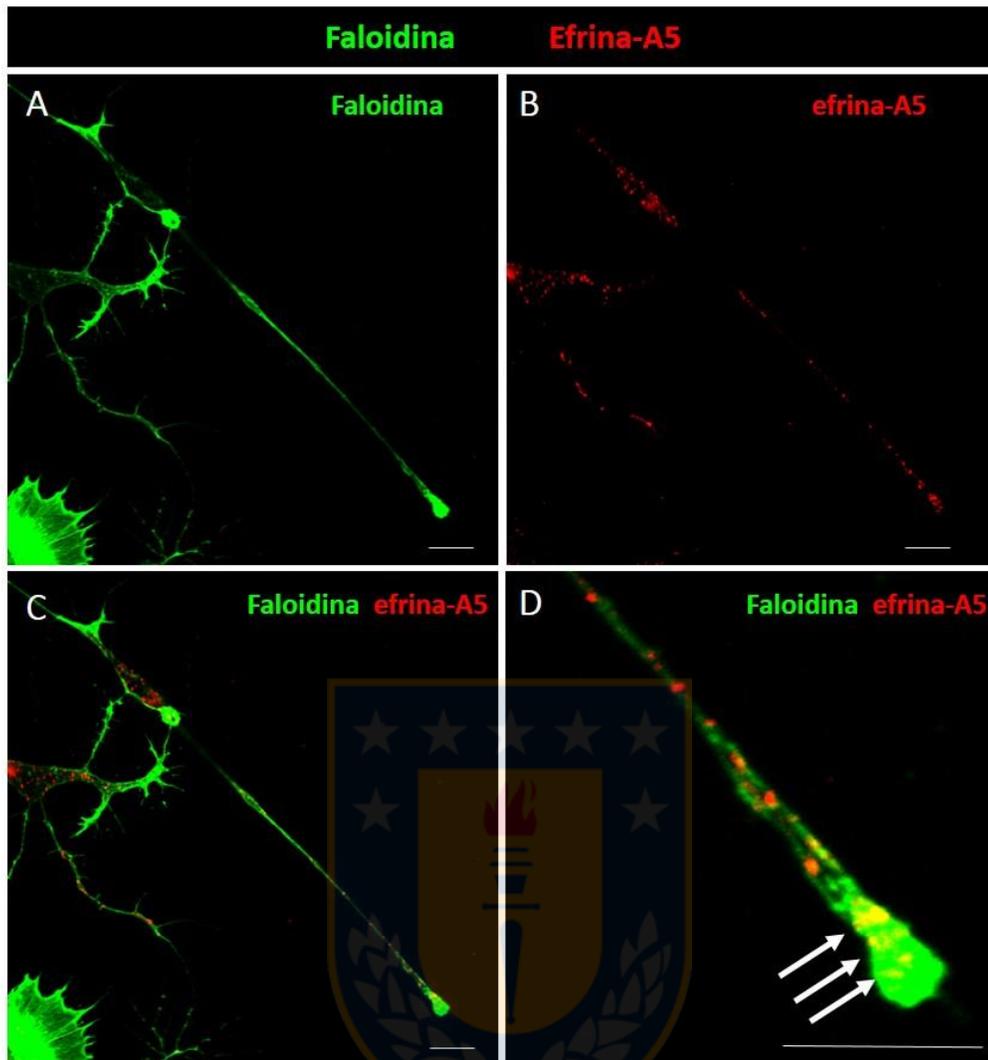


Figura 25: *Expresión de efrina-A5 en axones provenientes de núcleos pretectales.* A-D: axones creciendo desde cultivo de explantes de núcleos pretectales marcados con tinción para filamentos de actina (faloidina, verde) y anti efrina- A5 (rojo). A: proyección axonal marcada con faloidina (verde). B: muestra la presencia de efrina-A5 en la zona ocupada por la proyección axonal, observado en C como cúmulos distribuidos en el axoplasma y analizado con mayor detalle en D, donde se observan agrupaciones de esta proteína en el cono axónico (flechas). [Barras en A, B, C y D: 10  $\mu$ m]

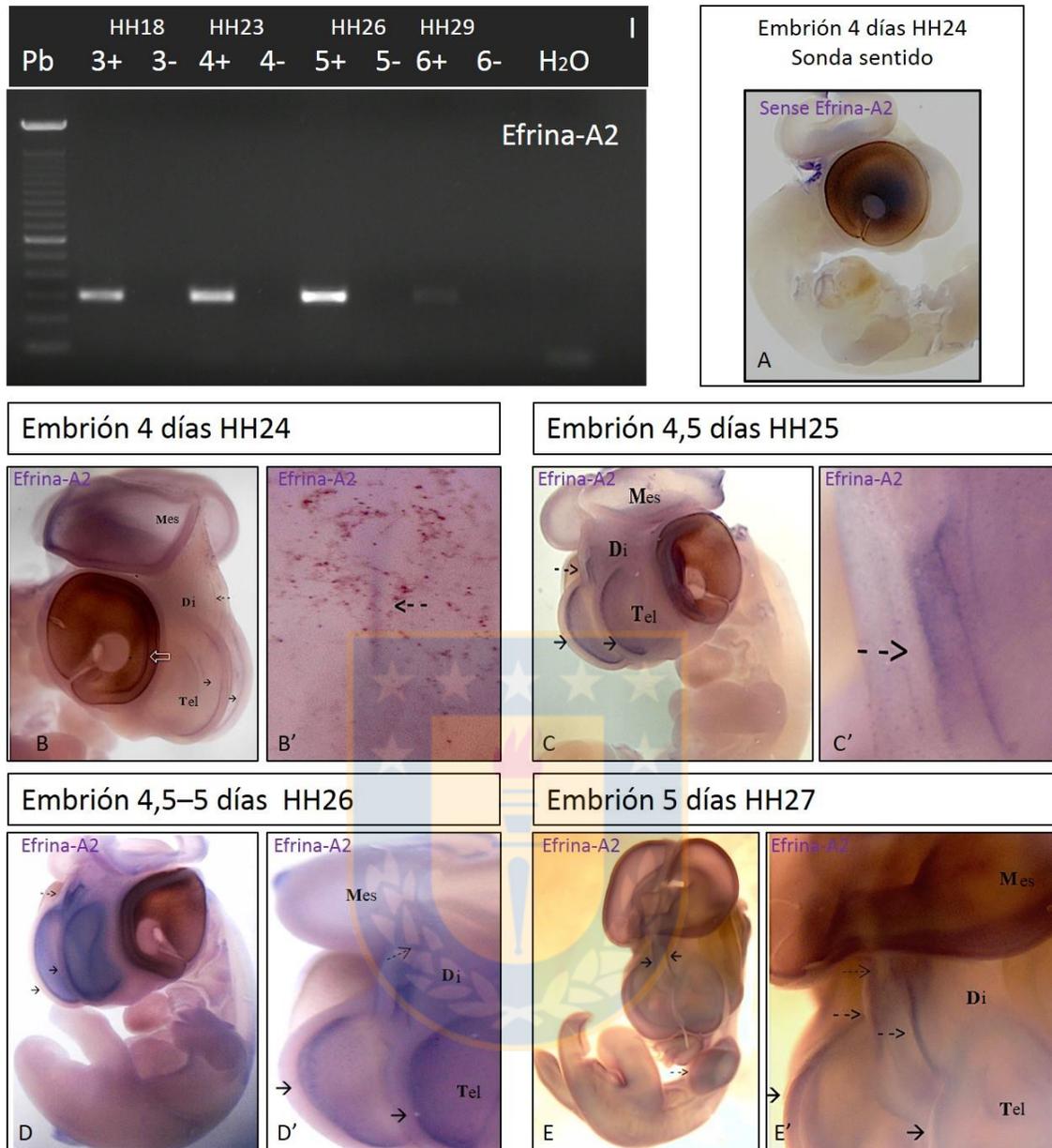


Figura 26: *Expresión de efrina-A2 en el encéfalo durante distintos estadios de desarrollo.* I: PCR para efrina-A2 utilizando muestras de PTD provenientes de embriones entre los estadios HH18-29 (banda: 291 pb). A-E y B'-E': hibridación en bloque con sonda sentido y antisentido a través de distintos estadios de desarrollo HH24-HH27 (4-5 días). A: embrión de 4 días tratado con sonda sentido mostrando que no hay reacción específica. B: embrión de 4 días (HH24) tratado con sonda antisentido mostrando marcaje positivo en forma de gradiente en el telencéfalo (flechas continuas), en la línea media dorsal diencefálica (flechas discontinuas) y en la retina (flecha blanca). B': imagen aumentada del diencefalo en B mostrando la

expresión positiva en la línea media dorsal (flecha discontinua). C: embrión de 4,5 días tratado con sonda antisentido mostrando variaciones en la expresión con una distribución uniforme en el telencéfalo (flechas continuas) y cambios en el patrón diencefálico, mostrando dos franjas paralelas a la línea media dorsal (flechas discontinuas). C': imagen aumentada del diencefalo en C mostrando las franjas paralelas a la línea media dorsal (flecha discontinua). D: embrión de estadio HH26 mostrando la mantención en el patrón de expresión telencefálica y diencefálica. D': imagen aumentada del diencefalo en D (flecha discontinua). E: embrión estadio HH27 mostrando una disminución en la expresión del transcrito para efrina-A2 en la región telencefálica, pero la mantención e incluso proyección de las franjas paralelas a la línea media hacia el diencefalo mas caudal (flechas continuas), además de la expresión positiva en las extremidades superiores (flecha discontinua). E': imagen aumentada del diencefalo en E mostrando la prolongación de la expresión del transcrito de efrina-A2 a la región más caudal del diencefalo dorsal (flechas discontinuas).



#### 4. Ensayos de funcionalidad de EphA7

##### 4.1. Efecto *in vitro* de EphA7 mediante ensayos de bandas

Para analizar el efecto de EphA7 sobre los axones provenientes de los núcleos pretectales se llevaron a cabo ensayos de preferencia, que consisten en sembrar explantes o células en un sustrato compuesto por una alternancia de bandas. En este caso, se usaron combinaciones diferentes entre la quimera formada por EphA7 unida a la región Fc de IgG humana alternando con el fragmento Fc de IgG humana. Para esto, primero fue necesario realizar la agrupación de la quimera utilizando un anticuerpo anti-Fc para asegurar el efecto biológico de EphA7. La formación de la agrupación proteica fue analizada mediante un gel de poli-acrilamida nativo (no denaturante), en donde se observó la diferencia en la migración entre los agregados formados y cada elemento por sí solo.

Para lograr individualizar las bandas con los distintos sustratos, se añadieron microesferas fluorescentes a uno de los 2 sustratos a utilizar. Luego, para la realización del estudio se diseñaron 4 tipos de experimentos. Como control de la técnica se usó Fc en ambos sustratos con y sin microesferas (Fig. 27 A) y EphA7 en ambos sustratos con y sin microesferas (Fig. 27 B). Los ensayos funcionales consistieron en EphA7 versus Fc, añadiendo las microesferas a EphA7 (Fig. 27 C) o a Fc (Fig. 27 D). Los resultados mostraron un efecto mecánico/físico de las microesferas, el cual condiciona el comportamiento de los axones independientemente del componente molecular, de tal forma que los axones se ven repelidos por aquellas bandas que presentan microesferas. De esta forma, al analizar los valores del área de crecimiento axonal en Fc vs Fc se puede observar que el área de axones es 10% mayor en el carril sin microesferas (promedio = 0.64 y 0.54 respectivamente; Fig. 27 E). Sin embargo, el área axonal también se ve influida por la presencia de EphA7, de tal forma que si la banda con microesferas contiene además EphA7 se genera mayor repulsión sobre los

axones, aunque el resultado no llega a ser estadísticamente significativo (resultado de ANOVA unidireccional los valores de p y F son muy altos;  $p=0.33$ ,  $F=1.21$ ).

Con la finalidad de determinar si el efecto era realmente causado por la presencia de microesferas se procedió a añadir IgG Cy3 en uno de los sustratos para crear las bandas, ambos métodos han sido descritos en literatura para el estudio de preferencia (Walter y cols., 1987; Kantor y cols., 2004; Knoll y cols., 2007). El análisis de las distintas condiciones mostró un efecto similar al de las microesferas, en donde los axones preferían crecer en las bandas no fluorescentes (datos no mostrados). Estos resultados nos indican que el efecto biológico de EphA7 no se puede desprender dentro de este tipo de estudio.

#### 4.2. Estudios *in vivo*: Inhibición mediante la inyección de morfolino contra EphA7

Los estudios mediante la inyección al tubo neural de morfolino contra EphA7 entre los estadios HH10-HH14 y posterior electroporación en la zona diencefálica mostraron patrones de inhibición heterogéneos. Primero, se observa que los animales inyectados entre HH13-HH14 y analizados en estadio HH27 (Fig. 28) ( $n=6$ ), muestran un cambio morfológico característico, denotando una disminución en el grosor de la capa de células neuroepiteliales en la PTD, de la CoD1 (Fig. 28 A-D, flechas discontinuas) y una disminución en el grosor de la comisura en relación al control (Fig. 28 A-D, flechas continuas y gráfico en III). La inhibición de EphA7 se da principalmente en las columnas laterales presentes entre la placa basal y alar, y en menor medida en la PTDM (Fig. 28, B''-D'' flechas y recuadros), mientras que no se altera su expresión en el mesénquima (Fig. 28 B''-D'', punta de flecha). La expresión de OSC-espondina también se ve afectada, abarcando una superficie mayor de la PTD y expresándose además en la línea media, la cual en condiciones normales expresa EphA7 pero no OSC-espondina (Fig. 28 B'-D', flechas). El marcaje con

NCAM muestra una disminución en la cantidad de fascículos axonales y en la localización de estos (Fig. 28 B'''-D''', flechas continuas), estando presentes solamente en la zona más ventricular del estrato intermedio en vez de localizarse a través de toda esta zona hasta llegar al estrato superficial (Su) como se observa en el animal control (Fig. 28 A''', flechas continuas). Además, podemos observar que la cantidad de axones en la cp es considerablemente menor a las observadas en el control (Fig. 28 B'''-D''', flechas discontinuas en comparación con A''').

Al analizar la morfología de los animales fijados en HH31 (Fig. 29) se pudo observar un alto grado de malformación a nivel macro (n=4), pudiendo identificar atrofia en el desarrollo de uno de los ojos (Fig. 29 A', flecha) y torsión del encéfalo afectando principalmente al telencéfalo y diencéfalo (Fig. 29 A', llave). Al analizar a nivel microscópico estos animales en cortes frontales se identifica un alto grado de malformación a nivel de la mitad dorsal mostrando: 1) pérdida de la simetría bilateral (Fig. 29 B, llaves); 2) Marcaje de OSC-espondina desplazado del eje medial hacia regiones más alares (Fig. 29 C, flechas); 3) axones orientados aberrantemente (Fig. 29 D, flechas) de acuerdo al contexto general (se observan fascículos con orientación sagital a pesar que los distintos elementos, incluido el primordio de la hipófisis en B señalado con flecha, indican que el corte es frontal); 4) inhibición total de EphA7 en el parénquima neuronal permaneciendo solo la expresión en el mesénquima circundante (Fig. 29 E, flechas).

Las características anteriormente descritas se observan en mayor o menor grado en todos los animales inhibidos y analizados en estadio HH31 (Fig. 30 A-D). Los resultados obtenidos muestran concordantemente que la morfología general de la PTD cambia, lo que lleva a la pérdida de la simetría en la zona; sin embargo la región ventral aparentemente no se ve afectada (Fig. 30 B-D). Como marcador de la PTD se utilizó anticuerpo anti OSC-espondina, el cual en todos los casos muestra un desplazamiento a regiones alares de acuerdo al eje que correspondería a la línea media (Fig. 30 B'-D',

flechas). Además, se observa la pérdida de EphA7 en las columnas laterales y la PTD, indicando la inhibición total de la proteína en el parénquima neuronal, pero no así en el mesénquima circundante (Fig. 30 B''-D'', puntas de flecha), también se observa un cambio en el comportamiento axonal en relación al animal control, mostrando una pérdida en la direccionalidad de los axones, donde los fascículos longitudinales en el eje ventro-dorsal encontrados en el control modifican su trayectoria hacia una céfalo-caudal, tomando forma de ovillos (Fig. 30 B'''-D''', flechas; con mayor detalle en los paquetes axonales indicados en Fig. 30 b'-d', flechas continuas). Además, en todos los casos analizados encontramos ausencia de cp (Fig. 30 b-d).



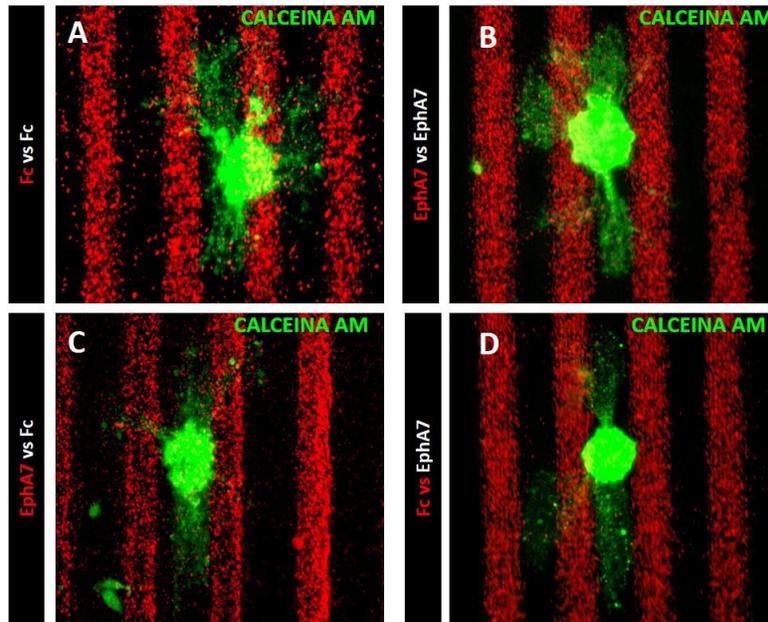


Figura 27: Estudio del efecto mecánico de microesferas sobre axones provenientes de núcleos pretectales en presencia de EphA7 bajo distintas situaciones experimentales. A-D, imágenes de los explantes en las distintas condiciones y la correspondiente distribución de los axones. E, gráfica del área axonal (%) en cada una de las condiciones, en verde área de los axones que no crecen en la región de las microesferas con fluorescencia roja; en rojo, área de axones que crecen en las microesferas, valores normalizados a porcentaje total, presentando la desviación estándar de cada medición y la significancia estadística. [(\*)  $\leq 0.05$ , significativo; (\*\*)  $\leq 0.01$  altamente significativo; (\*\*\*)  $\leq 0.001$  sumamente significativo; Barras: 100  $\mu\text{m}$ ]

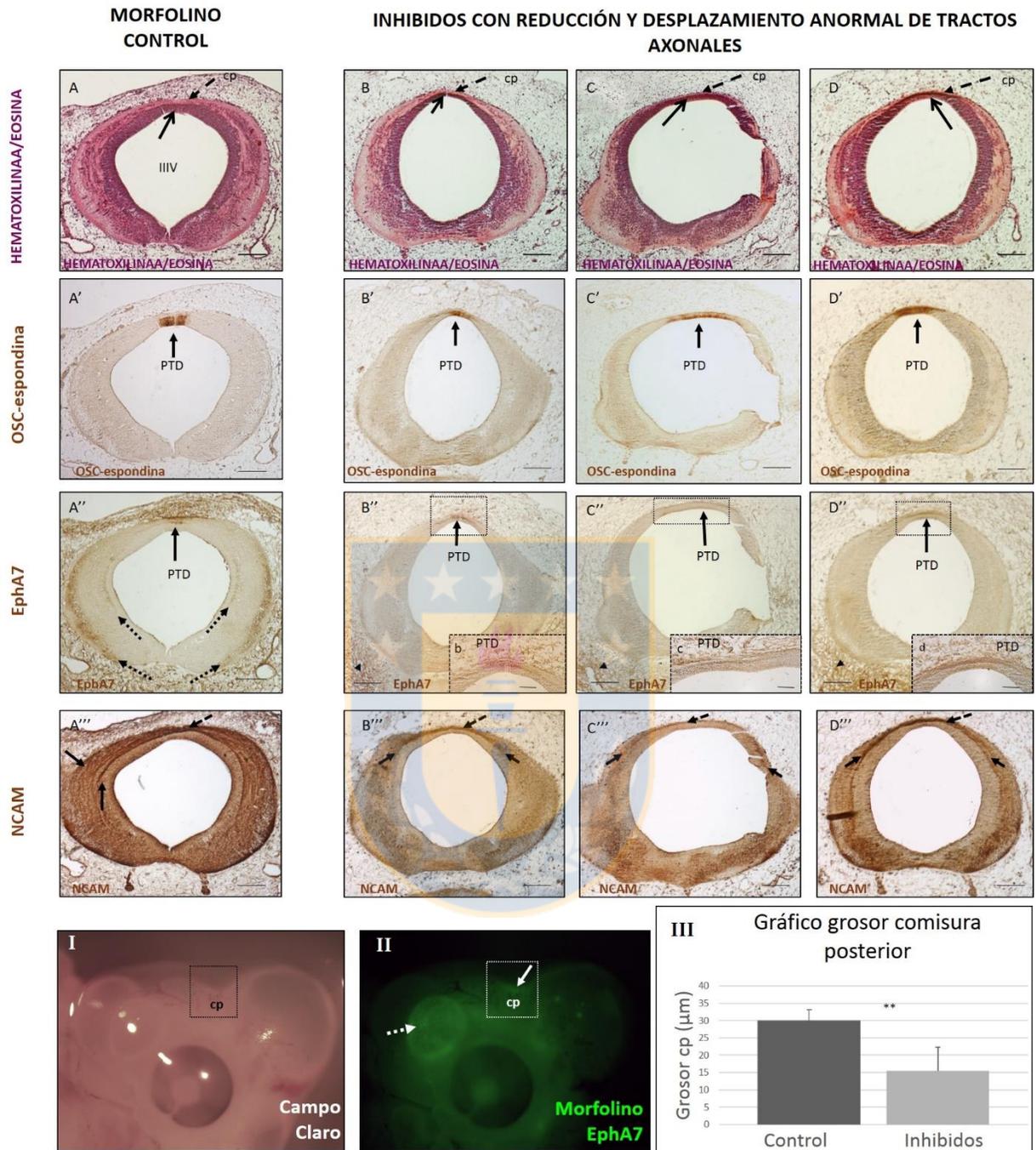


Figura 28: *Inhibición in vivo con morfolino contra EphA7 y posterior análisis en estadio HH27: reducción y desplazamiento anormal de los tractos axonales. A-A''': animal inyectado con morfolino control. B-B''', C-C''' y D-D''': cortes frontales de animales inhibidos con morfolino para EphA7. A'-D': marcaje con anticuerpo contra OSC-espondina, mostrando la expresión de esta proteína en la PTD en animal control e inhibidos. A''-D''-F'': Marcaje con anticuerpo anti EphA7 mostrando la inhibición de*

las columnas laterales, y en menor medida en la PTD (flechas) en relación al control. b-d: imagen aumentada de recuadro en B''-D''. A'''-D''': marcaje con anticuerpo anti NCAM mostrando la disminución en los fascículos axonales y en el grosor de la cp en comparación al control. I y II: embrión electroporado con morfolino contra EphA7 mostrando el área de estudio (cp, recuadro punteado en ambas imágenes) y la zona correctamente electroporada bajo flecha en II, flecha punteada en II muestra marca en telencéfalo. III: Cuantificación del efecto de la inhibición (n=6) sobre el grosor de la cp en comparación a animales control (n=3). [Barras: A-A''', B-B''', C-C''' Y D-D''', 200  $\mu\text{m}$ ; en b-d, 100  $\mu\text{m}$ ; (\*\*) $\leq 0.01$  altamente significativo; Barras: 100  $\mu\text{m}$ ].



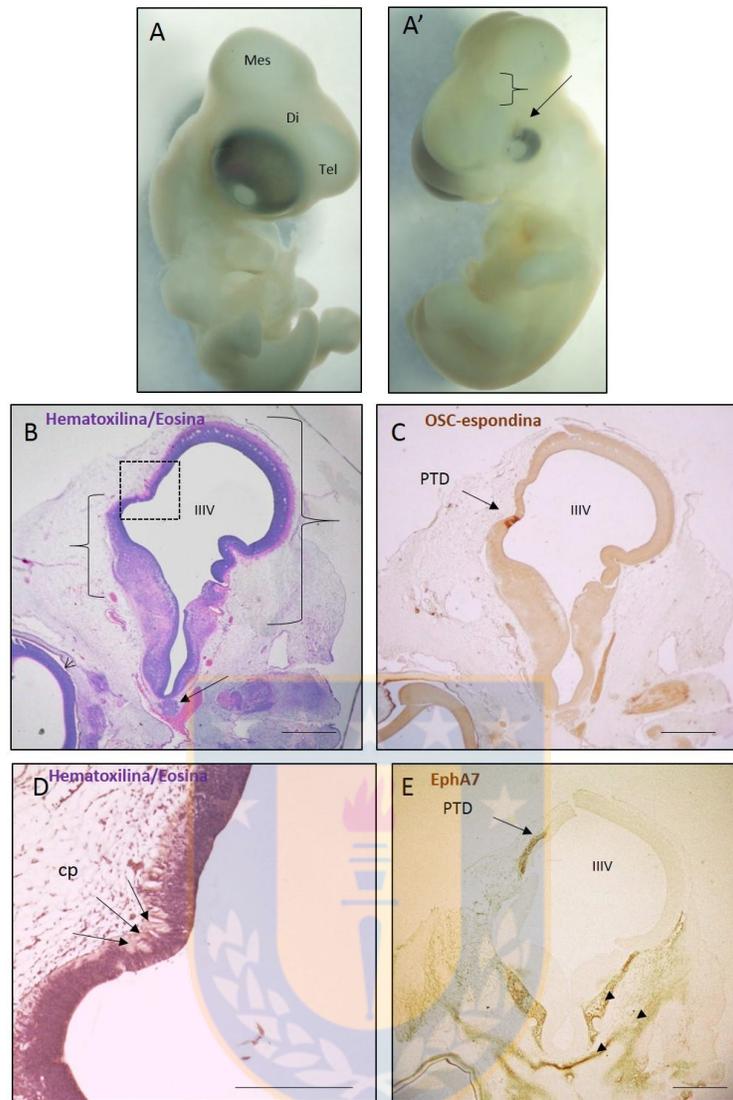


Figura 29: *Inhibición de EphA7 induce un alto grado de malformación cefálica en los embriones.* A-A': animal inyectado con morfolino contra EphA7 mostrando ambos lados del embrión y evidenciando malformaciones a nivel cefálico (en A' llave y flecha). B-E: cortes de embrión con malformación tras la inhibición con morfolino contra EphA7. B y D: hematoxilina/eosina del área correspondiente a CoP, mostrando elementos como el primordio de la hipófisis (en B, flechas) indicando la frontalidad del corte y en E la orientación aberrante de los fascículos axonales. C: inmunohistoquímica con anti-OSC-espondina, mostrando el desplazamiento de la marca a regiones más alares (flecha). E: marcaje con anti-EphA7 mostrando inhibición completa de EphA7 en el parénquima neuronal pero no así en el mesénquima circundante (flechas y puntas de flecha). [Barras: B-D, 200  $\mu\text{m}$ ; E, 100  $\mu\text{m}$ ]



Figura 30: *Inhibición in vivo de EphA7 con morfolino y posterior análisis en estadio HH31: pérdida de la simetría bilateral y de la trayectoria axonal. A-A''' y a-a'*: animal inyectado con morfolino control mostrando una morfología normal (A) y expresión de marcadores OSC-espondina (A'), EphA7 (A'') y NCAM normales (A''', a-a'). B-B''', C-C''' y D-D''': animales inhibidos con morfolino contra EphA7, evidenciando la

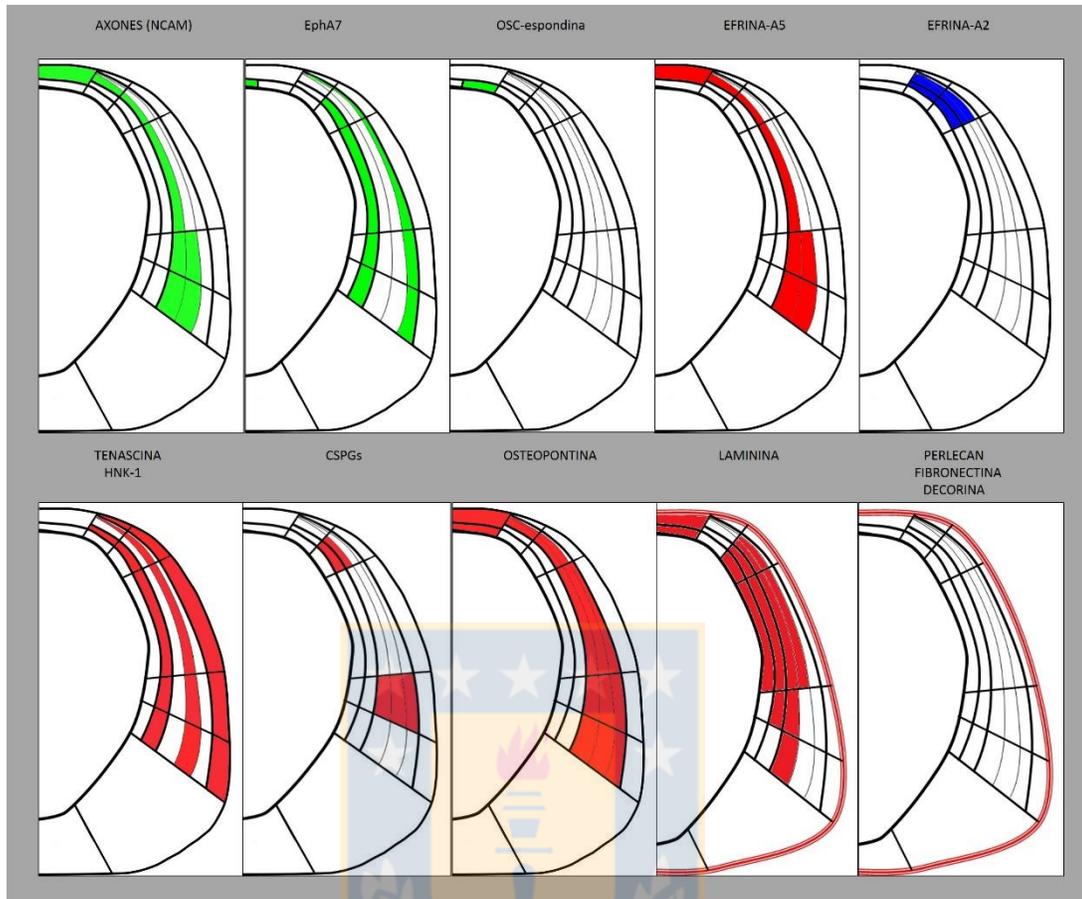
movilización de la PTD a través del marcaje con anticuerpo contra OSC-espondina(B'-D'), junto con inhibición total de EphA7 en el parénquima neuronal al realizar inmunohistoquímica con anti-EphA7 (B''-D'') y cambio en la trayectoria axonal y la cp al analizarlo con anticuerpo contra NCAM (B'''-D'''). a-d, a'-d': imágenes aumentadas de los fascículos axonales en forma de ovillos en A'''-D'''. [Barras: A-A''', B-B''', C-C''' y D-D''', 200  $\mu$ m; a-d y a'-d', 100  $\mu$ m]



Finalmente presentamos un esquema con el patrón de expresión de las distintas moléculas estudiadas durante el desarrollo de la comisura posterior. Los axones que formarán parte de esta estructura crecen a través del eje ventro-dorsal en un ambiente rico en moléculas de matriz extracelular, avanzando por zonas positivas para proteínas como osteopontina y laminina, y siendo delimitadas por barreras en forma de columnas positivas para tenascina y HNK-1. A su vez, se logró determinar la presencia de moléculas de guía axonal como EphA7, presente en forma de columnas a través de todo el eje ventro-dorsal en donde axones positivos para efrina-A5 avanzan hasta la PTD, y la presencia de efrina-A2 en CoD.

Al llegar a la PTD, los axones positivos para efrina-A5 y NCAM siguen avanzando sobre un sustrato rico en osteopontina y laminina, mientras interaccionan con la PTDL positiva para OSC-espondina para luego decidir si cruzar o no la línea media al enfrentarse a EphA7.





**Figura 31: Esquema resumen mostrando patrones de expresión de las distintas moléculas en el parénquima y en los axones que forman la cp entre el día 5 y 6 de desarrollo.**

## DISCUSIÓN

En los organismos que poseen simetría bilateral, el establecimiento de circuitos neuronales que interconecten ambos lados del SNC es indispensable para integrar la información recibida desde el exterior y la posterior generación de una respuesta. Esta interconexión está conformada por las llamadas comisuras, tractos axonales que atraviesan la línea media guiados por moléculas presentes en la matriz extracelular o en la membrana de células vecinas. Para que se establezcan las conexiones neuronales adecuadas los axones comisurales por lo tanto deben extenderse desde el lugar donde se encuentra el soma neuronal hasta la línea media, atravesar dicha línea y viajar hasta su contraparte sináptica contralateral. Durante este viaje los axones se van encontrando de forma secuencial con diversas moléculas cuyo efecto será dependiente de los receptores presentes en la superficie axonal.

Dentro de las comisuras cerebrales, la formación de la comisura posterior ha sido una de las menos estudiadas. Se ha descrito su participación en la coordinación ocular, y en animales no mamíferos, que carecen de cuerpo calloso, suple parte de las funciones de dicha comisura. Trabajos previos del laboratorio señalaron la presencia de OSC-espondina en la placa del techo que atraviesan los axones de la cp, y su efecto en la fasciculación y crecimiento axonal, así como la ausencia de esta proteína en la línea media central, justo donde algunos axones giran hacia el lado ipsilateral. Sin embargo, la guía de estos axones desde el lugar donde se encuentra el soma hasta la placa del techo, y las moléculas que le permiten al axón decidir si siguen hacia el lado contralateral o ipsilateral no estaban descritas, y son la pregunta de la presente tesis.

En este trabajo de tesis nos enfocamos en las moléculas responsables de guiar a los axones que conforman la comisura posterior, específicamente en dilucidar las moléculas de la familia de las efrinas/Eph así como de los componentes de la matriz extracelular implicados en la guía de dichos axones.

## Miembros de la familia de las Eph/efrinas expresadas durante el desarrollo de la cp

Dentro de las moléculas clásicas de guía axonal ya identificadas transcripcionalmente con anterioridad, se encontró a EphA7 presente desde estadios tempranos de desarrollo en el prosómero 1 (Marín y cols., 2001; Baker y cols., 2003, García-calero y cols., 2006; Halilagic y cols., 2007). Con el fin de estudiar la posible relación de esta molécula con la formación de la cp se realizó hibridación *in situ* para EphA7 en cortes transversales de estadio HH27 mostrando que este transcrito estaba siendo expresado por células ubicadas en la región medial de la PTD, con un patrón complementario al descrito previamente para OSC-espondina (Caprile y cols., 2009; Stanic y cols, 2010). Esto también se evidenció a nivel proteico en donde análisis inmunohistoquímico en embriones completos demostró la complementariedad en la expresión de ambas proteínas, presentando a OSC-espondina en las regiones lateral de la placa del techo diencefálica y a EphA7 en la región medial, PTDL y PTDM respectivamente. La expresión de EphA7 además se vio prolongada en el tiempo desde HH17 hasta al menos HH31. Sin embargo, la inmunorreactividad disminuye a medida que avanza durante el desarrollo, coincidiendo con la disminución en el crecimiento de la cp (Stanic y cols., 2014). La presencia de EphA7 en la PTDM indicaría un posible rol como blanco intermedio ayudando a decidir a los axones si cruzar o no cruzar este punto o bien para impedir que estos vuelvan a recuzar la línea media. La participación de receptores tipo Eph en la toma de decisión si cruzar o no la línea media ha sido descrita con anterioridad en distintos sistemas tales como en los axones corticoespinales (Kullander y cols., 2001), en la comisura anterior (Henkenmeyer y cols., 1996), en axones contralaterales eferentes del oído interno (Cowan y cols., 2000) y en el quiasma óptico (Williams y cols., 2003).

Los estudios de expresión proteica para EphA7, también demostraron que ésta presentaba un patrón específico en las regiones laterales,

expresándose desde la placa basal hasta el límite de la placa alar con la PTD, formando columnas que enmarcan el paso de los axones (Stanic y cols., 2014). El hecho de que una molécula de guía axonal se exprese en forma de columnas no había sido descrito con anterioridad, ya que la expresión de las proteínas pertenecientes a la familia Eph-efrinas es principalmente en gradiente (Drescher y Cols., 1995; Connor y Cols., 1998; Scalia y Cols., 2009, Kozulin y Cols., 2009; Triplett y Feldheim., 2012). Sin embargo, este tipo de organización si ha sido descrita para moléculas de MEC, donde principalmente funcionan como sustratos permisivos o restrictivos para el paso de los axones, creando verdaderas “carreteras” durante el desarrollo del SN y en procesos de regeneración nerviosa (Silver y Miller, 2004; Faissner y Cols., 2006; Barros y Cols., 2011; Chiquet y Tucker, 2011; revisado en Brown, 2011). Esta idea se complementa debido a la presencia de los axones entre las columnas observadas, por lo cual existe la posibilidad de que *in vivo* EphA7 esté delimitando un camino a través del eje ventro-dorsal por el cual guiar a los axones hacia la placa del techo diencefálica. Por lo tanto, y de acuerdo al patrón de expresión encontrado para EphA7 la trayectoria de estos axones puede ser dividida en tres etapas: (1) Avance desde la región ventral hasta la placa del techo; (2) fasciculación en la PTDL; y (3) decisión en la línea media dorsal de seguir ipsilateralmente o continuar hacia el lado opuesto.

Sin embargo, para que EphA7 ejerza su función es necesario que interactúe con ligandos específicos presentes en la membrana de los axones (efrinas-A). La presencia de algunas efrinas miembros de la subclase A en el prosómero 1 ha sido descrita en literatura. Marín y cols. (2001) mostró la expresión de efrina-A2 y efrina-A5 en la región pretectal, con una expresión gradual desde la placa basal hasta la placa del techo diencefálica y con una alta concentración en los núcleos precomisurales principales. Estos antecedentes y la descripción en la interacción de estas dos moléculas con EphA7 en otros sistemas (Baker y Antin, 2003; Park y cols, 2013; Clifford y cols., 2014) nos llevaron a estudiar si efrina-A2 y -A5 estaban presentes en

los axones que viajan ventro-dorsalmente a formar la cp. Los resultados obtenidos en este estudio demuestran que ambas efrinas-As están presentes en el prosómero 1, efrina-A2 muestra un patrón que varía espacio-temporalmente desde la región medial cefálica del diencéfalo dorsal en estadio HH24 hasta formar dos franjas laterales delimitando la zona medial diencefálica que se extiende desde regiones más cefálicas hasta el diencéfalo caudal a través de los estadios HH25-HH27. Esta expresión no se observa en los axones, sino que en las células ependimales por lo que no estaría interaccionando con EphA7 en trans y generando la respuesta de los axones a este receptor. Sin embargo, efrina-A5 si se encuentra en los axones que viajan ventro-dorsalmente hasta formar la comisura posterior en el preteectum comisural lo que indicaría una posible interacción entre EphA7 y la efrina-A5 presente en los axones.

El efecto de EphA7 sobre los axones ha sido descrito principalmente como repulsivo, sin embargo, existe evidencia que también puede promover la adhesión celular, permitiendo que axones en crecimiento logren avanzar por lugares que normalmente generarían repulsión y bajo ciertas circunstancias promover el crecimiento axonal (Rashid y cols., 2005; Lim y cols., 2008; Holmberg y cols., 2000; Chai y cols., 2014; Tai y Kromer., 2014). Para entender como funcionarían estas posibles interacciones nos evocamos a sistemas ya descritos en el desarrollo embrionario como la formación del eje retino-tectal/colicular. En este sistema, las células retinales ganglionares nasales (CRGn) que expresan altos niveles de efrina-A5 interaccionan con EphA7 en la región anterior del tectum óptico/colículo superior (TO/CS) generando repulsión de estos axones hacia la zona posterior del colículo donde EphA7 está menos concentrado (Rashid y Cols., 2005). A su vez efrina-A5 necesita de un co-receptor para poder generar la cascada de señalización intracelular que dará paso a la respuesta, se ha visto que p75 co-inmunoprecipita con efrina-A5 y es necesario para la inducción de la fosforilación mediada por EphA7 *in vitro* (Lim y Cols., 2008). Nuestros

resultados revelan la expresión de efrina-A5 en los axones que recorren el eje ventro-dorsal hacia la cp en el pretectum comisural. Estos axones viajarían por los corredores delimitados por células positivas para EphA7, en donde los fascículos axonales estarían en contacto con la superficie de los corredores produciendo repulsión ellos, lo cual promovería el crecimiento a través de estos túneles a lo largo del eje ventro-dorsal.

Nuestros experimentos también mostraron la presencia del transcrito para efrina-A2 en la placa alar; sin embargo, este no estaría presente en los axones sino que aparentemente en las células del parénquima. Cabe mencionar que en el mismo sistema retino-tectal, se ha descrito que efrina-A2 junto con efrina-A5 expresados en el parénquima del TO, están repeliendo los axones temporales (CRGt) cuando se encuentran en altas concentraciones y a su vez participando en la promoción del crecimiento de los axones nasales (CRGn) cuando se encuentran en bajas concentraciones (Nakamoto y cols., 1996; Monschau y cols., 1997; Feldeheim y cols., 1998; Hansen y Cols., 2004). Además, efrina-A2 y EphA7 participan en conjunto en la guía de los axones retinales en el TO/CS. Efrina-A2 (posterior) presenta un gradiente opuesto al de EphA7 (anterior) en el CS, por lo que se postula que al ir disminuyendo el efecto de EphA7, el aumento de la concentración de efrina-A2 en el parénquima impulsa a los axones a llegar hasta la región posterior de este (Rashid y cols., 2005). El mecanismo exacto por el cual efrina-A2 pasa de un efecto repulsivo a uno atractivo aún no está claro, aunque se postula que la respuesta de los axones retinales (CRG) depende de variaciones pequeñas en la concentración de receptores tipo EphA en la membrana. De los distintos EphA que han sido detectados en las CRG, EphA3 es el único que presenta un gradiente témporo-nasal que genera variaciones discretas de este receptor en la membrana. Cuando este receptor en su forma truncada es expresado ectópicamente en un subgrupo de CRGt, genera un cambio en la trayectoria axonal haciendo que estas se proyecten hacia regiones del tectum posterior (Cheng y cols., 1995; Feldheim y cols., 2000; Hansen y cols., 2004;

Feldheim y O' leary, 2010). Por lo tanto, se ha postulado que EphA3 en altas concentraciones es repelido por efrina-A2 pero en bajas concentraciones es atraído por esta. A raíz de lo presentado, además de la expresión del transcrito para EphA3 en la región más caudal del diencefalo con una intensidad de reacción al parecer mayor en la zona ventral en estadio HH23 (Geisha data base), postulamos que este podría ser un posible receptor para que efrina-A2 ejerza su función posiblemente atrayendo a los axones que se mueven en el eje ventro-dorsal.

En resumen, creemos que EphA7 estaría interactuando directamente con efrina-A5 en trans generando repulsión sobre los axones y que efrina-A2 estaría interaccionando probablemente con EphA3 de alguna manera similar a la propuesta sobre los axones retinales que son atraídos finalmente a la región posterior del tectum.

Con el fin de estudiar el efecto directo que EphA7 tendría sobre los axones comisurales nos planteamos realizar ensayos de preferencia con bandas en donde cultivamos explantes provenientes de núcleos pretectales bajo distintas condiciones en presencia y ausencia de EphA7. Sin embargo, y a pesar de que se observó una tendencia a generar una repulsión sobre los axones por parte de EphA7 en los ensayos con microesferas, no pudimos atribuir esto directamente a EphA7 puesto que en los ensayos con anticuerpo como marcador fluorescente se observó también que estos preferían las bandas sin fluorescencia. Esto podría principalmente deberse a: 1) se ha descrito que la presencia de otras moléculas dentro de los parches de Eph/efrinas generan espacios entre los oligómeros puede interferir en la especificidad y fuerza de la respuesta, lo que puede estar sucediendo al adicionar microesferas e IgG Cy3 (Schaupp y cols., 2014; Nikolov y cols., 2013) -2) Otra posibilidad es que al generar las bandas estas sean más voluminosas al presentar las microesferas o IgG Cy3, lo que podría generar un surco que se llenaría tras la cobertura final con laminina, favoreciendo el crecimiento en las bandas no fluorescentes. Más aun, una posibilidad que no

puede ser descartada es que los axones provenientes de los núcleos pretectales sean más sensibles a los cambios mecánicos en el medio que los axones probados con anterioridad en otros estudios de preferencia de sustratos, los cuales no demuestran problemas al ser expuestos a microesferas o a otros cambios en la superficie de crecimiento (Walter y cols., 1987; Kantor y cols., 2004; Knoll y cols., 2007).

Por otro lado, los ensayos de inhibición *in vivo* para EphA7 demostraron que al inhibir las columnas laterales, pero manteniendo la expresión en la PTDM, la cantidad de fascículos axonales que avanzan por el eje ventro-dorsal disminuye. Esto puede deberse a que tras la inhibición en la expresión, la interacción en trans efrina:Eph eliminaría la señalización mediada por fosforilación en las células del parénquima. Esta señalización se ha visto que activa a una serie de efectores que llevan finalmente a la activación de las GTPasas pequeñas Rac1 y RhoA, las cuales modularían el reordenamiento del citoesqueleto y llevarían a alteraciones en la morfología de la célula y modificación de sus contactos intercelulares (Pasquale y cols., 2005; Kania y Klein, 2016). Más aun, las variantes de splicing de EphA7 que carecen de la región citoplasmática completa promueven adhesión celular en vez del conocido efecto repulsivo, esto demuestra que una correcta señalización intracelular es indispensable para el efecto deseado (Holmberg y cols., 2000). Por lo tanto, la inhibición de EphA7 podría estar generando una serie de respuestas en el parénquima celular, desde la pérdida de la morfología celular hasta disminución en la proliferación y posiblemente pérdida en la expresión de otras moléculas necesarias para el crecimiento y guía de los axones. Además, esto llevaría a que efrina-A5 presente en la membrana axonal no pudiera interactuar con su receptor por lo cual no existiría señalización reversa hacia los axones, inhibiendo cualquier efecto que EphA7 generara normalmente (Park y cols., 2013)

Los estudios de inhibición de EphA7 realizados en este trabajo dieron como resultado 2 fenotipos: 1) disminución de la presencia de fascículos en el

eje ventro-dorsal además de desplazamiento de estos hacia el estrato periventricular y adelgazamiento de la capa de células neuroepiteliales y cp debido a la pérdida de las columnas laterales de EphA7; 2) pérdida de la integridad del pretectum comisural debido al desplazamiento lateral de la PTD conllevando a la aberración en la trayectoria axonal y pérdida en la simetría bilateral y de la cp, debido a una inhibición total de EphA7 en el parénquima neuronal.

En el segundo tipo de inhibición se observa pérdida de la morfología característica y de la regionalización de los dominios que componen el pretectum comisural, evidenciado al observar el desplazamiento lateral de la PTD. Esto no se observa en el primer tipo de inhibición donde la expresión de EphA7 se mantiene en la PTDM, pudiendo atribuir este cambio en el fenotipo principalmente a la inhibición de EphA7 en esta zona.

La interacción entre las proteínas pertenecientes a la familia de las Eph/efrinas ha sido implicada principalmente con procesos de adhesión celular y guía axonal (O'Leary y Wilkinson, 1999; Kullander y Klein, 2002; Pasquale, 2005). Sin embargo, existen evidencias de que también estarían involucrados directa o indirectamente en la regulación de la proliferación celular (Conover y cols., 2000; Holmberg y cols., 2005). Más aun, se ha observado que la interacción efrina-A5-EphA7 en progenitores corticales promueve la apoptosis resultando en la disminución en el tamaño de la corteza, mientras que ratones EphA7<sup>-/-</sup> producen el efecto contrario (Depaepe y cols., 2005). En relación a esto, se ha identificado la co-expresión de efrina-A5 y EphA7 en la línea media dorsal diencefálica y mesencefálica anterior en ratones, y al sobreexpresar efrina-A5 *in vivo* se logró determinar que la interacción ligando-receptor induce fuertemente la apoptosis en las células que expresaban EphA7, observando severas malformaciones en el cerebro durante el desarrollo embrionario. Dichas malformaciones fueron atribuidas a una apoptosis masiva, generando la pérdida de la integridad tisular, un cambio en la tensión mecánica del tejido y por ende en la morfología en general. Se cree que las células

neuroepiteliales de la línea media dien- y mesencefálicas están expresando ambas moléculas en su membrana solo que en dominios celulares distintos, generando contactos con las células vecinas que expresen ya sea EphA o efrina-A que no esté expresado en la otra membrana. Estas interacciones normales EphA/efrina-A desencadenan un estímulo hacia ambas células, y al sobreexpresar EphA o efrina-A se generaría una variación en la señalización intracelular normal, llevando a la activación de la vía apoptótica (Park y cols., 2013; Park S., 2013). Esto es importante debido a que la muerte celular programada durante el desarrollo cerebral temprano es sumamente elevada y es esencial para la regulación selectiva de la eliminación de los progenitores neuronales (Kuan y cols., 2000; Yeo y cols., 2004).

Más aun, estudios han logrado mostrar que EphA7 interacciona con TNFR1 (receptor de necrosis tumoral 1) al ser estimulado por efrina-A5, llevando a la formación de un complejo multiprotéico capaz de activar la vía de señalización apoptótica dependiente de caspasas *in vitro* (Lee y cols, 2013; Lee y cols., 2015).

Los antecedentes planteados, junto con los datos de inhibición de la presente tesis, sugieren que EphA7 presente en las células de la PTDM sería importante en el balance entre la supervivencia y la muerte celular necesarios para el correcto desarrollo del prosómero 1, en donde la interacción con efrina-A5 llevaría a la regulación controlada de la proliferación de esta área en general.

### Moléculas de matriz extracelular en el P1

El mecanismo de acción propuesto se ve fortalecido además por los estudios de expresión de distintas moléculas de MEC en el CoP, los cuales revelaron la presencia de moléculas que en otros contextos han sido involucradas en guía axonal como tenascina y HNK-1, que presentaron un patrón de expresión muy similar al de las columnas de EphA7. La familia de

las tenascinas incluye distintas moléculas (ej: TN-C, R, X e Y), pero solo TN-C y -R han sido reportadas en el SNC (Faissner y cols., 1997). El anticuerpo utilizado durante este trabajo reconoce a TN-C (Akbareian y cols., 2013).

La TN-C ha sido relacionada con varios aspectos del desarrollo del SNC, incluyendo la regulación de los procesos de proliferación y diferenciación, guía axonal y modulación a la respuesta a otros componentes de matriz (Gotz y cols., 1997; Schweitzer y cols., 2005; Besser y cols., 2012). La importancia de TN en la formación de comisuras durante el desarrollo, ha sido estudiada en el tracto óptico, en donde está bordeando la proyección óptica, previniendo que los axones salgan del tracto axonal en dirección medio-caudal. La inhibición de TN en este contexto resulta en falla en la navegación y un incremento en la ramificación de los axones (Becker y cols., 2003). El patrón de expresión de TN encontrado en el pectum comisural sugiere una función similar a la descrita durante la formación de la cp. Estos antecedentes nos llevan a pensar que la presencia de tenascina y EphA7 en la misma zona llevaría a doblar el efecto repulsivo sobre los axones provenientes de los núcleos pretecales, asegurándose de que estos lleguen a la PTD.

Por otro lado, el epítipo HNK-1 es un trisacárido expresado de forma muy selectiva en ciertos tipos de glicolípidos y glicoproteínas, como por ejemplo moléculas de adhesión celular (NCAM) o de MEC (tenascina). Esta molécula se expresa de forma preferente en el SN adulto y durante el desarrollo (Abo y Balch., 1981; Martini y Cols., 1994; Ong y cols., 2002; Kleene y Schachner, 2004; Yagi y cols., 2010). La función de HNK-1 se demostró en ratones con una modificación genética de las enzimas encargadas de su síntesis, los cuales presentan un fenotipo con anomalías electrofisiológicas y defectos en la plasticidad neuronal. En gatos, HNK-1 está expresado en la corteza visual durante el periodo crítico de sinaptogénesis, además se ha visto que promueve el crecimiento axonal en axones motores y contribuye a la recuperación funcional tras injuria en la médula espinal (Martini

y cols., 1994; Vogel y cols., 1993; Senn y Cols., 2002; Yoshihara y Cols., 2009; Ma y cols., 2016).

La localización de HNK-1 durante el desarrollo de la cp sugiere que estaría presente en la tenascina, principalmente porque ambas moléculas presentan un patrón de expresión similar correspondiente a 3 columnas ventro-dorsales en la región lateral. Además, HNK-1 está presente en los axones entre CoL1 y CoD2 y decrece su expresión a medida que se avanza a la región dorsal. En esta región podría estar interactuando con laminina-1 o CSPGs (si este fuera un lectican) que interaccionan con HKN-1 durante el desarrollo promoviendo la adhesión y crecimiento neurítico (Hall y cols., 1995; Miura y cols., 2001).

Cabe mencionar también que, complementaria a la expresión de EphA7, tenascina y HNK-1, existiría la expresión de otra proteína de MEC, llamada osteopontina, expresándose complementariamente en el espacio delimitado entre las columnas. Esta proteína fue primeramente descrita en la formación de huesos durante el desarrollo y la reabsorción ósea (Chen y Cols., 1993; Reinholt y Cols., 1990); sin embargo, ha sido identificada en el SNC tras injurias en el nervio óptico y médula espinal (Küry Y Cols., 2004; Hashimoto y Cols., 2003), en donde desempeña diferentes roles dependiendo del tipo de axón, promoviendo el crecimiento en axones motores (Wright y cols., 2014) e inhibiéndolo en axones sensitivos (Küry Y Cols., 2004). Además, se ha observado que neuronas hipocampales extraídas postnatalmente al ser cultivadas con osteopontina presentan mayor número de neuritas primarias que al ser cultivadas en laminina (Plantman y cols., 2012). La expresión y función de esta proteína durante el desarrollo del SNC no ha sido descrito con anterioridad, pero experimentos *in vitro* con CRG embrionarias muestran que, al usar osteopontina como sustrato, este promovería el crecimiento axonal mediante la interacción con uno de sus receptores conocidos, CD44 (Ries y cols., 2007). El estudio recién mencionado también hace hincapié en el aumento del crecimiento de los axones al tener tanto osteopontina como laminina presentes como sustratos. En el presente estudio se observó que

laminina está presente en la zona correspondiente al espacio entre las columnas en las placas laterales, correlacionándose por tanto con osteopontina. Sin embargo, los axones en esta zona no son positivos para CD44 (datos no mostrados), aunque este al parecer no es su único receptor, ya que se ha demostrado que osteopontina posee una secuencia específica de unión a integrinas (Arg-Gly-Asp). De hecho, ha sido comprobado que es capaz de unirse a las integrinas  $\alpha V\beta 5$ ,  $\alpha v\beta 1$ ,  $\alpha v\beta 5$ ,  $\alpha 9\beta 1$  y  $\alpha 4\beta 1$  (Liaw y cols., 1995; Smith y cols., 1996; Bayless y Cols., 1998), lo que sugiere que osteopontina podría estar interaccionando por medio de las integrinas descritas previamente en los axones comisurales.

Otra de las moléculas presentes en la matriz extracelular que sirven de sustrato a los axones de la cp es laminina-1. Las lamininas son glicoproteínas heterotriméricas con subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$ , y  $\gamma$ , las cuales se ensamblan formando una estructura cruciforme. Actualmente se han descrito 15 isoformas de laminina dependiendo de las distintas cadenas que la compongan:  $\alpha 1-5$ ,  $\beta 1-3$ , y  $\gamma 1-3$  (Colognato y Yurchenco, 2000).

Estas moléculas juegan distintos roles *in vitro* tales como migración, diferenciación y crecimiento axonal en distintos tipos neuronales (Liesi y cols., 1989; Adams y cols., 2005; Turney y Bridgman, 2005). El anticuerpo utilizado reconoce específicamente laminina-1, la cual al ser usada como sustrato en cultivo promueve fuertemente el crecimiento axonal en una gran variedad de neuronas del SNC y periférico. Análisis de mutantes para laminina en *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila*, *Danio rerio* y *Mus musculus* han entregado importante evidencia de la importancia de esta proteína para la correcta guía axonal (García-Alonso y cols., 1996; Karlstrom y cols., 1996; Forrester y Garriga, 1997; Huang y cols., 2003; Paulus y Halloran, 2006; Chen y cols., 2009). Más aún, peces cebra mutantes para *bashful*/laminina  $\alpha 1$  presentan defectos en la mayoría de los tractos axonales incluido la cp (Paulus y Halloran, 2006). Adicionalmente, los mutantes de *bashful* muestran defectos en la fasciculación y extensión, así como también un aumento en la formación

de ramificaciones. Curiosamente, y en contraste con los axones del SNC, los axones periféricos se presentan normales en los mutantes para *bashful*.

Un gran número de estudios *in vitro* han demostrado que laminina 1 no solo actúa como un sustrato permisivo, sino que, al aplicarse localmente, puede dirigir axones en crecimiento (Adams y cols., 2005; Turney y Bridgman, 2005). Los distintos tipos de laminina estimularían la extensión del axón mediante la adhesión mediada por integrinas y su cascada de señalización intracelular (Kuhn y cols., 1995). Sin embargo, se ha descrito que otros receptores de membrana tales como sindecan y distroglican podrían estar involucrados en ciertos tipos de neuronas (Hamill y cols., 2009). Con respecto a nuestros resultados sabemos que los axones del pretectum comisural estarían expresando integrina  $\beta 1$  (Caprile y cols., 2009) y expresarían en cultivo también  $\alpha 6$ , aunque no sabemos si están generando el heterodímero, pero podrían ser un posible receptor para la laminina descrita en esta región.

En este estudio analizamos también la presencia de fibronectina, perlecan y decorina, todas las cuales estarían presentes en la membrana limitante externa. Fibronectina, a pesar de su uso como sustrato permisivo en el crecimiento axonal ha sido detectado en el SNC solo en la membrana pial y vasos sanguíneos (Milner y Campbell, 2002; Lathia y cols., 2007). Así mismo, decorina no ha logrado ser descrita en cerebro de ratones, con la excepción de las meninges y una región de la placa del suelo localizada en el cuarto ventrículo (Scholzen y cols., 1994). Perlecan por otro lado, es un componente importante de las membranas basales y ha sido descrita rodeando fascículos axonales proveniente de neuronas olfatorias sensitivas en embriones de ratones (Shay y cols., 2008) y promoviendo el crecimiento neurítico *in vitro* (Nakamura y cols., 2015). En embriones de pollo en estadio HH17 ha sido descrito en la membrana limitante externa (Soulintzi y Zagris, 2007) lo cual se mantendría en el tiempo como lo hemos reportado.

## Guía de los axones en la placa del techo diencefálica

Con anterioridad habíamos descrito que durante la llegada de los axones a la PTD se enmarca un hito importante, el encuentro con la OSC-espondina, la cual ayuda a la fasciculación de los axones a través de la PTDM. La inhibición de esta proteína mediante la electroporación de un plásmido con la secuencia para el shRNA de OSC-espondina en la zona de la PTD, generó graves problemas asociados a la defasciculación de los axones y a la proliferación de las células de la PTD así como también de otras zonas a nivel dorsal (Vera & Stanic y Cols., 2013). Sin embargo, se sabe que al llegar a la línea media los axones deben decidir si cruzar o no hacia el lado opuesto en una zona carente de OSC-espondina. Nuestros estudios no solo demostraron la presencia del transcrito de EphA7, sino de la proteína en esta región desde los inicios de la formación de la cp. En esta región la EphA7 está siendo expresada en la parte inicial de las prolongaciones basales de las células ependimales, cercanas al cuerpo celular, lugar donde se cree ingresan los axones que van llegando a la zona en una primera instancia. En esta región también se encuentra la presencia de laminina y osteopontina. Esta última, a pesar de que es una molécula que solo recientemente ha sido relacionada durante el desarrollo a procesos de guía axonal (Ries y Cols., 2007), se estima que podría estar ejerciendo una función principalmente atractiva ya que existe una co-expresión entre esta proteína, laminina y los axones integrina  $\beta 1$  positivos que avanzan hacia la PTD por las regiones laterales de CoP.

En el caso particular de laminina, estudios han demostrado que es capaz de modular el efecto de moléculas señal como netrinas (Hopker y cols., 1999) y miembros de la familia Eph/efrinas. En este contexto, mientras que EphB no presenta ningún efecto sobre los axones de CRG cuando crecen en un medio con L1CAM, al cultivarlos en un medio con laminina/L1, los conos axónicos disminuyen su velocidad de crecimiento pero se mantienen dinámicos en respuesta a EphB (Suh y cols., 2004). La modulación mediada por laminina

puede ser importante durante el desarrollo de la cp para pausar los conos axónicos, permitiendo que estos sensen y detecten la EphA7 expresada en la línea media. La presencia de laminina también puede cambiar o hacer nulo el efecto inhibitorio de moléculas señal. Por ejemplo, efrina-A5 es importante en la repulsión de axones de CRG. Este efecto repulsivo es mantenido *in vitro* al usar fibronectina como sustrato, pero al ser cambiado por laminina los axones son atraídos por un gradiente de efrina-A5 soluble (Weiln y cols., 2003). Al realizar estudios más detallados de la presencia de laminina en la placa del techo, donde se expresa EphA7 así como efrina-A5 en los axones, se observó que laminina se encontraba en la MEC co-localizando con OSC-espondina y en estrecho contacto con los axones de la cp y las prolongaciones basales de las células de la PTD, positivas para EphA7. Los axones de la comisura expresan integrina  $\beta 1$ , un potencial receptor para OSC-espondina y para laminina, sugiriendo por lo tanto que laminina podría estar modulando el efecto tanto de OSC-espondina como de EphA7.

En resumen, en el presente trabajo hemos descrito la expresión de varias moléculas con patrones de expresión característicos, algunas de las cuales (EphA7, tenascina, HNK1) delimitan corredores por donde los axones suben hacia la zona dorsal en un ambiente rico en sustratos permisivos (laminina), mientras que en la zona dorsal donde además de EphA7 también se encuentra OSC-espondina, osteopontina, laminina y efrina-A5 los axones podrían estar enlenteciendo su trayectoria con el fin de sensar las distintas moléculas y decidir si cruzar o no al lado contralateral. En el caso de EphA7, su función además sería crucial en el correcto desarrollo del p1, y su desbalance generaría severas anomalías en la región.

## CONCLUSIONES

- EphA7 presenta un patrón de expresión determinado a través del prosomero 1 durante el desarrollo de la cp, estableciendo dos columnas a través de la placa alar generando un corredor por donde los axones se desplazan a través del eje dorso-ventral hasta el límite con la placa del techo, en donde se encuentran con una region lateral positiva para OSC-espondina para luego llegar a la region medial positiva para EphA7.
- Los axones provenientes de los núcleos pretectales son positivos para efrina-A5, ligando conocido para EphA7 presentado en las células del parénquima neuronal.
- Efrina-A2, otro posible ligando de EphA7 se expresa en el parénquima neuronal pero no en los axones, sugiriendo la posible presencia de otro receptor EphA en los axones de esta región.
- A través del prosomero 1 se encuentra un ambiente rico en proteínas de MEC que presentan patrones de expresión que sugieren la participación en la generación de un medio específico de movilización para la guía de los axones a lo largo del eje dorso-ventral y en la PTD.
- Los axones de esta región presentan diferentes moléculas de superficie que podrían funcionar como receptores de las distintas moléculas de MEC descritas.
- EphA7 no solo es importante para la guía de los axones, sino que también en la mantención de la integridad y regionalización del parénquima neuronal. Su inhibición lleva a malformaciones severas a través del encéfalo y pérdida de la simetría bilateral, pudiendo estar involucrado en la mantención del equilibrio entre proliferación y muerte celular.

## **AGRADECIMIENTOS**

Primero quisiera agradecer a CONICYT por otorgarme la beca para estudios de Doctorados Nacionales, financiamiento para gastos operacionales de esta tesis y adjudicación de financiamiento para ida a congresos (21110539). Además, quisiera agradecer a FONDECYT 1110723 otorgado a T. Caprile, con lo cual logramos desarrollar esta investigación doctoral. Quisiera agradecer también a la Dirección de Postgrado de la Universidad de Concepción por el financiamiento de distintas actividades académicas, al Programa de Doctorado en Ciencias Biológicas mención Biología Celular y Molecular y a las distintas entidades internacionales que financiaron mi participación en diversos eventos.

Agradezco al departamento de Biología Celular de la Universidad de Concepción y en especial a la Dra. Teresa Caprile por permitirme desarrollar mi tesis doctoral en su laboratorio. Finalmente, quisiera agradecer a mi familia, por el constante apoyo que siempre me han brindado, por su ayuda al momento de superar los obstáculos para lograr mis metas, por hacerme tan feliz y darme fuerza para seguir luchando. Un gran beso para mi mamá, papá, hermana y mi compañero de vida Benjamin.

## BIBLIOGRAFÍA

- Abo,T. and Balch,C.M. (1981). A differentiation antigen of human NK and K cells identified by a monoclonal antibody (HNK-1). *J. Immunol.* *127*, 1024-1029.
- Adams,D.N., Kao,E.Y., Hypolite,C.L., Distefano,M.D., Hu,W.S., and Letourneau,P.C. (2005). Growth cones turn and migrate up an immobilized gradient of the laminin IKVAV peptide. *J. Neurobiol.* *62*, 134-147.
- Adams,J.C. (2001). Thrombospondins: multifunctional regulators of cell interactions. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *17*, 25-51.
- Adams,R.H., Betz,H., and Puschel,A.W. (1996). A novel class of murine semaphorins with homology to thrombospondin is differentially expressed during early embryogenesis. *Mech. Dev.* *57*, 33-45.
- Akbareian,S.E., Nagy,N., Steiger,C.E., Mably,J.D., Miller,S.A., Hotta,R., Molnar,D., and Goldstein,A.M. (2013). Enteric neural crest-derived cells promote their migration by modifying their microenvironment through tenascin-C production. *Dev. Biol.* *382*, 446-456.
- Araujo,S.J. and Tear,G. (2003). Axon guidance mechanisms and molecules: lessons from invertebrates. *Nat. Rev. Neurosci.* *4*, 910-922.
- Bach,A., Lallemand,Y., Nicola,M.A., Ramos,C., Mathis,L., Maufra,M., and Robert,B. (2003). *Msx1* is required for dorsal diencephalon patterning. *Development* *130*, 4025-4036.
- Bak,M. and Fraser,S.E. (2003). Axon fasciculation and differences in midline kinetics between pioneer and follower axons within commissural fascicles. *Development* *130*, 4999-5008.
- Baker,R.K. and Antin,P.B. (2003). Ephs and ephrins during early stages of chick embryogenesis. *Dev. Dyn.* *228*, 128-142.
- Bamdad,M., Volle,D., Dastugue,B., and Meiniel,A. (2004). Alpha1beta1-integrin is an essential signal for neurite outgrowth induced by thrombospondin type 1 repeats of SCO-spondin. *Cell Tissue Res.* *315*, 15-25.
- Barros,C.S., Franco,S.J., and Muller,U. (2011). Extracellular matrix: functions in the nervous system. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *3*, a005108.
- Bartsch,S., Bartsch,U., Dorries,U., Faissner,A., Weller,A., Ekblom,P., and Schachner,M. (1992). Expression of tenascin in the developing and adult cerebellar cortex. *J. Neurosci.* *12*, 736-749.
- Bartsch,S., Husmann,K., Schachner,M., and Bartsch,U. (1995). The extracellular matrix molecule tenascin: expression in the developing chick retinotectal system and substrate properties for retinal ganglion cell neurites in vitro. *Eur. J. Neurosci.* *7*, 907-916.
- Bayless,K.J. and Davis,G.E. (2001). Identification of dual alpha 4beta1 integrin binding sites within a 38 amino acid domain in the N-terminal thrombin fragment of human osteopontin. *J. Biol. Chem.* *276*, 13483-13489.
- Becker,C.G., Schweitzer,J., Feldner,J., Becker,T., and Schachner,M. (2003). Tenascin-R as a repellent guidance molecule for developing optic axons in zebrafish. *J. Neurosci.* *23*, 6232-6237.
- Belkin,A.M. and Stepp,M.A. (2000). Integrins as receptors for laminins. *Microsc. Res. Tech.* *51*, 280-301.
- Besser,M., Jagatheaswaran,M., Reinhard,J., Schaffelke,P., and Faissner,A. (2012). Tenascin C regulates proliferation and differentiation processes during embryonic retinogenesis and modulates the de-differentiation capacity of Muller glia by influencing growth factor responsiveness and the extracellular matrix compartment. *Dev. Biol.* *369*, 163-176.
- Bhidayasiri,R., Plant,G.T., and Leigh,R.J. (2000). A hypothetical scheme for the brainstem control of vertical gaze. *Neurology* *54*, 1985-1993.
- Birgbauer,E., Oster,S.F., Severin,C.G., and Sretavan,D.W. (2001). Retinal axon growth cones respond to EphB extracellular domains as inhibitory axon guidance cues. *Development* *128*, 3041-3048.

- Bonanomi,D. and Pfaff,S.L. (2010). Motor axon pathfinding. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2, a001735.
- Bonanomi,D., Chivatakarn,O., Bai,G., Abdesselem,H., Lettieri,K., Marquardt,T., Pierchala,B.A., and Pfaff,S.L. (2012). Ret is a multifunctional coreceptor that integrates diffusible- and contact-axon guidance signals. *Cell* 148, 568-582.
- Bonhoeffer,F. and Huf,J. (1982). In vitro experiments on axon guidance demonstrating an anterior-posterior gradient on the tectum. *EMBO J.* 1, 427-431.
- Bornstein,P. (1995). Diversity of function is inherent in matricellular proteins: an appraisal of thrombospondin 1. *J. Cell Biol.* 130, 503-506.
- Bovolenta,P. and Dodd,J. (1990). Guidance of commissural growth cones at the floor plate in embryonic rat spinal cord. *Development* 109, 435-447.
- Bovolenta,P. and Dodd,J. (1991). Perturbation of neuronal differentiation and axon guidance in the spinal cord of mouse embryos lacking a floor plate: analysis of Danforth's short-tail mutation. *Development* 113, 625-639.
- Bovolenta,P. (2005). Morphogen signaling at the vertebrate growth cone: a few cases or a general strategy? *J. Neurobiol.* 64, 405-416.
- Brittis,P.A., Canning,D.R., and Silver,J. (1992). Chondroitin sulfate as a regulator of neuronal patterning in the retina. *Science* 255, 733-736.
- Brown,N.H. (2011). Extracellular matrix in development: insights from mechanisms conserved between invertebrates and vertebrates. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 3.
- Calof,A.L. and Reichardt,L.F. (1984). Motoneurons purified by cell sorting respond to two distinct activities in myotube-conditioned medium. *Dev. Biol.* 106, 194-210.
- Calzada,M.J., Annis,D.S., Zeng,B., Marcinkiewicz,C., Banas,B., Lawler,J., Mosher,D.F., and Roberts,D.D. (2004). Identification of novel beta1 integrin binding sites in the type 1 and type 2 repeats of thrombospondin-1. *J. Biol. Chem.* 279, 41734-41743.
- Cammarata,G.M., Bearce,E.A., and Lowery,L.A. (2016). Cytoskeletal social networking in the growth cone: How +TIPs mediate microtubule-actin cross-linking to drive axon outgrowth and guidance. *Cytoskeleton (Hoboken.)* 73, 461-476.
- Campbell,K. and Gotz,M. (2002). Radial glia: multi-purpose cells for vertebrate brain development. *Trends Neurosci.* 25, 235-238.
- Caprile,T., Osorio,G., Henriquez,J.P., and Montecinos,H. (2009). Polarized expression of integrin beta1 in diencephalic roof plate during chick development, a possible receptor for SCO-spondin. *Dev. Dyn.* 238, 2494-2504.
- Carulli,D., Laabs,T., Geller,H.M., and Fawcett,J.W. (2005). Chondroitin sulfate proteoglycans in neural development and regeneration. *Curr. Opin. Neurobiol.* 15, 116-120.
- Cearns,M.D., Escuin,S., Alexandre,P., Greene,N.D., and Copp,A.J. (2016). Microtubules, polarity and vertebrate neural tube morphogenesis. *J. Anat.* 229, 63-74.
- Chai,G., Zhou,L., Manto,M., Helmbacher,F., Clotman,F., Goffinet,A.M., and Tissir,F. (2014). Celsr3 is required in motor neurons to steer their axons in the hindlimb. *Nat. Neurosci.* 17, 1171-1179.
- Chao,D.L., Ma,L., and Shen,K. (2009). Transient cell-cell interactions in neural circuit formation. *Nat. Rev. Neurosci.* 10, 262-271.
- Charrier,J.B., Lapointe,F., Le Douarin,N.M., and Teillet,M.A. (2002). Dual origin of the floor plate in the avian embryo. *Development* 129, 4785-4796.
- Charron,F. and Tessier-Lavigne,M. (2007). The Hedgehog, TGF-beta/BMP and Wnt families of morphogens in axon guidance. *Adv. Exp. Med. Biol.* 621, 116-133.
- Chen,J., Singh,K., Mukherjee,B.B., and Sodek,J. (1993). Developmental expression of osteopontin (OPN) mRNA in rat tissues: evidence for a role for OPN in bone formation and resorption. *Matrix* 13, 113-123.
- Chen,Q., Arai,D., Kawakami,K., Sawada,T., Jing,X., Miyajima,M., Hirai,S., Sakaguchi,K., and Furushima,K. (2015). EphA4 Regulates the Balance between Self-Renewal and Differentiation

of Radial Glial Cells and Intermediate Neuronal Precursors in Cooperation with FGF Signaling. *PLoS. One.* *10*, e0126942.

Chen,Z.L., Haegeli,V., Yu,H., and Strickland,S. (2009). Cortical deficiency of laminin gamma1 impairs the AKT/GSK-3beta signaling pathway and leads to defects in neurite outgrowth and neuronal migration. *Dev. Biol.* *327*, 158-168.

Cheng,H.J., Nakamoto,M., Bergemann,A.D., and Flanagan,J.G. (1995). Complementary gradients in expression and binding of ELF-1 and Mek4 in development of the topographic retinotectal projection map. *Cell* *82*, 371-381.

Chiquet-Ehrismann,R. and Tucker,R.P. (2011). Tenascins and the importance of adhesion modulation. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *3*.

Chizhikov,V.V. and Millen,K.J. (2004). Mechanisms of roof plate formation in the vertebrate CNS. *Nat. Rev. Neurosci.* *5*, 808-812.

Chizhikov,V.V. and Millen,K.J. (2005). Roof plate-dependent patterning of the vertebrate dorsal central nervous system. *Dev. Biol.* *277*, 287-295.

Clegg,D.O. (2000). Novel roles for integrins in the nervous system. *Mol. Cell Biol. Res. Commun.* *3*, 1-7.

Clegg,D.O., Wingerd,K.L., Hikita,S.T., and Tolhurst,E.C. (2003). Integrins in the development, function and dysfunction of the nervous system. *Front Biosci.* *8*, d723-d750.

Clifford,M.A., Athar,W., Leonard,C.E., Russo,A., Sampognaro,P.J., Van der Goes,M.S., Burton,D.A., Zhao,X., Lalchandani,R.R., Sahin,M., Vicini,S., and Donoghue,M.J. (2014). EphA7 signaling guides cortical dendritic development and spine maturation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *111*, 4994-4999.

Colamarino,S.A. and Tessier-Lavigne,M. (1995). The role of the floor plate in axon guidance. *Annu. Rev. Neurosci.* *18*, 497-529.

Cognato,H. and Yurchenco,P.D. (2000). Form and function: the laminin family of heterotrimers. *Dev. Dyn.* *218*, 213-234.

Connor,R.J., Menzel,P., and Pasquale,E.B. (1998). Expression and tyrosine phosphorylation of Eph receptors suggest multiple mechanisms in patterning of the visual system. *Dev. Biol.* *193*, 21-35.

Conover,J.C., Doetsch,F., Garcia-Verdugo,J.M., Gale,N.W., Yancopoulos,G.D., and Alvarez-Buylla,A. (2000). Disruption of Eph/ephrin signaling affects migration and proliferation in the adult subventricular zone. *Nat. Neurosci.* *3*, 1091-1097.

Cowan,C.A., Yokoyama,N., Bianchi,L.M., Henkemeyer,M., and Fritzsche,B. (2000). EphB2 guides axons at the midline and is necessary for normal vestibular function. *Neuron* *26*, 417-430.

Cramer,K.S. and Miko,I.J. (2016). Eph-ephrin signaling in nervous system development. *F1000Res.* *5*.

Cullheim,S. (1996). The development of nerve connections in the peripheral nervous system. *Acta Paediatr. Suppl* *416*, 3-7.

Danek,A. (2006). The challenge of axonal path-finding. *Strabismus* *14*, 95-99.

de,W.J., De,W.F., Klooster,J., and Verhaagen,J. (2005). Semaphorin 3A displays a punctate distribution on the surface of neuronal cells and interacts with proteoglycans in the extracellular matrix. *Mol. Cell Neurosci.* *29*, 40-55.

Denda,S. and Reichardt,L.F. (2007). Studies on integrins in the nervous system. *Methods Enzymol.* *426*, 203-221.

Dent,E.W., Gupton,S.L., and Gertler,F.B. (2011). The growth cone cytoskeleton in axon outgrowth and guidance. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *3*.

Depaepe,V., Suarez-Gonzalez,N., Dufour,A., Passante,L., Gorski,J.A., Jones,K.R., Ledent,C., and Vanderhaeghen,P. (2005). Ephrin signalling controls brain size by regulating apoptosis of neural progenitors. *Nature* *435*, 1244-1250.

- Derwinska,K., Bernaciak,J., Wisniowiecka-Kowalnik,B., Obersztyn,E., Bocian,E., and Stankiewicz,P. (2009). Autistic features with speech delay in a girl with an approximately 1.5-Mb deletion in 6q16.1, including GPR63 and FUT9. *Clin. Genet.* 75, 199-202.
- Devoll,R.E., Pintero,G.J., Appelbaum,E.R., Dul,E., Troncoso,P., Butler,W.T., and Farach-Carson,M.C. (1997). Improved immunohistochemical staining of osteopontin (OPN) in paraffin-embedded archival bone specimens following antigen retrieval: anti-human OPN antibody recognizes multiple molecular forms. *Calcif. Tissue Int.* 60, 380-386.
- Dickson,B.J. (2002). Molecular mechanisms of axon guidance. *Science* 298, 1959-1964.
- Dickson,B.J. (2003). Development. Wiring the brain with insulin. *Science* 300, 440-441.
- Dickson,B.J. and Zou,Y. (2010). Navigating intermediate targets: the nervous system midline. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2, a002055.
- Didier,R., Meiniel,O., and Meiniel,A. (2007). Molecular cloning and early expression of chick embryo SCO-spondin. *Cell Tissue Res.* 327, 111-119.
- Diefenbach,T.J., Guthrie,P.B., Stier,H., Billups,B., and Kater,S.B. (1999). Membrane recycling in the neuronal growth cone revealed by FM1-43 labeling. *J. Neurosci.* 19, 9436-9444.
- Drescher,U., Kremoser,C., Handwerker,C., Loschinger,J., Noda,M., and Bonhoeffer,F. (1995). In vitro guidance of retinal ganglion cell axons by RAGS, a 25 kDa tectal protein related to ligands for Eph receptor tyrosine kinases. *Cell* 82, 359-370.
- Dudanova,I. and Klein,R. (2013). Integration of guidance cues: parallel signaling and crosstalk. *Trends Neurosci.* 36, 295-304.
- Eberhart,J., Swartz,M.E., Koblar,S.A., Pasquale,E.B., and Krull,C.E. (2002). EphA4 constitutes a population-specific guidance cue for motor neurons. *Dev. Biol.* 247, 89-101.
- Egea,J. and Klein,R. (2007). Bidirectional Eph-ephrin signaling during axon guidance. *Trends Cell Biol.* 17, 230-238.
- El,A., I, Fernandez,C., Baeza,N., De Paula,A.M., Pesheva,P., and Figarella-Branger,D. (2011). Spatiotemporal distribution of tenascin-R in the developing human cerebral cortex parallels neuronal migration. *J. Comp Neurol.* 519, 2379-2389.
- Eroglu,C. (2009). The role of astrocyte-secreted extracellular matrix proteins in central nervous system development and function. *J. Cell Commun. Signal.* 3, 167-176.
- Estivill-Torres,G., Vitalis,T., Fernandez-Llebrez,P., and Price,D.J. (2001). The transcription factor Pax6 is required for development of the diencephalic dorsal midline secretory radial glia that form the subcommissural organ. *Mech. Dev.* 109, 215-224.
- Evanko,S.P., Tammi,M.I., Tammi,R.H., and Wight,T.N. (2007). Hyaluronan-dependent pericellular matrix. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 59, 1351-1365.
- Evans,A.R., Euteneuer,S., Chavez,E., Mullen,L.M., Hui,E.E., Bhatia,S.N., and Ryan,A.F. (2007). Laminin and fibronectin modulate inner ear spiral ganglion neurite outgrowth in an in vitro alternate choice assay. *Dev. Neurobiol.* 67, 1721-1730.
- Evans,T.A. and Bashaw,G.J. (2010). Axon guidance at the midline: of mice and flies. *Curr. Opin. Neurobiol.* 20, 79-85.
- Faissner,A. and Kruse,J. (1990). J1/tenascin is a repulsive substrate for central nervous system neurons. *Neuron* 5, 627-637.
- Faissner,A., Heck,N., Dobbertin,A., and Garwood,J. (2006). DSD-1-Proteoglycan/Phosphacan and receptor protein tyrosine phosphatase-beta isoforms during development and regeneration of neural tissues. *Adv. Exp. Med. Biol.* 557, 25-53.
- Falk,J., Bonnon,C., Girault,J.A., and Faivre-Sarrailh,C. (2002). F3/contactin, a neuronal cell adhesion molecule implicated in axogenesis and myelination. *Biol. Cell* 94, 327-334.
- Feinstein,Y. and Klar,A. (2004). The neuronal class 2 TSR proteins F-spondin and Mindin: a small family with divergent biological activities. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 36, 975-980.
- Feldheim,D.A., Vanderhaeghen,P., Hansen,M.J., Frisen,J., Lu,Q., Barbacid,M., and Flanagan,J.G. (1998). Topographic guidance labels in a sensory projection to the forebrain. *Neuron* 21, 1303-1313.

- Feldheim,D.A., Kim,Y.I., Bergemann,A.D., Frisen,J., Barbacid,M., and Flanagan,J.G. (2000). Genetic analysis of ephrin-A2 and ephrin-A5 shows their requirement in multiple aspects of retinocollicular mapping. *Neuron* 25, 563-574.
- Feldheim,D.A. and O'Leary,D.D. (2010). Visual map development: bidirectional signaling, bifunctional guidance molecules, and competition. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2, a001768.
- Ferran,J.L., Sanchez-Arrones,L., Sandoval,J.E., and Puelles,L. (2007). A model of early molecular regionalization in the chicken embryonic pretectum. *J. Comp Neurol.* 505, 379-403.
- Ferran,J.L., de Oliveira,E.D., Merchan,P., Sandoval,J.E., Sanchez-Arrones,L., Martinez-De-La-Torre,M., and Puelles,L. (2009). Genoarchitectonic profile of developing nuclear groups in the chicken pretectum. *J. Comp Neurol.* 517, 405-451.
- Fletcher,D.A. and Mullins,R.D. (2010). Cell mechanics and the cytoskeleton. *Nature* 463, 485-492.
- Forrester,W.C. and Garriga,G. (1997). Genes necessary for *C. elegans* cell and growth cone migrations. *Development* 124, 1831-1843.
- Frantz,C., Stewart,K.M., and Weaver,V.M. (2010). The extracellular matrix at a glance. *J. Cell Sci.* 123, 4195-4200.
- Frazer J.E. (1931). a manual of embryology: the development of the human body. first edition. London: Bailliere, Tindall And Cox, p.170.
- Frost,D.O. (1986). Development of anomalous retinal projections to nonvisual thalamic nuclei in Syrian hamsters: a quantitative study. *J. Comp Neurol.* 252, 95-105.
- Gale,N.W., Holland,S.J., Valenzuela,D.M., Flenniken,A., Pan,L., Ryan,T.E., Henkemeyer,M., Strebhardt,K., Hirai,H., Wilkinson,D.G., Pawson,T., Davis,S., and Yancopoulos,G.D. (1996). Eph receptors and ligands comprise two major specificity subclasses and are reciprocally compartmentalized during embryogenesis. *Neuron* 17, 9-19.
- Garcia-Alonso,L., Fetter,R.D., and Goodman,C.S. (1996). Genetic analysis of Laminin A in *Drosophila*: extracellular matrix containing laminin A is required for ocellar axon pathfinding. *Development* 122, 2611-2621.
- Garcia-Calero,E., de,P.E., and Puelles,L. (2006). EphA7 receptor is expressed differentially at chicken prosomeric boundaries. *Neuroscience* 141, 1887-1897.
- Gobron,S., Creveaux,I., Meiniel,R., Didier,R., Dastugue,B., and Meiniel,A. (1999). SCO-spondin is evolutionarily conserved in the central nervous system of the chordate phylum. *Neuroscience* 88, 655-664.
- Gobron,S., Creveaux,I., Meiniel,R., Didier,R., Herbet,A., Bamdad,M., El,B.F., Dastugue,B., and Meiniel,A. (2000). Subcommissural organ/Reissner's fiber complex: characterization of SCO-spondin, a glycoprotein with potent activity on neurite outgrowth. *Glia* 32, 177-191.
- Goodman,C.S. (1996). Mechanisms and molecules that control growth cone guidance. *Annu. Rev. Neurosci.* 19, 341-377.
- Golgi C. (1885). Sulla fina anatomia degli organi centrali del sistema nervoso: I, note preliminari sulla struttura, morfologia e vicendevoli rapporti delle cellule gangliar. *Riv Sper Freniat* 8:165-195.
- Gotz,M., Bolz,J., Joester,A., and Faissner,A. (1997). Tenascin-C synthesis and influence on axonal growth during rat cortical development. *Eur. J. Neurosci.* 9, 496-506.
- Gumbiner,B.M. (1996). Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. *Cell* 84, 345-357.
- Halilagic,A., Ribes,V., Ghyselinck,N.B., Zile,M.H., Dolle,P., and Studer,M. (2007). Retinoids control anterior and dorsal properties in the developing forebrain. *Dev. Biol.* 303, 362-375.
- Hall,H., Vorherr,T., and Schachner,M. (1995). Characterization of a 21 amino acid peptide sequence of the laminin G2 domain that is involved in HNK-1 carbohydrate binding and cell adhesion. *Glycobiology* 5, 435-441.

- Hamburger, V. and Hamilton, H.L. (1951). A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J. Morphol.* *88*, 49-92.
- Hamill, K.J., Kligys, K., Hopkinson, S.B., and Jones, J.C. (2009). Laminin deposition in the extracellular matrix: a complex picture emerges. *J. Cell Sci.* *122*, 4409-4417.
- Hansen, M.J., Dallal, G.E., and Flanagan, J.G. (2004). Retinal axon response to ephrin-as shows a graded, concentration-dependent transition from growth promotion to inhibition. *Neuron* *42*, 717-730.
- Harland, R. and Gerhart, J. (1997). Formation and function of Spemann's organizer. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *13*, 611-667.
- Hashimoto, M., Koda, M., Ino, H., Murakami, M., Yamazaki, M., and Moriya, H. (2003). Upregulation of osteopontin expression in rat spinal cord microglia after traumatic injury. *J. Neurotrauma* *20*, 287-296.
- Helmbacher, F., Schneider-Maunoury, S., Topilko, P., Tiret, L., and Charnay, P. (2000). Targeting of the EphA4 tyrosine kinase receptor affects dorsal/ventral pathfinding of limb motor axons. *Development* *127*, 3313-3324.
- Hemond, S.G. and Morest, D.K. (1991). Formation of the cochlea in the chicken embryo: sequence of innervation and localization of basal lamina-associated molecules. *Brain Res. Dev. Brain Res.* *61*, 87-96.
- Henkemeyer, M., Marengere, L.E., McGlade, J., Olivier, J.P., Conlon, R.A., Holmyard, D.P., Letwin, K., and Pawson, T. (1994). Immunolocalization of the Nuk receptor tyrosine kinase suggests roles in segmental patterning of the brain and axonogenesis. *Oncogene* *9*, 1001-1014.
- Henkemeyer, M., Orioli, D., Henderson, J.T., Saxton, T.M., Roder, J., Pawson, T., and Klein, R. (1996). Nuk controls pathfinding of commissural axons in the mammalian central nervous system. *Cell* *86*, 35-46.
- Hindges, R., McLaughlin, T., Genoud, N., Henkemeyer, M., and O'Leary, D. (2002). EphB forward signaling controls directional branch extension and arborization required for dorsal-ventral retinotopic mapping. *Neuron* *35*, 475-487.
- Ho, S.K., Kovacevic, N., Henkelman, R.M., Boyd, A., Pawson, T., and Henderson, J.T. (2009). EphB2 and EphA4 receptors regulate formation of the principal inter-hemispheric tracts of the mammalian forebrain. *Neuroscience* *160*, 784-795.
- Hoffman-Kim, D., Lander, A.D., and Jhaveri, S. (1998). Patterns of chondroitin sulfate immunoreactivity in the developing tectum reflect regional differences in glycosaminoglycan biosynthesis. *J. Neurosci.* *18*, 5881-5890.
- Holleville, N., Quilhac, A., Bontoux, M., and Monsoro-Burq, A.H. (2003). BMP signals regulate Dlx5 during early avian skull development. *Dev. Biol.* *257*, 177-189.
- Holmberg, J., Clarke, D.L., and Frisen, J. (2000). Regulation of repulsion versus adhesion by different splice forms of an Eph receptor. *Nature* *408*, 203-206.
- Holmberg, J., Armulik, A., Senti, K.A., Edoff, K., Spalding, K., Momma, S., Cassidy, R., Flanagan, J.G., and Frisen, J. (2005). Ephrin-A2 reverse signaling negatively regulates neural progenitor proliferation and neurogenesis. *Genes Dev.* *19*, 462-471.
- Hopker, V.H., Shewan, D., Tessier-Lavigne, M., Poo, M., and Holt, C. (1999). Growth-cone attraction to netrin-1 is converted to repulsion by laminin-1. *Nature* *401*, 69-73.
- Hopkin, R.J., Schorry, E., Bofinger, M., Milatovich, A., Stern, H.J., Jayne, C., and Saal, H.M. (1997). New insights into the phenotypes of 6q deletions. *Am. J. Med. Genet.* *70*, 377-386.
- Hoyo-Becerra, C., Lopez-Avalos, M.D., Cifuentes, M., Visser, R., Fernandez-Llebrez, P., and Grondona, J.M. (2010). The subcommissural organ and the development of the posterior commissure in chick embryos. *Cell Tissue Res.* *339*, 383-395.
- Huang, C.C., Hall, D.H., Hedgecock, E.M., Kao, G., Karantz, V., Vogel, B.E., Hutter, H., Chisholm, A.D., Yurchenco, P.D., and Wadsworth, W.G. (2003). Laminin alpha subunits and their role in *C. elegans* development. *Development* *130*, 3343-3358.

- Huber,A.B., Kolodkin,A.L., Ginty,D.D., and 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.
- Ichikawa,N., Iwabuchi,K., Kurihara,H., Ishii,K., Kobayashi,T., Sasaki,T., Hattori,N., Mizuno,Y., Hozumi,K., Yamada,Y., and Arikawa-Hirasawa,E. (2009). Binding of laminin-1 to monosialoganglioside GM1 in lipid rafts is crucial for neurite outgrowth. *J. Cell Sci.* 122, 289-299.
- Irie,F., Okuno,M., Matsumoto,K., Pasquale,E.B., and Yamaguchi,Y. (2008). Heparan sulfate regulates ephrin-A3/EphA receptor signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 105, 12307-12312.
- Itofusa,R. and Kamiguchi,H. (2011). Polarizing membrane dynamics and adhesion for growth cone navigation. *Mol. Cell Neurosci.* 48, 332-338.
- Iwamasa,H., Ohta,K., Yamada,T., Ushijima,K., Terasaki,H., and Tanaka,H. (1999). Expression of Eph receptor tyrosine kinases and their ligands in chick embryonic motor neurons and hindlimb muscles. *Dev. Growth Differ.* 41, 685-698.
- Jacobson,A.G. and Gordon,R. (1976). Changes in the shape of the developing vertebrate nervous system analyzed experimentally, mathematically and by computer simulation. *J. Exp. Zool.* 197, 191-246.
- Jones,J.C., Dehart,G.W., Gonzales,M., and Goldfinger,L.E. (2000). Laminins: an overview. *Microsc. Res. Tech.* 51, 211-213.
- Kadison,S.R., Makinen,T., Klein,R., Henkemeyer,M., and Kaprielian,Z. (2006). EphB receptors and ephrin-B3 regulate axon guidance at the ventral midline of the embryonic mouse spinal cord. *J. Neurosci.* 26, 8909-8914.
- Kadison,S.R., Makinen,T., Klein,R., Henkemeyer,M., and Kaprielian,Z. (2006). EphB receptors and ephrin-B3 regulate axon guidance at the ventral midline of the embryonic mouse spinal cord. *J. Neurosci.* 26, 8909-8914.
- Kahn,O.I. and Baas,P.W. (2016). Microtubules and Growth Cones: Motors Drive the Turn. *Trends Neurosci.* 39, 433-440.
- Kania,A. and Klein,R. (2016). Mechanisms of ephrin-Eph signalling in development, physiology and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 17, 240-256.
- Kantor,D.B., Chivatakarn,O., Peer,K.L., Oster,S.F., Inatani,M., Hansen,M.J., Flanagan,J.G., Yamaguchi,Y., Sretavan,D.W., Giger,R.J., and Kolodkin,A.L. (2004). Semaphorin 5A is a bifunctional axon guidance cue regulated by heparan and chondroitin sulfate proteoglycans. *Neuron* 44, 961-975.
- Kaprielian,Z., Runko,E., and Imondi,R. (2001). Axon guidance at the midline choice point. *Dev. Dyn.* 221, 154-181.
- Karfunkel,P. (1974). The mechanisms of neural tube formation. *Int. Rev. Cytol.* 38, 245-271.
- Karlstrom,R.O., Trowe,T., Klostermann,S., Baier,H., Brand,M., Crawford,A.D., Grunewald,B., Haffter,P., Hoffmann,H., Meyer,S.U., Muller,B.K., Richter,S., van Eeden,F.J., Nusslein-Volhard,C., and Bonhoeffer,F. (1996). Zebrafish mutations affecting retinotectal axon pathfinding. *Development* 123, 427-438.
- Kasher,P.R., Schertz,K.E., Thomas,M., Jackson,A., Annunziata,S., Ballesta-Martinez,M.J., Campeau,P.M., Clayton,P.E., Eaton,J.L., Granata,T., Guillen-Navarro,E., Hernando,C., Laverriere,C.E., Lieden,A., Villa-Marcos,O., McEntagart,M., Nordgren,A., Pantaleoni,C., Pebrel-Richard,C., Sarret,C., Sciacca,F.L., Wright,R., Kerr,B., Glasgow,E., and Banka,S. (2016). Small 6q16.1 Deletions Encompassing POU3F2 Cause Susceptibility to Obesity and Variable Developmental Delay with Intellectual Disability. *Am. J. Hum. Genet.* 98, 363-372.
- Kayser,M.S., Nolt,M.J., and Dalva,M.B. (2008). EphB receptors couple dendritic filopodia motility to synapse formation. *Neuron* 59, 56-69.
- Keene FL. (1936). The connexions of the posterior commissure. *Journal Of Anatomy* vol.lxxii, part 4.

- Kennedy,T.E., Serafini,T., de la Torre,J.R., and Tessier-Lavigne,M. (1994). Netrins are diffusible chemotropic factors for commissural axons in the embryonic spinal cord. *Cell* 78, 425-435.
- Kern,C.B., Hoffman,S., Moreno,R., Damon,B.J., Norris,R.A., Krug,E.L., Markwald,R.R., and Mjaatvedt,C.H. (2005). Immunolocalization of chick periostin protein in the developing heart. *Anat. Rec. A Discov. Mol. Cell Evol. Biol.* 284, 415-423.
- Kim,Y., Park,E., and Park,S. (2015). Identification of the 187 bp EphA7 Genomic DNA as the Dorsal Midline-Specific Enhancer of the Diencephalon and Mesencephalon. *Mol. Cells* 38, 1007-1012.
- Kiryushko,D., Berezin,V., and Bock,E. (2004). Regulators of neurite outgrowth: role of cell adhesion molecules. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1014, 140-154.
- Klambt,C. and Goodman,C.S. (1991). Role of the midline glia and neurons in the formation of the axon commissures in the central nervous system of the *Drosophila* embryo. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 633, 142-159.
- Kleene,R., Yang,H., Kutsche,M., and Schachner,M. (2001). The neural recognition molecule L1 is a sialic acid-binding lectin for CD24, which induces promotion and inhibition of neurite outgrowth. *J. Biol. Chem.* 276, 21656-21663.
- Kleene,R. and Schachner,M. (2004). Glycans and neural cell interactions. *Nat. Rev. Neurosci.* 5, 195-208.
- Klein,O.D., Cotter,P.D., Moore,M.W., Zanko,A., Gilats,M., Epstein,C.J., Conte,F., and Rauen,K.A. (2007). Interstitial deletions of chromosome 6q: genotype-phenotype correlation utilizing array CGH. *Clin. Genet.* 71, 260-266.
- Klein,R. (2004). Eph/ephrin signaling in morphogenesis, neural development and plasticity. *Curr. Opin. Cell Biol.* 16, 580-589.
- Knoll,B., Weinl,C., Nordheim,A., and Bonhoeffer,F. (2007). Stripe assay to examine axonal guidance and cell migration. *Nat. Protoc.* 2, 1216-1224.
- Kozulin,P., Natoli,R., Madigan,M.C., O'Brien,K.M., and Provis,J.M. (2009). Gradients of Eph-A6 expression in primate retina suggest roles in both vascular and axon guidance. *Mol. Vis.* 15, 2649-2662.
- Kuan,C.Y., Roth,K.A., Flavell,R.A., and Rakic,P. (2000). Mechanisms of programmed cell death in the developing brain. *Trends Neurosci.* 23, 291-297.
- Kuhn,T.B., Schmidt,M.F., and Kater,S.B. (1995). Laminin and fibronectin guideposts signal sustained but opposite effects to passing growth cones. *Neuron* 14, 275-285.
- Kullander,K., Croll,S.D., Zimmer,M., Pan,L., McClain,J., Hughes,V., Zabski,S., DeChiara,T.M., Klein,R., Yancopoulos,G.D., and Gale,N.W. (2001). Ephrin-B3 is the midline barrier that prevents corticospinal tract axons from recrossing, allowing for unilateral motor control. *Genes Dev.* 15, 877-888.
- Kullander,K. and Klein,R. (2002). Mechanisms and functions of Eph and ephrin signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3, 475-486.
- Kury,P., Zickler,P., Stoll,G., Hartung,H.P., and Jander,S. (2005). Osteopontin, a macrophage-derived matricellular glycoprotein, inhibits axon outgrowth. *FASEB J.* 19, 398-400.
- Kwok,J.C., Dick,G., Wang,D., and Fawcett,J.W. (2011). Extracellular matrix and perineuronal nets in CNS repair. *Dev. Neurobiol.* 71, 1073-1089.
- Lander,A.D., Fujii,D.K., and Reichardt,L.F. (1985). Laminin is associated with the "neurite outgrowth-promoting factors" found in conditioned media. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 82, 2183-2187.
- Lathia,J.D., Patton,B., Eckley,D.M., Magnus,T., Mughal,M.R., Sasaki,T., Caldwell,M.A., Rao,M.S., Mattson,M.P., and French-Constant,C. (2007). Patterns of laminins and integrins in the embryonic ventricular zone of the CNS. *J. Comp Neurol.* 505, 630-643.
- Lawler,J. (2002). Thrombospondin-1 as an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *J. Cell Mol. Med.* 6, 1-12.

- Lee,H., Park,E., Kim,Y., and Park,S. (2013). EphrinA5-EphA7 complex induces apoptotic cell death via TNFR1. *Mol. Cells* 35 , 450-455.
- Lee,H., Park,S., Kang,Y.S., and Park,S. (2015). EphA receptors form a complex with caspase-8 to induce apoptotic cell death. *Mol. Cells* 38, 349-355.
- Lee,M.Y., Choi,J.S., Lim,S.W., Cha,J.H., Chun,M.H., and Chung,J.W. (2001). Expression of osteopontin mRNA in developing rat brainstem and cerebellum. *Cell Tissue Res.* 306, 179-185.
- Leu,S.T., Jacques,S.A., Wingerd,K.L., Hikita,S.T., Tolhurst,E.C., Pring,J.L., Wiswell,D., Kinney,L., Goodman,N.L., Jackson,D.Y., and Clegg,D.O. (2004). Integrin alpha4beta1 function is required for cell survival in developing retina. *Dev. Biol.* 276, 416-430.
- Liaw,L., Almeida,M., Hart,C.E., Schwartz,S.M., and Giachelli,C.M. (1994). Osteopontin promotes vascular cell adhesion and spreading and is chemotactic for smooth muscle cells in vitro. *Circ. Res.* 74, 214-224.
- Liesi,P., Narvanen,A., Soos,J., Sariola,H., and Snounou,G. (1989). Identification of a neurite outgrowth-promoting domain of laminin using synthetic peptides. *FEBS Lett.* 244, 141-148.
- Lim,Y.S., McLaughlin,T., Sung,T.C., Santiago,A., Lee,K.F., and O'Leary,D.D. (2008). p75(NTR) mediates ephrin-A reverse signaling required for axon repulsion and mapping. *Neuron* 59, 746-758.
- Lisabeth,E.M., Falivelli,G., and Pasquale,E.B. (2013). Eph receptor signaling and ephrins. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 5.
- Louvi,A. and Wassef,M. (2000). Ectopic engrailed 1 expression in the dorsal midline causes cell death, abnormal differentiation of circumventricular organs and errors in axonal pathfinding. *Development* 127, 4061-4071.
- Lowery,L.A. and Van,V.D. (2009). The trip of the tip: understanding the growth cone machinery. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10, 332-343.
- Lund,A.W., Stegemann,J.P., and Plopper,G.E. (2009). Mesenchymal Stem Cells Sense Three Dimensional Type I Collagen through Discoidin Domain Receptor 1. *Open. Stem Cell J.* 1, 40-53.
- Ma,L., Shen,H.F., Shen,Y.Q., and Schachner,M. (2016). The Adhesion Molecule-Characteristic HNK-1 Carbohydrate Contributes to Functional Recovery After Spinal Cord Injury in Adult Zebrafish. *Mol. Neurobiol.*
- Malik,A.R., Liszewska,E., and Jaworski,J. (2015). Matricellular proteins of the Cyr61/CTGF/NOV (CCN) family and the nervous system. *Front Cell Neurosci.* 9, 237.
- Marin,O., Blanco,M.J., and Nieto,M.A. (2001). Differential expression of Eph receptors and ephrins correlates with the formation of topographic projections in primary and secondary visual circuits of the embryonic chick forebrain. *Dev. Biol.* 234, 289-303.
- Marler,K.J., Becker-Barroso,E., Martinez,A., Llovera,M., Wentzel,C., Poopalasundaram,S., Hindges,R., Soriano,E., Comella,J., and Drescher,U. (2008). A TrkB/EphrinA interaction controls retinal axon branching and synaptogenesis. *J. Neurosci.* 28, 12700-12712.
- Marti,E., Takada,R., Bumcrot,D.A., Sasaki,H., and McMahon,A.P. (1995). Distribution of Sonic hedgehog peptides in the developing chick and mouse embryo. *Development* 121, 2537-2547.
- Martini,R. (1994). Expression and functional roles of neural cell surface molecules and extracellular matrix components during development and regeneration of peripheral nerves. *J. Neurocytol.* 23, 1-28.
- Mastick,G.S., Davis,N.M., Andrew,G.L., and Easter,S.S., Jr. (1997). Pax-6 functions in boundary formation and axon guidance in the embryonic mouse forebrain. *Development* 124, 1985-1997.
- Masu,M. (2015). Proteoglycans and axon guidance: a new relationship between old partners. *J. Neurochem.*
- Masuda,T., Sakuma,C., Kobayashi,K., Kikuchi,K., Soda,E., Shiga,T., Kobayashi,K., and Yaginuma,H. (2009). Laminin peptide YIGSR and its receptor regulate sensory axonal

- response to the chemoattractive guidance cue in the chick embryo. *J. Neurosci. Res.* **87**, 353-359.
- Matise,M.P., Lustig,M., Sakurai,T., Grumet,M., and Joyner,A.L. (1999). Ventral midline cells are required for the local control of commissural axon guidance in the mouse spinal cord. *Development* **126**, 3649-3659.
- McLaughlin,T., Hindges,R., and O'Leary,D.D. (2003). Regulation of axial patterning of the retina and its topographic mapping in the brain. *Curr. Opin. Neurobiol.* **13**, 57-69.
- McLaughlin,T., Lim,Y.S., Santiago,A., and O'Leary,D.D. (2014). Multiple EphB receptors mediate dorsal-ventral retinotopic mapping via similar bi-functional responses to ephrin-B1. *Mol. Cell Neurosci.* **63**, 24-30.
- Meima,L., Moran,P., Matthews,W., and Caras,I.W. (1997). Lerk2 (ephrin-B1) is a collapsing factor for a subset of cortical growth cones and acts by a mechanism different from AL-1 (ephrin-A5). *Mol. Cell Neurosci.* **9**, 314-328.
- Meiniel,A. (2001). SCO-spondin, a glycoprotein of the subcommissural organ/Reissner's fiber complex: evidence of a potent activity on neuronal development in primary cell cultures. *Microsc. Res. Tech.* **52**, 484-495.
- Meiniel,A., Meiniel,R., Goncalves-Mendes,N., Creveaux,I., Didier,R., and Dastugue,B. (2003). The thrombospondin type 1 repeat (TSR) and neuronal differentiation: roles of SCO-spondin oligopeptides on neuronal cell types and cell lines. *Int. Rev. Cytol.* **230**, 1-39.
- Meiniel,O., Meiniel,R., Lalloue,F., Didier,R., Jauberteau,M.O., Meiniel,A., and Petit,D. (2008). The lengthening of a giant protein: when, how, and why? *J. Mol. Evol.* **66**, 1-10.
- Midwood,K.S. and Orend,G. (2009). The role of tenascin-C in tissue injury and tumorigenesis. *J. Cell Commun. Signal.* **3**, 287-310.
- Mihrshahi,R. (2006). The corpus callosum as an evolutionary innovation. *J. Exp. Zool. B Mol. Dev. Evol.* **306**, 8-17.
- Miller,G.M. and Hsieh-Wilson,L.C. (2015). Sugar-dependent modulation of neuronal development, regeneration, and plasticity by chondroitin sulfate proteoglycans. *Exp. Neurol.* **274**, 115-125.
- Milner,R. and Campbell,I.L. (2002). The integrin family of cell adhesion molecules has multiple functions within the CNS. *J. Neurosci. Res.* **69**, 286-291.
- Miura,R., Ethell,I.M., and Yamaguchi,Y. (2001). Carbohydrate-protein interactions between HNK-1-reactive sulfoglucuronyl glycolipids and the proteoglycan lectin domain mediate neuronal cell adhesion and neurite outgrowth. *J. Neurochem.* **76**, 413-424.
- Monschau,B., Kremoser,C., Ohta,K., Tanaka,H., Kaneko,T., Yamada,T., Handwerker,C., Hornberger,M.R., Loschinger,J., Pasquale,E.B., Siever,D.A., Verderame,M.F., Muller,B.K., Bonhoeffer,F., and Drescher,U. (1997). Shared and distinct functions of RAGS and ELF-1 in guiding retinal axons. *EMBO J.* **16**, 1258-1267.
- Mori, H., Sugimura, H., Suzuki, M and Bunai, T. (2007). EphA7 (EPH receptor A7). *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol.* **11**(3):186-187.
- Mueller,B.K. (1999). Growth cone guidance: first steps towards a deeper understanding. *Annu. Rev. Neurosci.* **22**, 351-388.
- Munoz-Sanjuan,I. and Brivanlou,A.H. (2002). Neural induction, the default model and embryonic stem cells. *Nat. Rev. Neurosci.* **3**, 271-280.
- Murakami,F. and Shirasaki,R. (1997). Guidance of circumferentially growing axons by the floor plate in the vertebrate central nervous system. *Cell Tissue Res.* **290**, 323-330.
- Myers,J.P., Santiago-Medina,M., and Gomez,T.M. (2011). Regulation of axonal outgrowth and pathfinding by integrin-ECM interactions. *Dev. Neurobiol.* **71**, 901-923.
- Nakamoto,M., Cheng,H.J., Friedman,G.C., McLaughlin,T., Hansen,M.J., Yoon,C.H., O'Leary,D.D., and Flanagan,J.G. (1996). Topographically specific effects of ELF-1 on retinal axon guidance in vitro and retinal axon mapping in vivo. *Cell* **86**, 755-766.

- Nakamoto,T., Kain,K.H., and Ginsberg,M.H. (2004). Neurobiology: New connections between integrins and axon guidance. *Curr. Biol.* *14*, R121-R123.
- Nakamura,R., Nakamura,F., and Fukunaga,S. (2015). Diverse functions of perlecan in central nervous system cells in vitro. *Anim Sci. J.* *86*, 904-911.
- Nakazawa,N., Miyahara,K., Okawada,M., Yamataka,A., Suzuki,R., Akazawa,C., Tomikawa-Ichikawa,N., and Arikawa-Hirasawa,E. (2013). Laminin-1 promotes enteric nervous system development in mouse embryo. *Pediatr. Surg. Int.* *29*, 1205-1208.
- Neidhardt,J., Fehr,S., Kutsche,M., Lohler,J., and Schachner,M. (2003). Tenascin-N: characterization of a novel member of the tenascin family that mediates neurite repulsion from hippocampal explants. *Mol. Cell Neurosci.* *23*, 193-209.
- Neuhaus-Follini,A. and Bashaw,G.J. (2015). Crossing the embryonic midline: molecular mechanisms regulating axon responsiveness at an intermediate target. *Wiley. Interdiscip. Rev. Dev. Biol.* *4*, 377-389.
- Nikolov,D.B., Xu,K., and Himanen,J.P. (2013). Eph/ephrin recognition and the role of Eph/ephrin clusters in signaling initiation. *Biochim. Biophys. Acta* *1834*, 2160-2165.
- Noctor,S.C., Flint,A.C., Weissman,T.A., Dammerman,R.S., and Kriegstein,A.R. (2001). Neurons derived from radial glial cells establish radial units in neocortex. *Nature* *409*, 714-720.
- Noraz,N., Jaaoini,I., Charoy,C., Watrin,C., Chounlamountri,N., Benon,A., Malleval,C., Boudin,H., Honnorat,J., Castellani,V., and Pellier-Monnin,V. (2016). Syk kinases are required for spinal commissural axon repulsion at the midline via the ephrin/Eph pathway. *Development* *143*, 2183-2193.
- O'Leary,D.D. and Wilkinson,D.G. (1999). Eph receptors and ephrins in neural development. *Curr. Opin. Neurobiol.* *9*, 65-73.
- Ong,E., Suzuki,M., Belot,F., Yeh,J.C., Franceschini,I., Angata,K., Hindsgaul,O., and Fukuda,M. (2002). Biosynthesis of HNK-1 glycans on O-linked oligosaccharides attached to the neural cell adhesion molecule (NCAM): the requirement for core 2 beta 1,6-N-acetylglucosaminyltransferase and the muscle-specific domain in NCAM. *J. Biol. Chem.* *277*, 18182-18190.
- Orioli,D., Henkemeyer,M., Lemke,G., Klein,R., and Pawson,T. (1996). Sek4 and Nuk receptors cooperate in guidance of commissural axons and in palate formation. *EMBO J.* *15*, 6035-6049.
- Ozdemir,N.G. (2015). The Anatomy of the Posterior Commissure. *Turk. Neurosurg.* *25*, 837-843.
- Paixao,S., Balijepalli,A., Serradj,N., Niu,J., Luo,W., Martin,J.H., and Klein,R. (2013). EphrinB3/EphA4-mediated guidance of ascending and descending spinal tracts. *Neuron* *80*, 1407-1420.
- Park,E., Kim,Y., Noh,H., Lee,H., Yoo,S., and Park,S. (2013). EphA/ephrin-A signaling is critically involved in region-specific apoptosis during early brain development. *Cell Death. Differ.* *20*, 169-180.
- Park,S. (2013). Brain-Region Specific Apoptosis Triggered by Eph/ephrin Signaling. *Exp. Neurobiol.* *22*, 143-148.
- Pasquale,E.B. (2005). Eph receptor signalling casts a wide net on cell behaviour. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *6*, 462-475.
- Paulus,J.D. and Halloran,M.C. (2006). Zebrafish bashful/laminin-alpha 1 mutants exhibit multiple axon guidance defects. *Dev. Dyn.* *235*, 213-224.
- Perry,V.H., Brown,M.C., and Gordon,S. (1987). The macrophage response to central and peripheral nerve injury. A possible role for macrophages in regeneration. *J. Exp. Med.* *165*, 1218-1223.
- Pesheva,P. and Probstmeier,R. (2000). The yin and yang of tenascin-R in CNS development and pathology. *Prog. Neurobiol.* *61*, 465-493.

- Peters, M.A. and Cepko, C.L. (2002). The dorsal-ventral axis of the neural retina is divided into multiple domains of restricted gene expression which exhibit features of lineage compartments. *Dev. Biol.* 251, 59-73.
- Philipp, M., Niederkofler, V., Debrunner, M., Alther, T., Kunz, B., and Stoeckli, E.T. (2012). RabGDI controls axonal midline crossing by regulating Robo1 surface expression. *Neural Dev.* 7, 36.
- Pires Neto, M.A., Braga-de-Souza, S., and Lent, R. (1999). Extracellular matrix molecules play diverse roles in the growth and guidance of central nervous system axons. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 32, 633-638.
- Plantman, S. (2012). Osteopontin is upregulated after mechanical brain injury and stimulates neurite growth from hippocampal neurons through beta1 integrin and CD44. *Neuroreport* 23, 647-652.
- Pokutta, S. and Weis, W.I. (2002). The cytoplasmic face of cell contact sites. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 12, 255-262.
- Puelles, L. and Rubenstein, J.L. (1993). Expression patterns of homeobox and other putative regulatory genes in the embryonic mouse forebrain suggest a neuromeric organization. *Trends Neurosci.* 16, 472-479.
- Purves D. (2004). *Neuroscience: Third Edition*. Sinauer Associates, Inc.
- Ramón y Cajal S. (1909). *Histologie du système nerveux de l'homme et des vertébrés*, vol. 1, Paris: A. Maloine.
- Ramos, C., Fernandez-Llebrez, P., Bach, A., Robert, B., and Soriano, E. (2004). Msx1 disruption leads to diencephalon defects and hydrocephalus. *Dev. Dyn.* 230, 446-460.
- Rashid, T., Upton, A.L., Blentic, A., Ciossek, T., Knoll, B., Thompson, I.D., and Drescher, U. (2005). Opposing gradients of ephrin-As and EphA7 in the superior colliculus are essential for topographic mapping in the mammalian visual system. *Neuron* 47, 57-69.
- Rauch, U., Zhou, X.H., and Roos, G. (2005). Extracellular matrix alterations in brains lacking four of its components. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 328, 608-617.
- Reinholt, F.P., Hultenby, K., Oldberg, A., and Heinegard, D. (1990). Osteopontin--a possible anchor of osteoclasts to bone. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 87, 4473-4475.
- Ries, A., Goldberg, J.L., and Grimpe, B. (2007). A novel biological function for CD44 in axon growth of retinal ganglion cells identified by a bioinformatics approach. *J. Neurochem.* 103, 1491-1505.
- Ring, C., Lemmon, V., and Halfter, W. (1995). Two chondroitin sulfate proteoglycans differentially expressed in the developing chick visual system. *Dev. Biol.* 168, 11-27.
- Roberts, D.D. (2011). Emerging functions of matricellular proteins. *Cell Mol. Life Sci.* 68, 3133-3136.
- Robichaux, M.A. and Cowan, C.W. (2014). Signaling mechanisms of axon guidance and early synaptogenesis. *Curr. Top. Behav. Neurosci.* 16, 19-48.
- Robichaux, M.A., Chenuaux, G., Ho, H.Y., Soskis, M.J., Greenberg, M.E., Henkemeyer, M., and Cowan, C.W. (2016). EphB1 and EphB2 intracellular domains regulate the formation of the corpus callosum and anterior commissure. *Dev. Neurobiol.* 76, 405-420.
- Rodriguez, E.M., Oksche, A., Hein, S., and Yulis, C.R. (1992). Cell biology of the subcommissural organ. *Int. Rev. Cytol.* 135, 39-121.
- Rodriguez, E.M., Rodriguez, S., and Hein, S. (1998). The subcommissural organ. *Microsc. Res. Tech.* 41, 98-123.
- Rogers, S.L., Edson, K.J., Letourneau, P.C., and McLoon, S.C. (1986). Distribution of laminin in the developing peripheral nervous system of the chick. *Dev. Biol.* 113, 429-435.
- Rubenstein, J.L., Martinez, S., Shimamura, K., and Puelles, L. (1994). The embryonic vertebrate forebrain: the prosomeric model. *Science* 266, 578-580.
- Rutka, J.T., Apodaca, G., Stern, R., and Rosenblum, M. (1988). The extracellular matrix of the central and peripheral nervous systems: structure and function. *J. Neurosurg.* 69, 155-170.

- Sann,S., Wang,Z., Brown,H., and Jin,Y. (2009). Roles of endosomal trafficking in neurite outgrowth and guidance. *Trends Cell Biol.* *19*, 317-324.
- Santiago-Medina,M., Gregus,K.A., Nichol,R.H., O'Toole,S.M., and Gomez,T.M. (2015). Regulation of ECM degradation and axon guidance by growth cone invadosomes. *Development* *142*, 486-496.
- Scalia,F., Currie,J.R., and Feldheim,D.A. (2009). Eph/ephrin gradients in the retinotectal system of *Rana pipiens*: developmental and adult expression patterns. *J. Comp Neurol.* *514*, 30-48.
- Schafer,M., Kinzel,D., and Winkler,C. (2007). Discontinuous organization and specification of the lateral floor plate in zebrafish. *Dev. Biol.* *301*, 117-129.
- Schafer,M.K., Nam,Y.C., Moumen,A., Keglwich,L., Bouche,E., Kuffner,M., Bock,H.H., Rathjen,F.G., Raoul,C., and Frotscher,M. (2010). L1 syndrome mutations impair neuronal L1 function at different levels by divergent mechanisms. *Neurobiol. Dis.* *40*, 222-237.
- Schaupp,A., Sabet,O., Dudanova,I., Ponserre,M., Bastiaens,P., and Klein,R. (2014). The composition of EphB2 clusters determines the strength in the cellular repulsion response. *J. Cell Biol.* *204*, 409-422.
- Schmalfeldt,M., Bandtlow,C.E., Dours-Zimmermann,M.T., Winterhalter,K.H., and Zimmermann,D.R. (2000). Brain derived versican V2 is a potent inhibitor of axonal growth. *J. Cell Sci.* *113* ( Pt 5), 807-816.
- Schmechel,D.E. and Rakic,P. (1979). Arrested proliferation of radial glial cells during midgestation in rhesus monkey. *Nature* *277*, 303-305.
- Schoenwolf,G.C. and Smith,J.L. (1990). Mechanisms of neurulation: traditional viewpoint and recent advances. *Development* *109*, 243-270.
- Scholzen,T., Solursh,M., Suzuki,S., Reiter,R., Morgan,J.L., Buchberg,A.M., Siracusa,L.D., and Iozzo,R.V. (1994). The murine decorin. Complete cDNA cloning, genomic organization, chromosomal assignment, and expression during organogenesis and tissue differentiation. *J. Biol. Chem.* *269*, 28270-28281.
- Schweitzer,J., Becker,T., Lefebvre,J., Granato,M., Schachner,M., and Becker,C.G. (2005). Tenascin-C is involved in motor axon outgrowth in the trunk of developing zebrafish. *Dev. Dyn.* *234*, 550-566.
- Senn,C., Kutsche,M., Saghatelian,A., Bosl,M.R., Lohler,J., Bartsch,U., Morellini,F., and Schachner,M. (2002). Mice deficient for the HNK-1 sulfotransferase show alterations in synaptic efficacy and spatial learning and memory. *Mol. Cell Neurosci.* *20*, 712-729.
- Sharfe,N., Nikolic,M., Cimpeon,L., Van De Kratts,A., Freywald,A., and Roifman,C.M. (2008). EphA and ephrin-A proteins regulate integrin-mediated T lymphocyte interactions. *Mol. Immunol.* *45*, 1208-1220.
- Shay,E.L., Greer,C.A., and Treloar,H.B. (2008). Dynamic expression patterns of ECM molecules in the developing mouse olfactory pathway. *Dev. Dyn.* *237*, 1837-1850.
- Shiga,T. and Oppenheim,R.W. (1991). Immunolocalization studies of putative guidance molecules used by axons and growth cones of intersegmental interneurons in the chick embryo spinal cord. *J. Comp Neurol.* *310*, 234-252.
- Short,C.A., Suarez-Zayas,E.A., and Gomez,T.M. (2016). Cell adhesion and invasion mechanisms that guide developing axons. *Curr. Opin. Neurobiol.* *39*, 77-85.
- Short,S.M., Derrien,A., Narsimhan,R.P., Lawler,J., Ingber,D.E., and Zetter,B.R. (2005). Inhibition of endothelial cell migration by thrombospondin-1 type-1 repeats is mediated by beta1 integrins. *J. Cell Biol.* *168*, 643-653.
- Silver,J. and Miller,J.H. (2004). Regeneration beyond the glial scar. *Nat. Rev. Neurosci.* *5*, 146-156.
- Smith,J.L. and Schoenwolf,G.C. (1989). Notochordal induction of cell wedging in the chick neural plate and its role in neural tube formation. *J. Exp. Zool.* *250*, 49-62.

- Smith,J.L. and Schoenwolf,G.C. (1997). Neurulation: coming to closure. *Trends Neurosci.* *20*, 510-517.
- Smith,L.L., Cheung,H.K., Ling,L.E., Chen,J., Sheppard,D., Pytela,R., and Giachelli,C.M. (1996). Osteopontin N-terminal domain contains a cryptic adhesive sequence recognized by alpha9beta1 integrin. *J. Biol. Chem.* *271*, 28485-28491.
- Soskis,M.J., Ho,H.Y., Bloodgood,B.L., Robichaux,M.A., Malik,A.N., Ataman,B., Rubin,A.A., Zieg,J., Zhang,C., Shokat,K.M., Sharma,N., Cowan,C.W., and Greenberg,M.E. (2012). A chemical genetic approach reveals distinct EphB signaling mechanisms during brain development. *Nat. Neurosci.* *15*, 1645-1654.
- Soulintzi,N. and Zagris,N. (2007). Spatial and temporal expression of perlecan in the early chick embryo. *Cells Tissues. Organs* *186*, 243-256.
- Stanic,K., Montecinos,H., and Caprile,T. (2010). Subdivisions of chick diencephalic roof plate: implication in the formation of the posterior commissure. *Dev. Dyn.* *239*, 2584-2593.
- Stanic,K., Vera,A., Gonzalez,M., Recabal,A., Astuya,A., Torrejon,M., Montecinos,H., and Caprile,T. (2014). Complementary expression of EphA7 and SCO-spondin during posterior commissure development. *Front Neuroanat.* *8*, 49.
- Stemple,D.L. (2005). Structure and function of the notochord: an essential organ for chordate development. *Development* *132*, 2503-2512.
- Sterba,G., Kiessig,C., Naumann,W., Petter,H., and Kleim,I. (1982). The secretion of the subcommissural organ. A comparative immunocytochemical investigation. *Cell Tissue Res.* *226*, 427-439.
- Suh,L.H., Oster,S.F., Soehrman,S.S., Grenningloh,G., and Sretavan,D.W. (2004). L1/Laminin modulation of growth cone response to EphB triggers growth pauses and regulates the microtubule destabilizing protein SCG10. *J. Neurosci.* *24*, 1976-1986.
- Tai,A.X. and Kromer,L.F. (2014). Corticofugal projections from medial primary somatosensory cortex avoid EphA7-expressing neurons in striatum and thalamus. *Neuroscience* *274*, 409-418.
- Takahashi,H., Shintani,T., Sakuta,H., and Noda,M. (2003). CBF1 controls the retinotectal topographical map along the anteroposterior axis through multiple mechanisms. *Development* *130*, 5203-5215.
- Tamariz,E. and Varela-Echavarria,A. (2015). The discovery of the growth cone and its influence on the study of axon guidance. *Front Neuroanat.* *9*, 51.
- Tear,G. (1999). Axon guidance at the central nervous system midline. *Cell Mol. Life Sci.* *55*, 1365-1376.
- Tessier-Lavigne,M. and Goodman,C.S. (1996). The molecular biology of axon guidance. *Science* *274*, 1123-1133.
- Thayer,J.M., Giachelli,C.M., Mirkes,P.E., and Schwartz,S.M. (1995). Expression of osteopontin in the head process late in gastrulation in the rat. *J. Exp. Zool.* *272*, 240-244.
- Thayer,J.M. and Schoenwolf,G.C. (1998). Early expression of Osteopontin in the chick is restricted to rhombomeres 5 and 6 and to a subpopulation of neural crest cells that arise from these segments. *Anat. Rec.* *250*, 199-209.
- Torii,M., Hackett,T.A., Rakic,P., Levitt,P., and Polley,D.B. (2013). EphA signaling impacts development of topographic connectivity in auditory corticofugal systems. *Cereb. Cortex* *23*, 775-785.
- Traylor,R.N., Fan,Z., Hudson,B., Rosenfeld,J.A., Shaffer,L.G., Torchia,B.S., and Ballif,B.C. (2009). Microdeletion of 6q16.1 encompassing EPHA7 in a child with mild neurological abnormalities and dysmorphic features: case report. *Mol. Cytogenet.* *2*, 17.
- Triplet,J.W. and Feldheim,D.A. (2012). Eph and ephrin signaling in the formation of topographic maps. *Semin. Cell Dev. Biol.* *23*, 7-15.
- Tucker,R.P., Hagios,C., Chiquet-Ehrismann,R., Lawler,J., Hall,R.J., and Erickson,C.A. (1999). Thrombospondin-1 and neural crest cell migration. *Dev. Dyn.* *214*, 312-322.

- Tucker,R.P. (2004). The thrombospondin type 1 repeat superfamily. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *36*, 969-974.
- Turney,S.G. and Bridgman,P.C. (2005). Laminin stimulates and guides axonal outgrowth via growth cone myosin II activity. *Nat. Neurosci.* *8*, 717-719.
- Tuzi,N.L. and Gullick,W.J. (1994). eph, the largest known family of putative growth factor receptors. *Br. J. Cancer* *69*, 417-421.
- Vera,A., Stanic,K., Montecinos,H., Torrejon,M., Marcellini,S., and Caprile,T. (2013). SCO-spondin from embryonic cerebrospinal fluid is required for neurogenesis during early brain development. *Front Cell Neurosci.* *7*, 80.
- Viapiano,M.S. and Matthews,R.T. (2006). From barriers to bridges: chondroitin sulfate proteoglycans in neuropathology. *Trends Mol. Med.* *12*, 488-496.
- Vielmetter,J., Stolze,B., Bonhoeffer,F., and Stuermer,C.A. (1990). In vitro assay to test differential substrate affinities of growing axons and migratory cells. *Exp. Brain Res.* *81*, 283-287.
- Vitriol,E.A. and Zheng,J.Q. (2012). Growth cone travel in space and time: the cellular ensemble of cytoskeleton, adhesion, and membrane. *Neuron* *73*, 1068-1081.
- Vogel,M., Zimmermann,H., and Singer,W. (1993). Transient association of the HNK-1 epitope with 5'-nucleotidase during development of the cat visual cortex. *Eur. J. Neurosci.* *5*, 1423-1425.
- Walter,J., Kern-Veits,B., Huf,J., Stolze,B., and Bonhoeffer,F. (1987). Recognition of position-specific properties of tectal cell membranes by retinal axons in vitro. *Development* *101*, 685-696.
- Wang,H. and Tessier-Lavigne,M. (1999). En passant neurotrophic action of an intermediate axonal target in the developing mammalian CNS. *Nature* *401*, 765-769.
- Wehrle,B. and Chiquet,M. (1990). Tenascin is accumulated along developing peripheral nerves and allows neurite outgrowth in vitro. *Development* *110*, 401-415.
- Weinl,C., Drescher,U., Lang,S., Bonhoeffer,F., and Loschinger,J. (2003). On the turning of *Xenopus* retinal axons induced by ephrin-A5. *Development* *130*, 1635-1643.
- Westerfield,M., McMurray,J.V., and Eisen,J.S. (1986). Identified motoneurons and their innervation of axial muscles in the zebrafish. *J. Neurosci.* *6*, 2267-2277.
- Wiksten,M., Liebkind,R., Laatikainen,T., and Liesi,P. (2003). Gamma 1 laminin and its biologically active KDI-domain may guide axons in the floor plate of human embryonic spinal cord. *J. Neurosci. Res.* *71*, 338-352.
- Williams,S.E., Mann,F., Erskine,L., Sakurai,T., Wei,S., Rossi,D.J., Gale,N.W., Holt,C.E., Mason,C.A., and Henkemeyer,M. (2003). Ephrin-B2 and EphB1 mediate retinal axon divergence at the optic chiasm. *Neuron* *39*, 919-935.
- Wolman,M.A., Sittaramane,V.K., Essner,J.J., Yost,H.J., Chandrasekhar,A., and Halloran,M.C. (2008). Transient axonal glycoprotein-1 (TAG-1) and laminin-alpha1 regulate dynamic growth cone behaviors and initial axon direction in vivo. *Neural Dev.* *3*, 6.
- Woo,S., Rowan,D.J., and Gomez,T.M. (2009). Retinotopic mapping requires focal adhesion kinase-mediated regulation of growth cone adhesion. *J. Neurosci.* *29*, 13981-13991.
- Woodworth,A., Pesheva,P., Fiete,D., and Baenziger,J.U. (2004). Neuronal-specific synthesis and glycosylation of tenascin-R. *J. Biol. Chem.* *279*, 10413-10421.
- Wright,M.C., Mi,R., Connor,E., Reed,N., Vyas,A., Alspalter,M., Coppola,G., Geschwind,D.H., Brushart,T.M., and Hoke,A. (2014). Novel roles for osteopontin and clusterin in peripheral motor and sensory axon regeneration. *J. Neurosci.* *34*, 1689-1700.
- Yagi,H., Yanagisawa,M., Suzuki,Y., Nakatani,Y., Ariga,T., Kato,K., and Yu,R.K. (2010). HNK-1 epitope-carrying tenascin-C spliced variant regulates the proliferation of mouse embryonic neural stem cells. *J. Biol. Chem.* *285*, 37293-37301.
- Yam,P.T. and Charron,F. (2013). Signaling mechanisms of non-conventional axon guidance cues: the Shh, BMP and Wnt morphogens. *Curr. Opin. Neurobiol.* *23*, 965-973.

- Yeo,W. and Gautier,J. (2004). Early neural cell death: dying to become neurons. *Dev. Biol.* *274*, 233-244.
- Yoshihara,T., Sugihara,K., Kizuka,Y., Oka,S., and Asano,M. (2009). Learning/memory impairment and reduced expression of the HNK-1 carbohydrate in beta4-galactosyltransferase-II-deficient mice. *J. Biol. Chem.* *284*, 12550-12561.
- Zaidi,A.U., Kafitz,K.W., Greer,C.A., and Zielinski,B.S. (1998). The expression of tenascin-C along the lamprey olfactory pathway during embryonic development and following axotomy-induced replacement of the olfactory receptor neurons. *Brain Res. Dev. Brain Res.* *109*, 157-168.
- Zhang,J.H., Cerretti,D.P., Yu,T., Flanagan,J.G., and Zhou,R. (1996). Detection of ligands in regions anatomically connected to neurons expressing the Eph receptor Bsk: potential roles in neuron-target interaction. *J. Neurosci.* *16*, 7182-7192.
- Zherebtsov,M.M., Klein,R.T., Aviv,H., Toruner,G.A., Hanna,N.N., and Brooks,S.S. (2007). Further delineation of interstitial chromosome 6 deletion syndrome and review of the literature. *Clin. Dysmorphol.* *16*, 135-140.
- Zhou,R. (1998). The Eph family receptors and ligands. *Pharmacol. Ther.* *77*, 151-181.
- Zhou,X.H., Brakebusch,C., Matthies,H., Oohashi,T., Hirsch,E., Moser,M., Krug,M., Seidenbecher,C.I., Boeckers,T.M., Rauch,U., Buettner,R., Gundelfinger,E.D., and Fassler,R. (2001). Neurocan is dispensable for brain development. *Mol. Cell Biol.* *21*, 5970-5978.
- Zimmermann,D.R. and Dours-Zimmermann,M.T. (2008). Extracellular matrix of the central nervous system: from neglect to challenge. *Histochem. Cell Biol.* *130*, 635-653.

