



**New insights into development of the  
habenular complex and the fasciculus  
retroflexus**

***Doctoral Thesis presented by***

**Verónica Company Devesa**

**Thesis Director: Eduardo de Puelles Martínez de la Torre**

**Thesis Co-Director: Diego Echevarría Aza**

*PhD Program in Neuroscience*

*Neurosciences Institute*

*University Miguel Hernández de Elche*

- 2021 -







This Doctoral Thesis, entitled "New insights into development of the habenular complex and the fasciculus retroflexus" is presented as a compendium of the following publications:

- Netrin 1-Mediated Role of the Substantia Nigra Pars Compacta and Ventral Tegmental Area in the Guidance of the Medial Habenular Axons. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 9:682067. DOI:10.3389/fcell.2021.682067. Verónica Company, Abraham Andreu-Cervera, M. Pilar Madrigal, Belén Andrés, Francisca Almagro-García, Alain Chédotal, Guillermina López-Bendito, Salvador Martínez, Diego Echevarría, Juan A. Moreno-Bravo and Eduardo Puelles.
- Wnt1 role in the development of the Habenula and the fasciculus retroflexus. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 9:755729. DOI: 10.3389/fcell.2021.755729. Verónica Company, Ana Moreno-Cerdá, Abraham Andreu-Cervera, Raquel Murcia-Ramón, Francisca Almagro-García, Diego Echevarría, Salvador Martínez and Eduardo Puelles.





Dr. Eduardo de Puelles Martínez de la Torre, Director, and Dr. Diego Echevarría Aza, co-director of the doctoral thesis entitled "**New insights into development of the habenular complex and the fasciculus retroflexus**".

**CERTIFIES:**

That Mrs. *Verónica Company Devesa* has carried out under our supervision the work entitled "New insights into development of the habenular complex and the fasciculus retroflexus " in accordance with the terms and conditions defined in his/her Research Plan and in accordance with the Code of Good Practice of the University Miguel Hernández of Elche, satisfactorily fulfilling the objectives foreseen for its public defence as a doctoral thesis.

We sign for appropriate purposes,

Thesis director

Dr. D. Eduardo de Puelles Martínez de la Torre

Thesis co-director

Dr. D. Diego Echevarría Aza





Ms. Elvira de la Peña García, Coordinator of the Neurosciences PhD programme at the Institute of Neurosciences in Alicante, a joint centre of the Miguel Hernández University (UMH) and the Spanish National Research Council (CSIC),

INFORMS:

That Mrs. Verónica Company Devesa has carried out under the supervision of our PhD Programme the work entitled "**New insights into development of the habenular complex and the fasciculus retroflexus**" in accordance with the terms and conditions defined in its Research Plan and in accordance with the Code of Good Practice of the University Miguel Hernández de Elche, fulfilling the objectives satisfactorily for its public defence as a doctoral thesis.

Which I sign for the appropriate purposes,

Dr Elvira de la Peña García

Coordinator of the PhD Programme in Neurosciences

E-mail: [elvirap@umh.es](mailto:elvirap@umh.es)  
[www.in.umh.es](http://www.in.umh.es)

Tel: +34 965 919533  
Fax: +34 965 919549

Av Ramón y Cajal s/n  
SANT JOAN CAMPUS  
03550 SANT JOAN D'ALACANT- SPAIN







To whom it may concern:

The doctoral thesis entitled "New insights into development of the habenular complex and the fasciculus retroflexus" carried out by Verónica Company Devesa (DNI 48331984Z) at the Instituto de Neurociencias de Alicante, a joint centre of the Miguel Hernández University (UMH) and the Spanish National Research Council (CSIC), has been supported by the "Ayudas para la Formación del Profesorado Universitario (FPU16/03853)" and its complementary grants "Ayudas complementarias de Movilidad".



- *¿Per què ho intentes sempre?*
- *Per demostrar que la voluntat pot més que la força*
- *Però mai has guanyat ni ho faràs*
- *Tampoc m'he rendit mai ni ho faré*

*La meua pau*



*A mis padres*



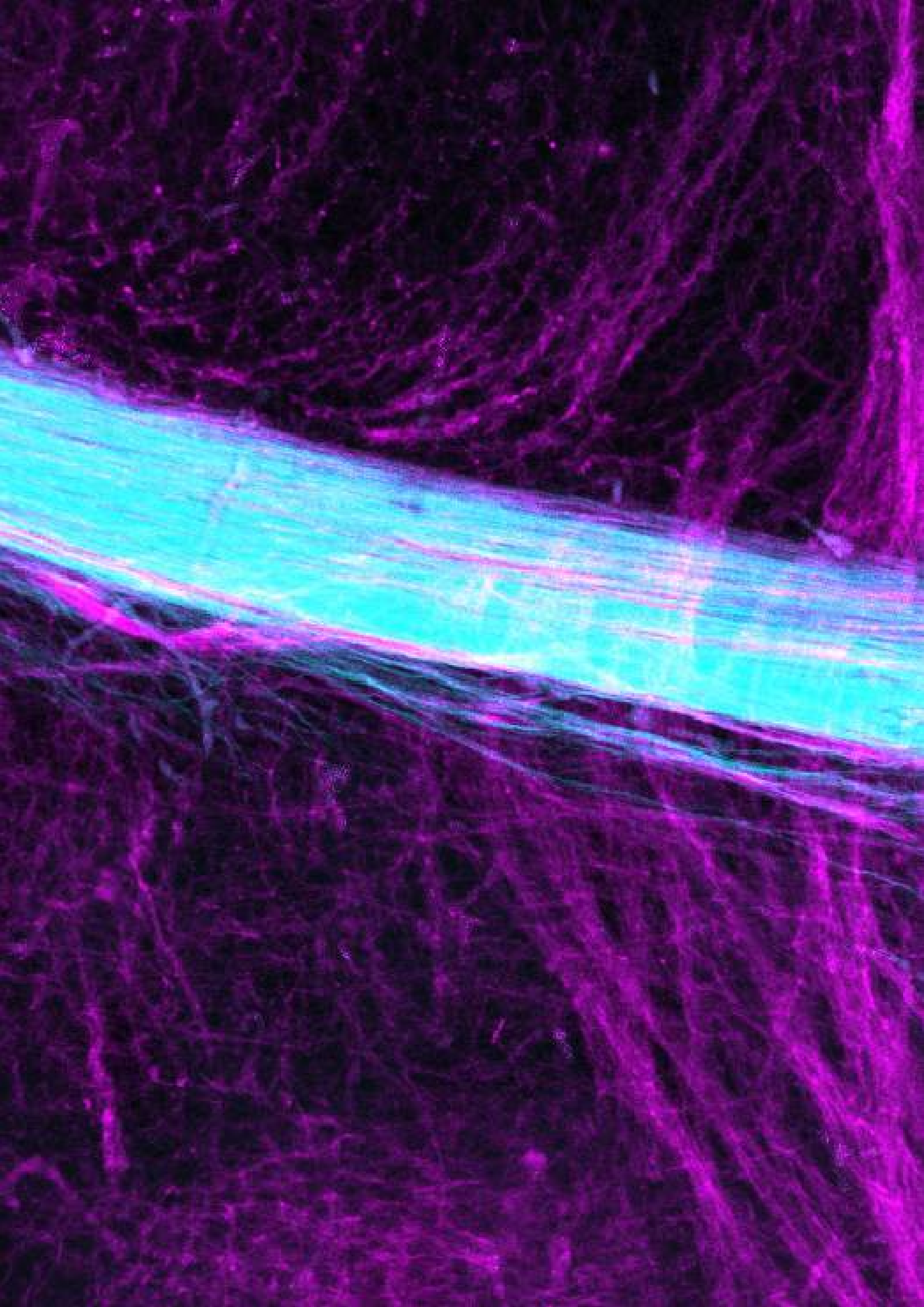
# Índice

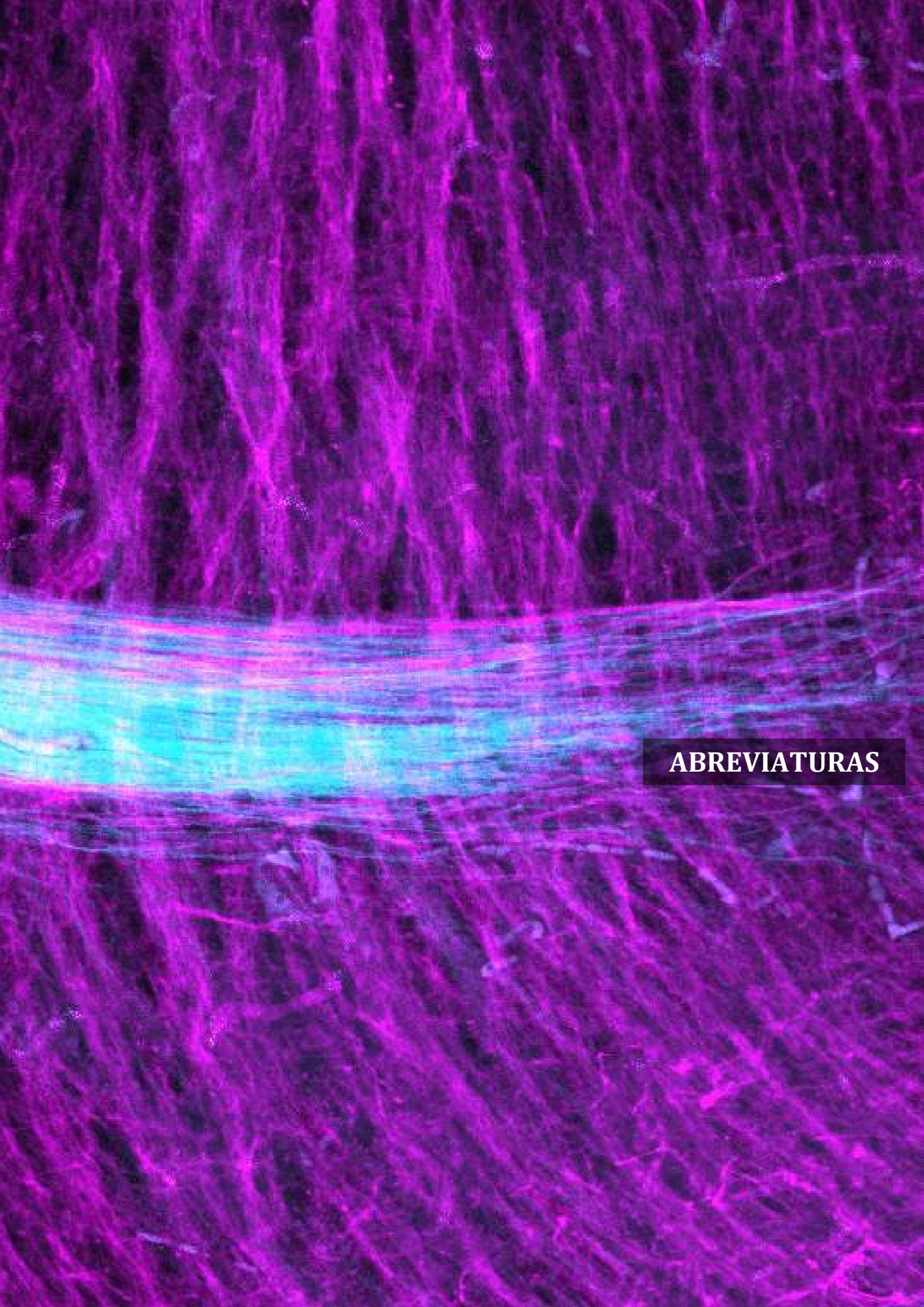
Abreviaturas .....	1
Resumen .....	11
Abstract .....	13
Introducción y Objetivos.....	19
1. Desarrollo del Sistema Nervioso Central .....	19
1.1 Neurulación .....	19
1.2 Vesiculación y segmentación.....	20
Familia de proteínas WINGLESS-INT (WNT) .....	23
1.3 Proliferación y diferenciación.....	26
1.4 Migración neuronal .....	28
1.5 Guía axonal: .....	30
Familias de moléculas de guía axonal: .....	31
Dianas intermedias.....	34
Fasciculación.....	35
2. La Habénula y el fascículo retroflejo .....	36
2.1 El sistema límbico.....	36
2.2 El complejo de la Habénula (Hb) .....	36
2.3 Desarrollo del núcleo habenular .....	40
2.4 Conectividad del núcleo habenular .....	40
2.5 Función del núcleo habenular.....	43
2.6 El fascículo retroflejo (fr) .....	44
2.7 Trayectoria del fr en el contexto del paradigma prosomérico .....	44
2.8 Guía axonal del fr en desarrollo .....	45
Amigo2: .....	47
3. Objetivos .....	49
Materiales y métodos .....	53
Discusión .....	79
Conclusiones .....	91
Conclusions .....	93

Referencias bibliográficas .....	97
Anexos .....	117
Anexo 1A: .....	117
Rol mediado por Netrin 1 de la Sustancia Negra Pars Compacta y el Área Tegmental Ventral en la guía de los axones habenulares mediales	
Netrin 1-Mediated Role of the Substantia Nigra Pars Compacta and Ventral Tegmental Area in the Guidance of the Medial Habenular Axons	
Anexo 1B: .....	135
Rol de Wnt1 en el desarrollo de la Habénula y el fascículo retroflejo	
Wnt1 role in the development of the Habenula and the fasciculus retroflexus	
Anexo 2: .....	151
La molécula de adhesión Amigo 2 está involucrada en el proceso de fasciculación del fascículo retroflejo	
Adhesion molecule Amigo2 is involved in the fasciculation process of the fasciculus retroflexus	
Agradecimientos .....	179









## ABREVIATURAS



## Abreviaturas

ABC	Complejo Avidina-Biotina	Avidin-biotin complex
ac	Comisura anterior	Anterior commissure
ADN	Ácido desoxirribonucleico	Deoxyribonucleic acid
Amigo2	Molécula de adhesión con un dominio similar a inmunoglobulina 2	Adhesion molecule with immunoglobulin like domain 2
ANR	Cresta Neural Anterior	Anterior Neural Ridge
AP	Anteroposterior	Anteroposterior
APC	Adenomatous Polyposis Coli	Adenomatous Polyposis Coli
BMP	Proteína Morfogenética del hueso	Bone Morphogenetic Protein
bp	Pares de bases	Base pairs
BCIP	5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate
BDE	Bencil eter	Benzyl ether
BrdU	Bromodesoxiuridina	Bromodeoxyuridine
Br3a	Homeobox 1 con dominio POU Clase 4	POU Class 4 Homeobox 1
BSA	Albúmina de suero bovino	Bovine Serum Albumin
Calb	Calbindina	Calbindin
CAM	Molécula de adhesión celular	Cellular adhesión molecule
cb	Cerebelo	Cerebellum
cc	Cuerpo calloso	Corpus callosum
Chat	Colinacetiltransferasa	Choline acetyltransferase

Cntn2	Contactina2	Contactine2
Comm	Commisureless	Commisureless
CP	Placa cortical	Cortical plate
CSP	Prosencéfalo secundario caudal	Caudal secondary prosencephalon
CV	Cresil Violeta	Cresyl Violet
D	Diencéfalo	Diencephalon
DAB	3,3'-Diaminobenzidina	3,3'-Diaminobenzidine
DAPI	4'-6'-Diamidino-2-Fenilindol	4'-6'-Fiamidino-2-Phenylindole
DBB	Banda diagonal de Broca	Diagonal band of Broca
DBE	Dibenziléter	Dibenzylether
Dcc	Deleted in colorrectal cancer	Deleted in colorrectal cancer
DCM	Diclorometano	Dichloromethane
dHb	Habénula dorsal	Dorsal habenula
DIG	Digoxigenina	Dioxigenin
DiI	1,1'-dioctadecil 3,3,3',3'-tetra- metilindicarbo-cianina perclorato	1,1'-dioctadecyl 3,3,3',3'-tetra- methylindicarbo-cyanine perchlorate
DiD	1,1'-dioctadecil 3,3,3',3'-tetra- metilindodicarbo-cianina clorobenzeno sulfonato	1,1'-dioctadecyl 3,3,3',3'-tetra- methylindodicarbo-cyanine clorobenzeno sulfonate
DMSO	Dimetilsulfóxido	Dimetilsulfóxido
DNTPs	Desoxirribonucleótidos trifosfato	Deoxynucleotide Triphosphates
Dscam	Molécula de adhesión celular del Síndrome de Down	Down's syndrome Cell Adhesion Molecule
Dvl	Dishevelled	Dishevelled
DV	Dorsoventral	Dorsoventral
EtOH	Etanol	Ethanol

Fgf8	Factor de crecimiento fibroblástico 8	Fibroblast Growth Factor 8
Fzd	Frizzled	Frizzled
GFP	Proteína fluorescente verde	Green Fluorescence Protein
Gsk3	Glucógeno sintetasa quinasa 3	Glycogen Synthase Kinase 3
Hp	Prosómero hipotalámico	Hypothalamyc Prosomere
Hyp	Hipotálamo	Hypothalamus
IC	Colículo inferior	Inferior colliculus
Ig	Inmunoglobulina G	Immunoglobulin G
IHC	Inmunohistoquímica	Immunohistochemistry
Ip	Núcleo interpeduncular	Interpeduncular nucleus
Ipc	Parte caudal del núcleo interpeduncular	Caudal part of the interpeduncular nucleus
Ipr	Parte rostral del núcleo interpeduncular	Rostral part of the interpeduncular nucleus.
Is	Istmo	Isthmus
ISH	Hibridación In situ	In situ hybridization
IsO	Organizador ístmico	Isthmic organizer
IZ	Zona intermedia	Intermediate zone
Lc	Locus coeruleus	Locus coeruleus
LGE	Eminencia ganglionar lateral	Lateral ganglionic eminence
IHb	Habénula lateral	Lateral Habenula
IHbl	División lateral de la Habénula lateral	Lateral division of lateral habenula
IHblmg	Subnúcleo marginal de la división lateral de la Habénula lateral	Marginal subnucleus of lateral division of lateral habenula
IHblpc	Subnúcleo parvocelular de la división lateral de la Habénula lateral	Parvocellular subnucleus of lateral habenula lateral division

IHblmc	Subnúcleo magnocelular de la división lateral de la Habénula lateral	Magnocellular subnucleus of the lateral division of lateral habenula
IHblb	Subnúcleo basal de la división medial de la Habénula lateral	Basal subnucleus of the medial division of lateral habenula
IHblo	Subnúcleo oval de la división lateral de la Habénula lateral	Oval subnucleus of lateral division of lateral habenula
IHbm	División medial de la Habénula lateral	Medial division of the lateral habenula
IHbmpc	Subnúcleo parvocelular de la división medial de la Habénula lateral	Parvocellular subnucleus of the medial division of lateral habenula
IHbmc	Subnúcleo central de la división medial de la Habénula lateral	Central subnucleus of the medial division of lateral habenula
IHbms	Subnúcleo superior de la división medial de la Habénula lateral	Superior subnucleus of the medial division of lateral habenula
IHbmmg	Subnúcleo marginal de la división medial de la Habénula lateral	Marginal subnucleus of the medial division of lateral habenula
IHb fr	Axones habenuares laterales del fascículo retroflejo	Lateral habenular axons of the fasciculus retroflexus.
LPO	Área lateral preóptica	Lateral preoptic area
LRP	Receptor de las lipoproteínas de baja densidad	Low density lipoprotein receptor-related protein family
m	Mesómero	Mesomere
M	Mesencéfalo	Mesencephalon/ Midbrain
mHb	Habénula medial	Medial habenula
mHbd	Subnúcleo dorsal de la división lateral de la Habénula medial	Dorsal subnucleus of the lateral division of the lateral habenula
mHbl	División lateral de la Habénula medial	Lateral division of the medial habenula
mHbvc	Subnúcleo central de la parte ventral de la división lateral de la Habénula medial	Central subnucleus of the ventral part of the lateral division of the medial habenula



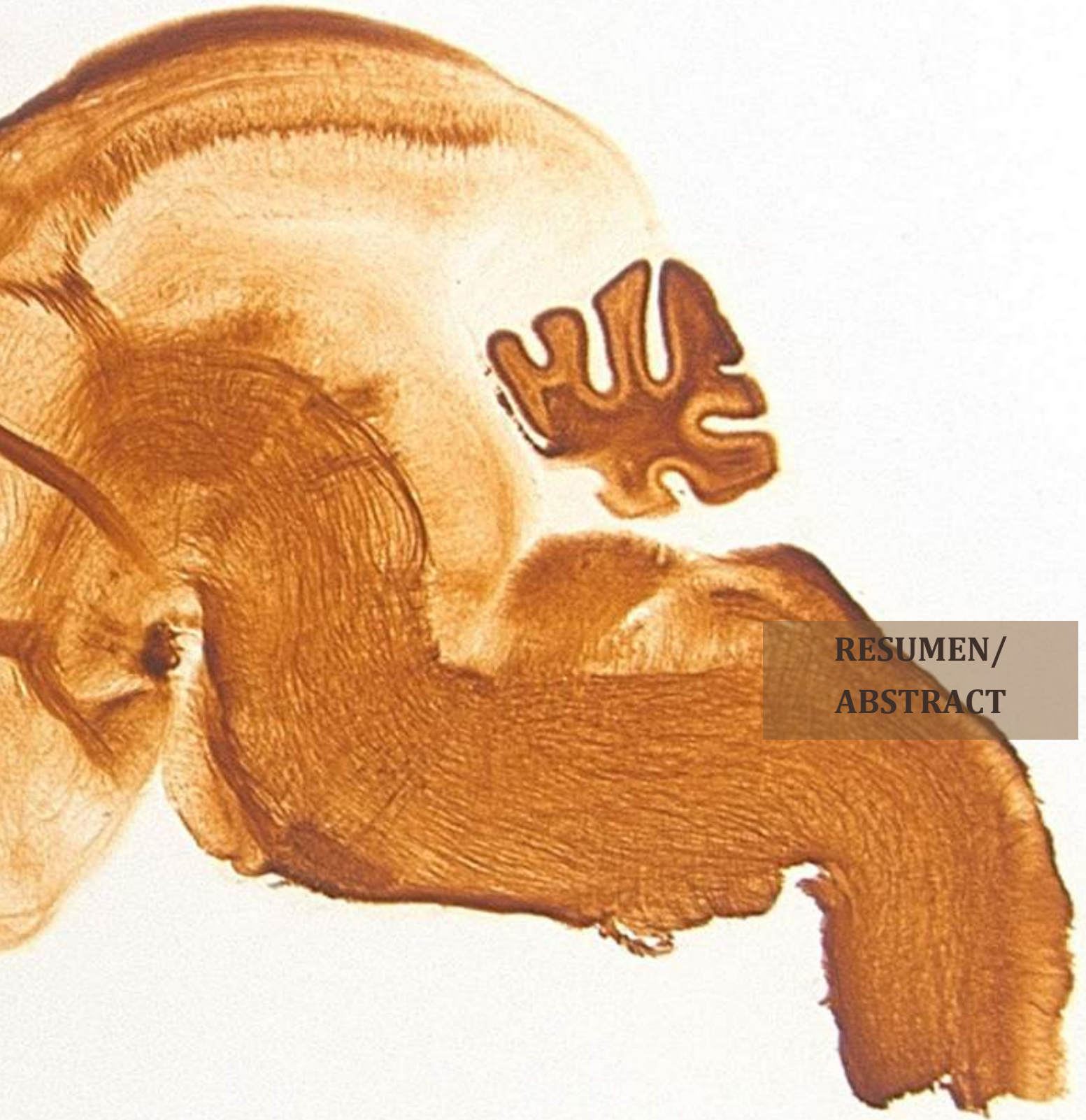
mHbvl	Subnúcleo lateral de la división lateral de la Habénula medial	Lateral subnucleus of the lateral division of the medial habenula
Hbx	Subnúcleo X de la Hb	Subnucleus X of the habenula
mHbim	Subnúcleo intermedio de la división medial de la Habénula medial	Intermediate subnucleus of the medial division of the medial habenula
mHbm	División medial de la Habénula medial	Medial division of the medial habenula
mHbs	Subnúcleo superior de la división medial de la Habénula medial	Superior subnucleus of the medial division of the medial habenula
mHbvm	Subnúcleo medial de la parte ventral de la división medial de la Habénula medial	Medial subnucleus of the ventral part of the medial division of the medial habenula
mHb fr	Axones habenulares mediales del fascículo retroflejo	Medial habenular axons of the fasciculus retroflexus
MGE	Eminencia ganglionar medial	Medial ganglionic eminence
mtg	Tracto mamilotegmental	Mamillotegmental tract
mth	Tracto mamilotalámico	Mamillothalamic tract
MZ	Zona marginal	Marginal zone
NBT	Cloruro de nitroblue tetrazolium	Nitro-blue tetrazolium chloride
NeuN	Hexaribonucleotide Binding Protein-3	Hexaribonucleotide Binding Protein-3
NFAU	Unidades arbitrarias de fluorescencia normalizadas	Normalized fluorescent arbitrary units
Nfem	Neurofilamento	Neurofilament
Npn	Neuropilina	Neuropilin
ob	Bulbo olfatorio	Olfactory bulb
ONTCs	Cultivos organotípicos de tejido neural	Organotypic nervous tissue culture

O/N	Durante la noche	Overnight
p	Prosómero	Prosomere
PA	Placa alar	Alar plate
PB	Placa basal	Basal plate
PBS	Tampón fosfato salino	Phosphate Buffered Saline
pc	Comisura posterior	Posterior commissure
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa	Polymerase chain reaction
PFA	Paraformaldehido	Paraformaldehyde
PS	Placa del suelo	Floor plate
PT	Placa del techo	Roof plate
r	Rombómero	Rhombomere
RGP	Progenitores de la glía radial	Radial glia progenitors
ARN	Ácido ribonucleico	Ribonucleic acid
RBR	Reactivo de bloqueo de Roche	Roche Blocking Reagent
Robo	Roundabout	Roundabout
rpm	Revoluciones por minuto	Revolutions per minute
RSP	Prosencéfalo secundario rostral	Rostral secondary prosencephalon
RMTg	Núcleo tegmental rostromedial	Rostromedial tegmental nucleus
RT	Temperatura ambiente	Room temperature
sc	médula espinal.	Spinal cord
SC	Colículo superior	Superior colliculus
Sema	Semaforina	Semaphorin
SHH	Sonic Hedgehog	Sonic Hedgehog
sm	Estría medular	Stria medullaris

SNc	Sustancia Negra pars compacta	Substantia Nigra pars compacta
Sox2	Sex determining region Y- box 2	Sex determining region Y- box 2
SP	Prosencéfalo secundario	Secondary prosencephalon
SSC	Sal citrato de sodio	Salt sodium citrate
Str	Estriado	Striatum
SVZ	Zona subventricular	Subventricular zone
tst	Tracto tectoespinal	Tectospinal tract
Th	Tálamo	Thalamus
TH	Tirosina hidroxilasa	Tyrosine hydroxylase
VTA	Área tegmental ventral	Ventral tegmental area
vHb	Habénula ventral	Ventral habenula
VZ	Zona ventricular	Ventricular zone
WNT	Wingless-int	Wingless-int
wt	Silvestre	Wild Type
ZLI	Zona limitans intratalámica	Zona limitans intrathalamica







**RESUMEN/  
ABSTRACT**



# Resumen

La Habénula es un complejo neuronal diencefálico ubicado en la parte más dorsal del prosómero talámico. Esta población neuronal está involucrada en el sistema límbico, y su mal funcionamiento está relacionado con varios trastornos de origen psiquiátrico. El fascículo retroflejo es su principal eferencia y constituye un vínculo entre las regiones del prosencéfalo con las del mesencéfalo y el rombencéfalo rostral. Está compuesto por la zona central, donde se ubican los axones habenulares mediales y la periferia, compuesta por axones habenulares laterales. Ambos grupos de fibras comparten la misma trayectoria inicial y se diferencian en el segmento final del fascículo: los axones de la Habénula lateral desfasciulan previamente para inervar las poblaciones dopaminérgicas de la Sustancia Negra pars compacta y el área tegmental ventral, mientras que los de la Habénula medial continúan su camino hacia el rombencéfalo para inervar al Núcleo interpeduncular. Se requiere una organización funcional apropiada de los circuitos habenulares con programas moleculares complejos para controlar la conectividad de la Habénula durante su desarrollo. Sin embargo, los mecanismos que guían a los axones habenulares hacia sus objetivos siguen siendo en su mayoría desconocidos. El objetivo principal de la presente tesis es profundizar en el conocimiento existente sobre el desarrollo de la Habénula, del tracto retroflejo y su trayectoria. Para ello, hemos llevado a cabo tres proyectos independientes.

En primer lugar, demostramos el papel de la Sustancia Negra pars compacta y el Área tegmental ventral como diana intermedia para la correcta navegación de los axones habenulares mediales a lo largo del eje anteroposterior. Utilizando experimentos *in vitro* e *in vivo*, determinamos que esta navegación es el resultado de la atracción realizada por Netrin1, generada por las neuronas de la Sustancia Negra pars compacta. Esta atracción está mediada por el receptor DCC, que se expresa fuertemente en los axones habenulares mediales.

En segundo lugar, estudiamos el rol del morfógeno *Wnt1* en el desarrollo habenular y del fascículo retroflejo. *Wnt1* controla la especificación y diferenciación de poblaciones neuronales dorsales en el sistema nervioso central

en desarrollo. Analizamos el desarrollo de estas estructuras en un modelo de ratón con falta de función *Wnt1*. La Habénula presenta un mayor volumen debido a un incremento en la tasa de proliferación de neuroblastos habenulares. El fascículo retroflejo también presentó ciertas anomalías como fallos de fasciculación entre sus fibras y una trayectoria final alterada. Los territorios del mesencéfalo y rombencéfalo que debe atravesar el tracto están erróneamente diferenciados en nuestro modelo. La alteración de estas áreas es la responsable de la desviación observada en los axones del fascículo retroflejo.

Por último, exploramos el comportamiento diferencial de los axones mediales y laterales de la Habénula. Este comportamiento diferencial debe estar regulado por moléculas de superficie presentes en los axones. Seleccionamos a la molécula *Amigo2* (molécula de adhesión con inmunoglobulina como dominio 2) como candidata para controlar el comportamiento de fasciculación de los axones de la Habénula medial. Este gen se expresa de forma selectiva en la misma y su proteína tiene la capacidad de generar complejos de unión consigo misma. Primero, estudiamos en un modelo de ratón con falta de función de *Amigo2* el desarrollo de la eferencia habenular. El fascículo retroflejo presentó un grado variable de desfasciculación. Posteriormente, realizamos experimentos de ganancia de función, que nos permitieron generar no solo un tracto más condensado en los cerebros silvestres, sino también recuperar el fenotipo generado por la falta de función de *Amigo2*. No se produjo ninguna modificación en el proceso de guía de los axones habenulares. Por lo tanto, hemos demostrado que *Amigo2* juega un papel en el proceso de fasciculación del fascículo retroflejo.

Como conclusión, en el presente trabajo hemos estudiado el sistema habenular desde tres enfoques, por un lado, mecanismos de guía y mecanismos de fasciculación de su principal eferencia, el tracto retroflejo, y por otro lado la acción del morfógeno *Wnt1* en su especificación neuronal. Los resultados obtenidos nos han permitido mejorar y profundizar en el conocimiento básico de cómo se genera esta estructura neuronal y como se determina su conectividad eferente.



## Abstract

The Habenula is a diencephalic neuronal complex located in the most dorsal part of the thalamic prosomere. This neuronal population is involved in the limbic system, and its malfunction is related with several syndromes with psychiatric origin. The fasciculus retroflexus is its main efference and constitute a link between forebrain regions, the midbrain and rostral hindbrain. It is composed by a core, where the medial habenular axons are located, and a shell composed by lateral habenular axons. Both group of fibers share the same initial way and differ in the final segment of the fascicle: axons from the lateral Habenula defasciculate before medial ones to innervate both the dopaminergic Substantia Nigra pars compacta and Ventral tegmental area populations, meanwhile the medial habenular axons navigate fasciculated towards the rhombencephalon to innervate the interpeduncular nucleus. The proper functional organization of habenular circuitry requires complex molecular programs to control the wiring of the habenula during development. However, the mechanisms guiding the habenular axons towards their targets remain mostly unknown. The main objective of this thesis was to improve our knowledge about the development of the habenula, the fasciculus retroflexus and its trajectory. With this aim, we have developed three independent projects.

First, we demonstrate the role of the Substantia Nigra pars compacta and Ventral tegmental area as an intermediate target for the correct medial habenular axons navigation along the anteroposterior axis. This neuronal population is distributed along the anteroposterior trajectory of these axons in the mes-diencephalic basal plate. Using in vitro and in vivo experiments, we determined that this navigation is the result of Netrin1 attraction generated by the Substantia Nigra pars compacta neurons. This attraction is mediated by the receptor DCC, that is strongly expressed in the medial habenular axons.

Second, we studied the *Wnt1* morphogene role in the habenula and its main efferent tract, the fasciculus retroflexus, development. *Wnt1* controls the specification and differentiation of dorsal neuronal populations in the developing

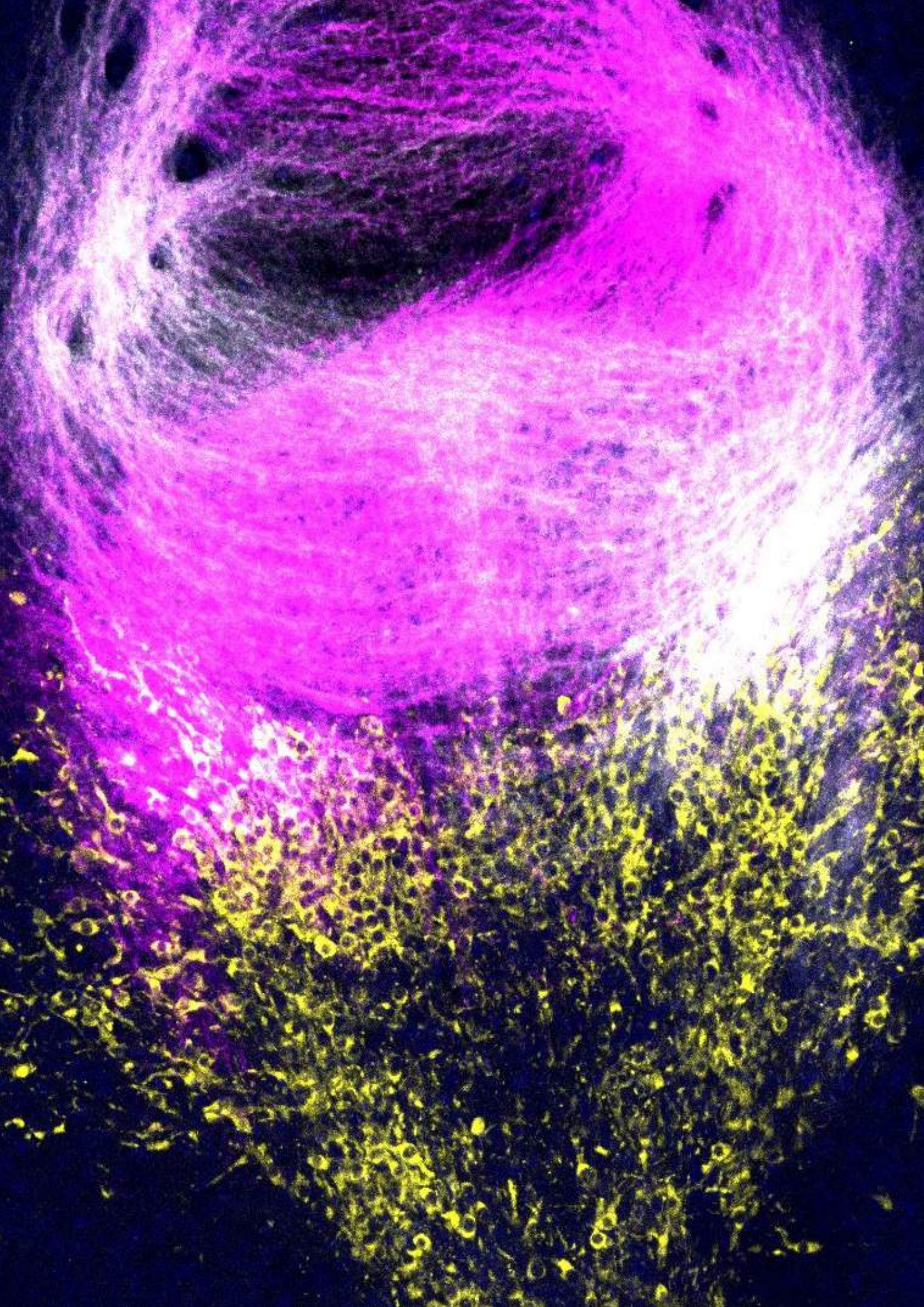
central nervous system. We analyzed these structures development in a *Wnt1* lack of function mouse model. The habenula presented an enlarged volume due to an increment in habenular neuroblasts proliferation rate. The fasciculus retroflexus also presented fasciculation alterations and a disturbed final trajectory towards its target. The mid-hindbrain territories that the tract must cross were miss-differentiated in our model. The alteration of these areas is responsible for the fasciculus retroflexus axons misroute.

Last, we explored the differential behavior of the medial and lateral habenular axons. This different behavior of the axonal fascicles must be regulated by surface molecules located in the axons. We selected *Amigo2* molecule (adhesion molecule with immunoglobulin like domain 2) as a candidate to control the medial habenula axons fasciculation behavior. This gene is selectively expressed in the medial habenula and its protein is able to generate unions among itself. First, we studied in an *Amigo2* lack of function mouse model the development of the habenular efference. The fasciculus retroflexus appeared defasciculated with a variable phenotype. Then, gain of function experiments allowed us to generate not only a more condensed tract but to recover the *Amigo2* knock-out phenotype. *Amigo2* alterations did not produce any modification in the habenular fibers guidance process. Therefore, we have demonstrated that *Amigo2* plays a role in the fasciculation process of the fasciculus retroflexus.

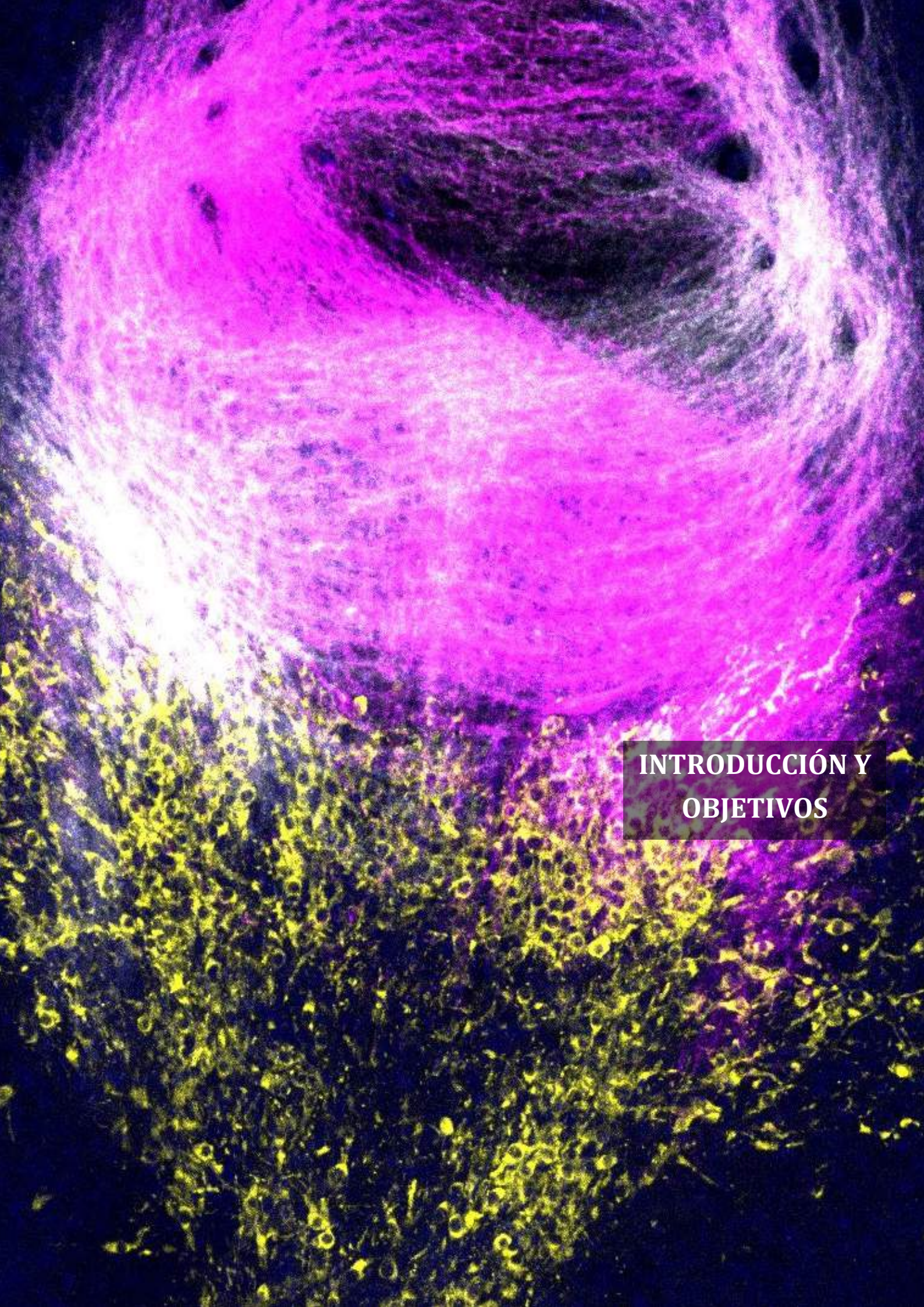
In conclusion, in the present thesis work we have studied the habenular system from three approaches, on one hand, guidance and fasciculation mechanisms of its main efference, and on the other hand, the *Wnt1* morphogene role in its neuronal specification. The results obtained have allowed us to improve our basic knowledge of how is generated this neuronal structure and how is determine its efferent connectivity.











**INTRODUCCIÓN Y  
OBJETIVOS**





# Introducción y Objetivos

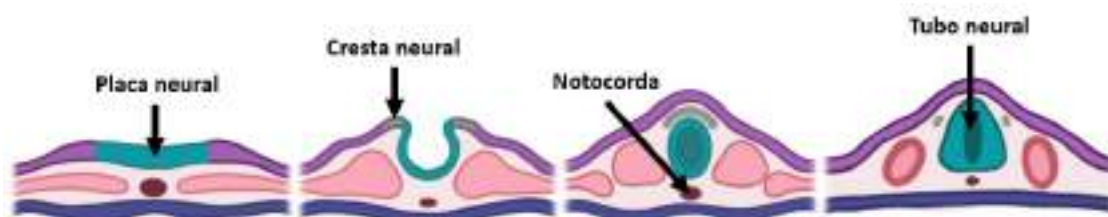
## 1. Desarrollo del Sistema Nervioso Central

Durante el desarrollo embrionario, una serie de procesos dan lugar a los sistemas que conforman al organismo, entre ellos el Sistema Nervioso Central. En este sistema, los procesos que dan lugar a un cerebro formado, son: neurulación, vesiculación y segmentación, proliferación y diferenciación, migración axonal y, por último, sinaptogénesis y mielinización axonal.

### 1.1 Neurulación

En estadios tempranos del desarrollo, el embrión se organiza en dos capas, hipoblasto y epiblasto (Puelles et al., 2008). De este embrión bilaminar, concretamente del epiblasto, se originan las tres capas embrionarias (endodermo, mesodermo y ectodermo) a través de un proceso de movimiento y reorganización celular llamado gastrulación (Echevarría et al., 2003; Puelles et al., 2008).

El proceso de inducción neural ocurre en este estadio de gástrula. Señales provenientes de los organizadores primarios (el nodo, el ectodermo no neural, endodermo y mesodermo) inducen la formación de la placa neural en el ectodermo (Echevarría et al., 2003; Martínez-Ferre and Martínez, 2012). Una vez formada la placa neural, tiene lugar el proceso de neurulación, y se forma el tubo neural. Durante este proceso, los bordes de la placa neural se pliegan formando los pliegues neurales para terminar fusionándose dorsalmente y originando el tubo neural (*Figura 1*; Echevarría et al., 2003).

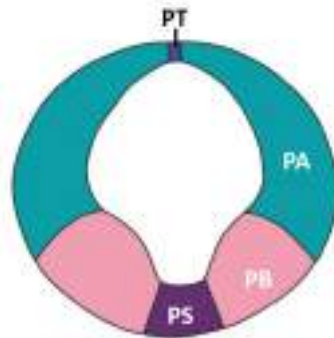


**Figura 1.** Esquema de la formación del tubo neural.

## 1.2 Vesiculación y segmentación

Tras la neurulación, hay un proceso de regionalización del tubo neural. En primer lugar, esta regionalización tiene lugar en el eje dorso-ventral (DV) debido a la información posicional que emanan los organizadores primarios (Echevarría et al., 2003; Martínez-Ferre and Martínez, 2012). Estos organizadores son la notocorda que produce señales ventralizantes (Sonic Hedgehog, SHH), y el ectodermo no neural que produce señales dorsalizantes (Wingless-int1, WNT1 y Bone Morphogenetic Protein, BMP; Echevarría et al., 2003; Martínez-Ferre and Martínez, 2012).

Como resultado de combinaciones de los gradientes de estas señales (llamadas morfógenos) provenientes desde los diferentes organizadores, se inhibirán o inducirán diferentes factores de transcripción que promoverán los distintos programas de especificación y diferenciación, quedando el tubo neural dividido en 4 regiones en el eje DV: la placa del suelo, las placas basales, las placas alares y la placa del techo (*Figura 2*; Echevarría et al., 2003; Puelles et al., 2008; Navarro-Garberí et al., 2016).



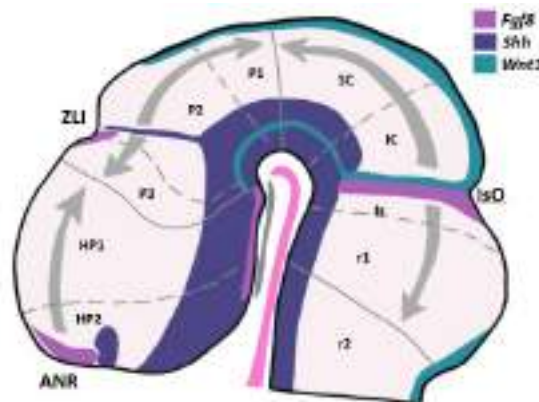
**Figura 2. Esquema de las regiones DV del tubo neural.** Abreviaturas: PA, placa alar; PB, placa basal; PS, placa del suelo; PT, placa del techo.

La placa del techo y la placa del suelo son más finas, al estar formadas por una única capa de células epiteliales, en contraposición, las placas basales y alares, aumentan su espesor para dar origen a las partes neuralmente diferenciadas del encéfalo, habiendo una diferencia funcional entre las mismas: las placas alares darán lugar a los centros sensitivos primarios, mientras que las placas basales originarán los centros motores primarios (Nieuwenhuys et al., 2008).



Posteriormente, la placa del suelo (la proteína SHH induce su propia expresión en las células del neuroepitelio de la línea media ventral) y el techo actúan como organizadores secundarios de áreas cercanas (Liem et al., 1995; Roelink et al., 1995; Hammerschmidt et al., 1996).

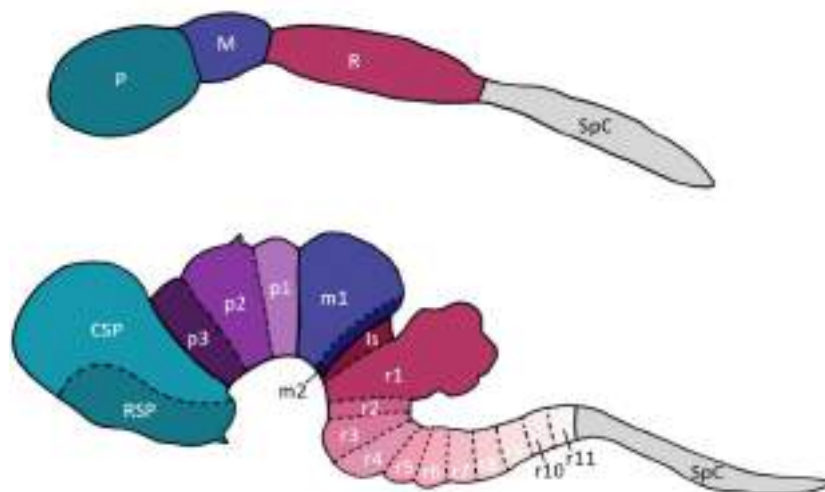
Por otro lado, la regionalización a lo largo del eje antero-posterior (AP), establece las tres principales divisiones del tubo neural (Echevarría et al., 2003; Lim and Golden, 2007; Puellas et al., 2013). Esta regionalización es debida a los morfógenos que emanan de los organizadores secundarios, regiones especializadas de neuroepitelio localizadas a lo largo del tubo neural. Los principales son tres: la Cresta Neural Anterior (ANR), localizada en la zona más anterior, que expresa *Fgf8* (Fibroblast Growth Factor) y *Shh*, la Zona Limitans Intratalámica (ZLI), localizada en el diencefalo, que expresa *Fgf8* and *Shh*, y el organizador ístmico (IsO), localizado en el límite entre mesencefalo y rombencefalo, que expresa *Fgf8* y *Wnt1* (Figura 3; Lim and Golden, 2007; Martinez-Ferre and Martinez, 2012).



**Figura 3. Representación de los tres organizadores secundarios** (ANR, cresta neural anterior; ZLI, zona limitans intratalámica; IsO, organizador ístmico) a lo largo del tubo neural y las moléculas de señalización producidas. Abreviaturas: Hp, prosómero hipotalámico; IC, colículo inferior; Is, istmo; p, prosómero; r, rombómero; SC, colículo superior. Imagen modificada de Echevarría et al., 2003.

El cerebro, por tanto, queda subdividido en tres vesículas principales: prosencéfalo, mesencéfalo y rombencefalo (Puelles and Rubenstein, 2003; Lim and Golden, 2007; Martinez-Ferre and Martinez, 2012).

Siguiendo el modelo prosomérico (que reconoce la existencia de un eje longitudinal curvado y unas subdivisiones longitudinales y transversales), más tarde en el desarrollo, esas tres vesículas se dividen en segmentos llamados neurómeros, definidos por su expresión génica (*Figura 4*; Puelles and Rubenstein, 2003; Lim and Golden, 2007; Puelles et al., 2013). El prosencéfalo se divide en prosencéfalo secundario (formado por telencéfalo, hipotálamo y vesícula óptica) y diencéfalo. El prosencéfalo secundario se divide en dos neurómeros, la zona caudal se conoce como prosómero hipotalámico peduncular y la zona rostral como prosómero hipotalámico terminal (Puelles, 2019). El telencéfalo (que origina la corteza, los ganglios basales y el hipocampo, entre otras estructuras) es una estructura no prosomérica, y está dividida en palio y subpalio. El diencéfalo se subdivide en tres prosómeros (p): p1 o pretectum, p2 que incluye el tálamo y epitálamo y p3 o pretálamo (Puelles and Rubenstein, 2003; Lim and Golden, 2007; Martínez-Ferre and Martínez, 2012; Puelles et al., 2013). Además, hay otras estructuras en la placa basal del diencéfalo: la parte rostral de la Sustancia Negra pars compacta (SNc) y del área tegmental ventral (VTA). El mesencéfalo se divide en dos neurómeros llamados mesómeros (m) y el rombencéfalo en 12 neurómeros llamados rombómeros (r), considerando que el istmo forma parte de ellos (r0; Lim and Golden, 2007; Martínez-Ferre and Martínez, 2012; Puelles et al., 2013).



**Figura 4.** Esquema representativo de las regiones del cerebro a lo largo del eje anteroposterior, de acuerdo con el modelo prosomérico. En la primera imagen vemos la división en las tres vesículas (P, prosencéfalo; M, mesencéfalo; R, rombencéfalo) en el tubo neural. Posteriormente, en el cerebro formado, se observan las subdivisiones: prosencéfalo secundario dividido en el prosencéfalo secundario rostral (RSP) y caudal

(CSP). El diencéfalo en sus tres prosómeros (p), ambos mesómeros (m) del mesencéfalo y los 11 rombómeros y el istmo (Is) del rombencéfalo. Imagen modificada de Puelles et al., 2013.

De todos los morfógenos citados anteriormente, vamos a proceder a profundizar en la familia de proteínas Wingless-Int (WNT) por su relación directa con el presente trabajo.

### *Familia de proteínas WINGLESS-INT (WNT)*

La familia *Wnt* pertenece a un grupo de genes involucrados en el desarrollo embrionario, concretamente en el control del patrón embrionario (Ciani and Salinas, 2005; Bengoa-Vergniory and Kypta, 2015; Brafman and Willert, 2017). Esta familia también está relacionada en la diferenciación, polarización, y migración durante el desarrollo y la muerte celular programada (Ciani and Salinas, 2005; Brafman and Willert, 2017; Taciak et al., 2018).

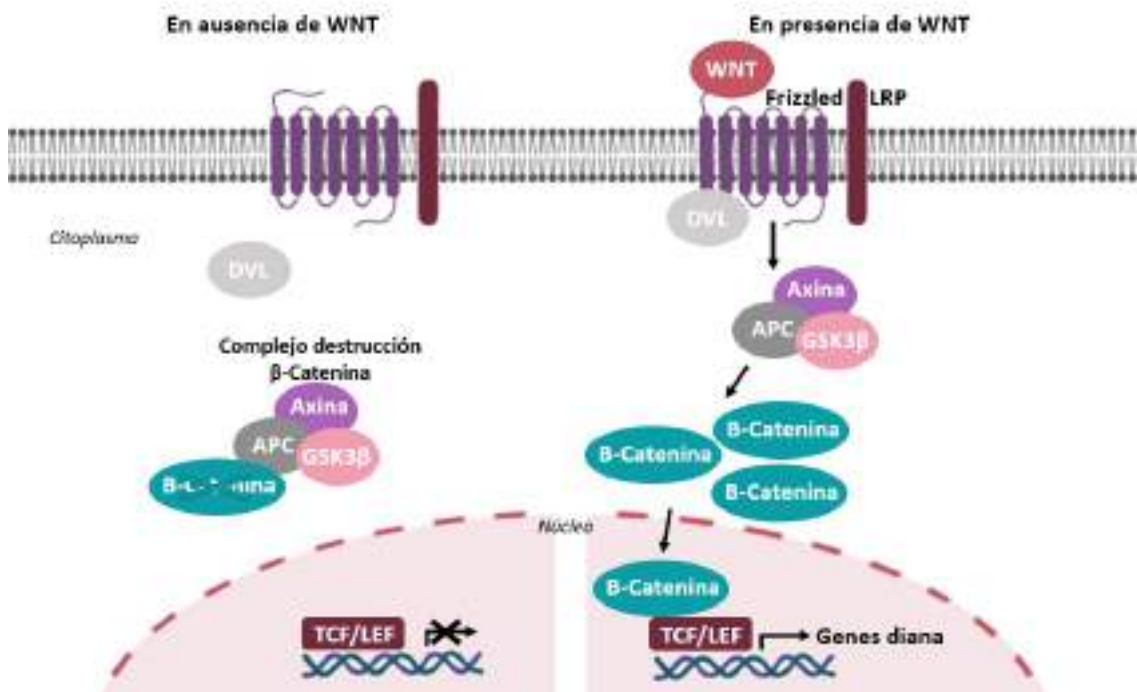
Estos genes fueron descritos por primera vez en *Drosophila melanogaster* como *Wingless (wg)*. En mamíferos, el homólogo es el gen *int1*, descrito por Nusse y Varmus en 1982 (Ciani and Salinas, 2005; Brafman and Willert, 2017; Taciak et al., 2018), de ahí su nombre. En mamíferos, hay 19 genes *Wnt* diferentes (Bengoa-Vergniory and Kypta, 2015; Brafman and Willert, 2017), que codifican para glicoproteínas secretables, con una palmitolación (unión de un ácido graso palmítico) en la cisteína conservada (Ciani and Salinas, 2005; Brafman and Willert, 2017).

Estas proteínas son reconocidas principalmente por receptores de la familia de genes *Frizzled (Fzd)* (Wurst and Prakash, 2014; Taciak et al., 2018), pero también por correceptores *LRP* (low density lipoprotein receptor-related protein family; Brafman and Willert, 2017).

Hay dos tipos de vías de señalización para *Wnt*, la canónica y las no canónicas (Bengoa-Vergniory and Kypta, 2015; Brafman and Willert, 2017; Taciak et al., 2018). En la canónica (*Figura 5*), en ausencia de ligando Wnt,  $\beta$ -catenin es

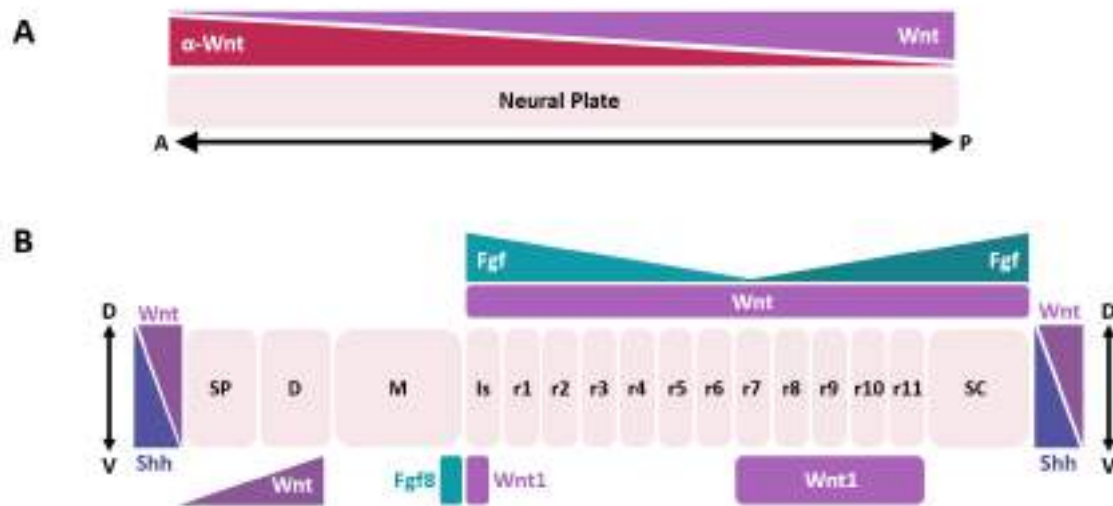
degradada por el proteosoma debido a la ubiquitinación por la destrucción del complejo  $\beta$ -catenin, formado por Adenomatous Polyposis Coli (APC), Glycogen Synthase Kinase 3 (GSK3), Dishevelled (DVL), y Axina. Cuando el ligando WNT se une al receptor y correceptor, DVL se une a este complejo interrumpiendo el complejo de destrucción. Por tanto, la  $\beta$ -catenina se estabiliza en el citoplasma y entra en el núcleo, donde regula la familia de factores de transcripción TCF / LEF activando la transcripción de sus genes diana (Puelles and Rubenstein, 2003; Ciani and Salinas, 2005; Ota et al., 2016).

Hay dos vías no canónicas, la vía de polaridad celular en el plano y la vía dependiente de calcio (Puelles and Rubenstein, 2003; Ciani and Salinas, 2005). No obstante, *Wnt1*, el miembro de la familia que nos interesa, activa preferentemente la vía canónica (Ciani and Salinas, 2005), por lo que no entraremos en más detalles sobre las vías no canónicas.



**Figura 5. Vía canónica de Wnt.** Abreviaturas: APC, Adenomatous Polyposis Coli; DVL, Dishevelled; GSK3, Glycogen Synthase Kinase 3; LRP, low density lipoprotein receptor-related protein family. Imagen modificada de Ota et al., 2016.

La señalización de *Wnt* regula una serie de eventos de desarrollo: la conectividad neuronal, el crecimiento axonal, la formación de sinapsis y la morfogénesis de las dendritas. Además, estos genes son esenciales para establecer el patrón AP y DV del sistema nervioso central. Como se ha comentado previamente, la regionalización del tubo neural depende del gradiente de WNT combinado con otras moléculas de señalización. Como podemos ver en la *Figura 6A*, se requiere un gradiente de señalización WNT para la determinación AP de la placa neural, así como para la regionalización específica del tubo neural. En la *Figura 6B*, se observa cómo se necesita WNT en la parte más caudal y dorsal del diencéfalo, en r1, y en la parte caudal del rombencéfalo (Puelles and Rubenstein, 2003).



**Figura 6.** Expresión de *Wnt1* a lo largo de la placa neural en desarrollo (A) y el tubo neural en formación (B). Abreviaciones: SP, prosencefalo secundario; D, diencéfalo; M, mesencefalo; Is, istmo; r, rombómero; sc, médula espinal. Imagen modificada de Brafman et al., 2018.

Algunos estudios muestran que la señalización de *Wnt* actúa junto a otras moléculas de señalización. Es requerida para la formación posterior del tubo neural, y para la especificación del prosencefalo y telencefalo (Brafman and Willert, 2017).

*Wnt1* juega, además, un papel crucial en el desarrollo del rombencéfalo y el mesencefalo, estructuras que se ven gravemente comprometidas en ausencia de

este morfógeno. De hecho, los ratones mutantes presentan pérdidas de estructuras mesencefálicas y cerebelares (Puelles et al., 2013; Wurst and Prakash, 2014).

Es también necesaria para la inducción del límite entre mesencéfalo y rombencéfalo, que supone un centro de organización clave (Ciani and Salinas, 2005; Brafman and Willert, 2017). En este caso, actúa junto con *Fgf8* regulando la función de este organizador secundario (Brafman and Willert, 2017). *Wnt1* se expresa en la parte dorsal y es necesaria para mantener la expresión de *Fgf8*. Esta molécula es esencial para la inducción del mesencéfalo y el cerebelo (Ciani and Salinas, 2005). Además, se ha observado que *Wnt1* es responsable de la regionalización del diencéfalo siendo también expresado a lo largo de esta región hasta el límite p2/p3. En efecto, en ausencia de *Wnt1*, se observan alteraciones en las estructuras diencefálicas a consecuencia de un inapropiado patrón DV de señalización (Navarro-Garberi et al., 2016). Se ha demostrado también, la influencia de *Wnt1* en la regulación del proceso de proliferación (Lewis et al., 2013), que pasa a detallarse a continuación.

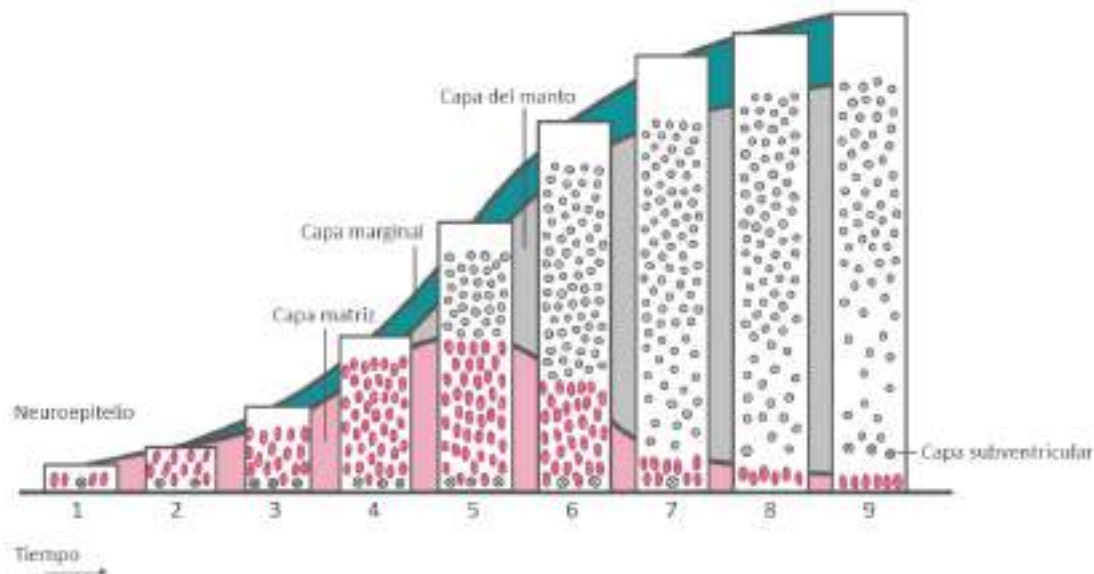
### 1.3 Proliferación y diferenciación

La placa neural y el tubo neural temprano están constituidos por un epitelio pseudoestratificado (1 única capa de células). Todas las células están en contacto con la superficie superior (pial) e inferior (ventricular), pero sus núcleos no están a la misma altura. Esto ocurre debido a que las células se encuentran asincrónicamente en diferentes estadios del ciclo mitótico y mueven constantemente su núcleo de un lado a otro, estando las células en reposo en la superficie pial y las que van a proceder a dividirse en la superficie ventricular (Nieuwenhuys et al., 2008).

En un primer periodo de división, el neuroblasto se divide en dos neuroblastos idénticos (división simétrica), formando una estructura entre los ventrículos y la superficie pial llamada matriz proliferativa. Esta división simétrica provoca un entorno proliferativo y el aumento en el tamaño del tubo neural (etapa 2-4 en *Figura 7*).

Tras este primer periodo, se produce otro de división asimétrica. Una vez alcanzado el nivel adecuado de proliferación, los neuroblastos, influenciados por la concentración de los diferentes morfógenos explicados previamente y otros factores de transcripción, inician el proceso de especificación/diferenciación mediante una división asimétrica, generando un neuroblasto y una célula diferente que escapa de esa matriz proliferativa. Estas son las llamadas células posmitóticas o neuronas inmaduras, que conforman la capa del manto (etapa 5 en *Figura 7*).

Por último, se produce una última división simétrica con las que acaba el ciclo germinativo de la matriz. Esta vez se generan dos células hijas diferentes de la parental: dos células postmitóticas neuronales o gliales, disminuyendo el número de neuroblastos y el tamaño de la matriz proliferativa (*Figura 7*; Nieuwenhuys et al., 2008).



**Figura 7. Histogénesis de la pared del tubo neural.** Se subdivide en etapas que comprenden los diferentes eventos del desarrollo: transformación de epitelio de una sola capa a pseudoestratificado (etapa 1 a etapa 4), aumento (etapa 2 a etapa 4), culminación (etapa 5), disminución (etapa 5 a etapa 7) y depleción (etapa 8) de la capa de la matriz; aparición (etapa 3) y desarrollo (etapa 3 a etapa 9) de la capa marginal; aparición (etapa 5) y expansión (etapa 5 a etapa 9) de la capa del manto; y para terminar, aparición de la capa subventricular (etapa 9). Imagen modificada de Nieuwenhuys et al., 2008.

El control genético de este proceso es muy importante, puesto que cada zona tiene un patrón de proliferación diferente, produciéndose el crecimiento diferencial de

las regiones y la formación de las curvaturas del eje del tubo neural (Nieuwenhuys et al., 2008).

## 1.4 Migración neuronal

Las neuronas, tras nacer, deben desplazarse desde su lugar de nacimiento hasta su destino final.

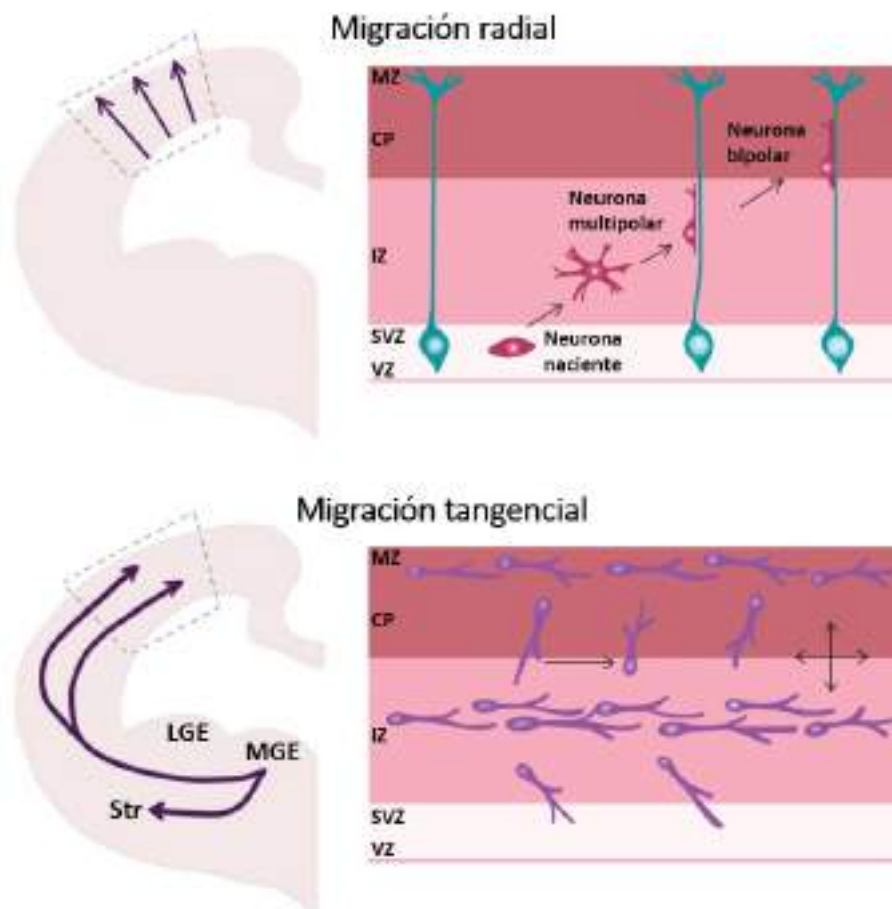
Existen dos tipos diferentes de migración neuronal embrionaria (*Figura 8*): la migración radial, en la que las células viajan radialmente desde el ventrículo (lumen) hasta la superficie pial; y la migración tangencial, en la que las células viajan paralelas a la superficie pial. Algunas células sufren únicamente procesos de migración radial, otras, sin embargo, desarrollan procesos combinados (Moffat et al., 2015).

La migración radial se produce gracias a las células de la glía radial, que nacen en zonas ventriculares y manteniéndose unidas se extienden hasta la zona marginal, región más externa del tubo. Esta disposición les confiere la función de un andamiaje que sirve de guía para ayudar a las neuronas migratorias a viajar desde la zona ventricular a través de las diferentes capas de manto, hasta su destino final. Como ejemplo, las células piramidales sufren este tipo de migración para alcanzar su posición final en la corteza, tras nacer en la superficie ventricular. Estas células migran, por tanto, "de adentro hacia afuera", por lo que las células piramidales nacidas de forma más tardía, son las más superficiales (Moffat et al., 2015).

Si existiese solo la migración radial cada estructura del tubo neural solo podría estar formada por un tipo celular que nacería en una región específica de la matriz cerca del ventrículo. Su combinación con la migración tangencial permite la formación de estructuras morfológicas más complejas, compuestas por progenitores de diferentes zonas y con diferentes características.



En el pasado, se pensaba que solo había unos pocos casos de estructuras formadas por células de zonas distantes que necesitan procesos de migración a larga distancia. Pero, con el tiempo, cada vez más estudios describen procesos de migración tangencial de determinadas neuronas que necesitan estos procesos para formar una estructura nuclear específica (Moffat et al., 2015; Villar-Cerviño et al., 2015).



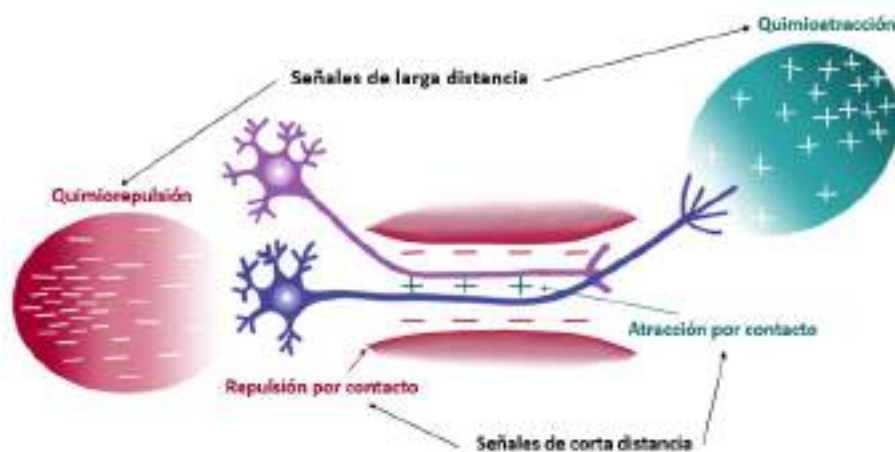
**Figura 8: Esquema representativo de los tipos de migración neuronal embrionaria.**

Migración radial: En este caso, las células piramidales viajan radialmente desde la zona ventricular a través de diferentes capas hasta su posición final en la corteza, con la guía de las células de la glía radial. Migración tangencial: En este caso, las interneuronas viajan paralelas a la superficie pial a través de una sola capa de la corteza. Abreviaturas: MZ, zona marginal, CP, placa cortical; IZ, zona intermedia; SVZ, zona subventricular; VZ, zona ventricular; RGP, progenitores de la glía radial; MGE, eminencias ganglionares mediales; LGE, eminencias ganglionares laterales; Str, Estriado. Imagen modificada de Moffat et al., 2015.

## 1.5 Guía axonal:

La correcta función del sistema nervioso depende directamente de la adecuada formación de sus circuitos neuronales (Giger et al., 2000), por tanto, la navegación neuronal durante el desarrollo del sistema nervioso es crucial para que se pueda establecer el orden celular y las conexiones de manera apropiada (Song and Poo, 2001). Durante el desarrollo, los conos de crecimiento localizados en los extremos de los axones avanzan por la matriz hasta encontrar la célula diana con la que establecer la sinapsis (Giger et al., 2000), proceso que requiere de moléculas guía, receptores de superficie y vías de transducción de la señal que lleven a una reorganización del citoesqueleto (Song and Poo, 1999, 2001).

Durante la prolongación del cono de crecimiento, estos axones encuentran su camino gracias a la acción de moléculas de guía axonal que se encuentran en el ambiente extracelular o en la membrana de otros axones y que tienen un efecto de repulsión o atracción del cono de crecimiento. Además, esta señalización puede ser por contacto, si se trata de proteínas con un dominio transmembrana, ancladas a ella o localizadas en la matriz extracelular; o bien, señalización en forma de gradiente si se trata de proteínas secretadas (Figura 9; Tessier-Lavigne and Goodman, 1996; Giger et al., 2000; Song and Poo, 2001; Dickson, 2002; Schmidt et al., 2014).



**Figura 9.** Esquema de los diferentes tipos de señales de guía axonal: de largo alcance y de corto alcance y, dentro de cada categoría, de atracción o repulsión (Kolodkin and Tessier-Lavigne, 2011).

Para que una molécula pueda ser considerada como factor de guía axonal debe cumplir una serie de características: debe ser expresada o secretada en el momento adecuado y el lugar adecuado, aportando información temporal y espacial; su eliminación o la de su receptor debe provocar errores en la navegación axonal y su expresión en cultivos celulares debe ser suficiente para la atracción o la repulsión de sus neuronas diana en co-cultivo (Song and Poo, 2001).

Las familias de moléculas de guía axonal más relevantes y que cumplen todas estas características son 4: *Slits*, *Efrinas*, *Semaforinas* y *Netrinas* (Tessier-Lavigne and Goodman, 1996; Song and Poo, 1999, 2001; Giger et al., 2000; Dickson, 2002; Sahay et al., 2003; Kolodkin and Tessier-Lavigne, 2011).

### *Familias de moléculas de guía axonal:*

- ***Slits***

Las SLITS son una familia de proteínas de gran tamaño que se unen al receptor Roundabout (ROBO), su función más estudiada es su rol en la correcta formación del quiasma óptico (Dickson, 2002). Estas proteínas son quimiorrepelentes de la línea media y se unen a los receptores Robo presentes en el cono de crecimiento axonal (Song and Poo, 1999). Además del receptor Robo, también existe el receptor Commisureless (COMM; Chilton, 2006).

- ***Semaforinas (Sema)***

Se trata de una familia de genes que codifican para proteínas tanto difusibles como transmembrana o asociadas a proteínas G que actúan como moléculas de repulsión del cono de crecimiento tanto de largo como de corto alcance (Tessier-Lavigne and Goodman, 1996; Giger et al., 2000; Dickson, 2002).

Esta familia se caracteriza por presentar un dominio sema de unos 500 aminoácidos y sus miembros se dividen en 8 clases, de la 3-7 las

encontramos en vertebrados (Dickson, 2002) y las Sema3 (A – G) son las más importantes en lo que se refiere a guía axonal (Kolodkin and Tessier-Lavigne, 2011). Actúan como potentes repelentes para el cono de crecimiento (Giger et al., 2000) en neuronas motoras, sensoriales, olfatorias y del hipocampo (Chilton, 2006).

Los receptores para las Sema3 son las neuropilinas (NPN) de las que hay dos formas: NPN1 y NPN2 (Giger et al., 2000; Dickson, 2002) y las plexinas, por lo que la señalización de las semaforinas es a través de receptores complejos (Dickson, 2002) en los que también puede participar la molécula de adhesión celular (CAM) transmembrana L119.

NPN2 es esencial para la señalización de Sema3F que tiene un papel importante en el desarrollo del tracto retroflejo, además, se ha visto que una depleción de este receptor lleva a un embrión no viable que muere en la segunda semana de gestación (Giger et al., 2000).

- ***Efrinas***

Se trata de moléculas de guía axonal ancladas a la membrana cuya función más estudiada es la guía de la migración de los conos de crecimiento de los axones de la retina (Song and Poo, 2001).

Encontramos dos clases, ephrin-As que están ancladas a la membrana por GPI (Glycosylphosphatidylinositol) y se unen a receptores EphA y ephrin-Bs que tienen un dominio transmembrana y se unen a los receptores EphB. Ambos receptores son de tipo tirosina-quinasa (Dickson, 2002; Chilton, 2006).

En estas moléculas de guía axonal puede haber señalización reversa del receptor al ligando o del ligando al receptor (Dickson, 2002).

- ***Netrinas (Ntn)***

Se trata de una familia de moléculas difusibles de unos 600aa y sus receptores son DCC (Deleted in colorectal cancer), DSCAM (Down's

syndrome Cell Adhesion Molecule) y Unc5 (Tessier-Lavigne and Goodman, 1996; Song and Poo, 1999; Ly et al., 2008; Kolodkin and Tessier-Lavigne, 2011).

Tradicionalmente, ha sido descrita como una molécula de guía bifuncional de largo alcance, ya que, su función depende del receptor que exprese el axón que las reconozca. Son quimioatrayentes si se unen a DCC/ DSCAM (Ly et al., 2008; Liu et al., 2009) o quimiorepelentes si lo hacen a Unc, aunque en este caso también participa DCC (Chilton, 2006; Kolodkin and Tessier-Lavigne, 2011).

Sin embargo, actualmente este modelo de señalización “de largo alcance”, requiere otro planteamiento, al haberse demostrado el rol de NTN en la adhesión axonal por gradientes quimioatrayentes y en procesos de señalización de contacto llamados “haptotaxis” (Dominici et al., 2017; Varadarajan et al., 2017). Por tanto, considerando la variedad de receptores, de funciones y el hecho de que NTN puede ser modulada por factores ambientales, se necesita proponer un nuevo modelo que considere todas estas variables. Ha sido planteado el término “adhesión condicional”, un proceso dinámico que permite que las células se adhieran y desprendan localmente, lo que, junto con los movimientos en el citoesqueleto, puede dirigir una célula migratoria a lo largo de un gradiente de NTN (Meijers et al., 2020).

Como se ha descrito, muchas de las moléculas que actúan como moléculas de guía axonal son bifuncionales, es decir, actúan de repelentes o atrayentes según el receptor al que se unan o la concentración de segundos mensajeros que haya en la señalización intracelular (Tessier-Lavigne and Goodman, 1996; Song and Poo, 2001).

Existen fuertes evidencias de que otras moléculas o factores relacionados con el desarrollo embrionario del sistema nervioso también pueden ser reguladores clave del comportamiento del cono de crecimiento como morfógenos, moléculas de adhesión celular, factores de crecimiento y moléculas de la matriz extracelular (Song and Poo, 1999; Chilton, 2006).

De este modo podemos decir que no actúa una sola señal de forma individual, sino que hay una combinación de señales que llevan a una respuesta adecuada del cono de crecimiento. Este también puede variar su sensibilidad a determinadas señales variando la concentración de mensajeros secundarios, participando así, de forma activa en la migración neuronal y no solo respondiendo pasivamente a las señales que le llegan (Chilton, 2006).

Los morfógenos, cómo se ha explicado, son moléculas que sirven como señales posicionales durante el desarrollo embrionario pero, se ha visto, que también pueden actuar como moléculas de guía axonal (Charron and Tessier-Lavigne, 2005; Chilton, 2006). Se han descrito estos procesos en los morfógenos *Wnt*, *Shh* y *BMP* en los que participan como moléculas de guía axonal (Kolodkin and Tessier-Lavigne, 2011; Kim and Kim, 2020). En el caso de *Wnt*, por ejemplo, actúa como molécula de guía axonal de atracción a través de su receptor Fzd estableciendo un gradiente antero-posterior que permite un giro de 90° de los axones comisurales tras haber cruzado la línea media (Lyuksyutova et al., 2003; Hollis and Zou, 2012; Kim and Kim, 2020).

### *Dianas intermedias*

Algunas proyecciones axonales tienen que viajar largas distancias para alcanzar sus objetivos finales. En algunos tractos, como las proyecciones talamocorticales, los axones pioneros usan dianas intermedias para su correcta guía (Garel and López-Bendito, 2014).

Estas dianas intermedias se colocan estratégicamente a lo largo del camino y producen las señales necesarias para la correcta navegación de los axones en crecimiento. Por lo tanto, una trayectoria compleja se divide en más simples y cortas, en las que los axones navegan de un objetivo intermedio a otro.

### *Fasciculación*

La fasciculación homotípica (entre axones del mismo tipo de neuronas) y heterotípica (entre axones de neuronas de diferentes tipos) facilita la formación de tractos en ruta hacia un objetivo común o entre regiones cerebrales interconectadas (Spead and Poulain, 2020). Se ha demostrado la importancia de las interacciones entre el axón pionero y los nacidos más tarde en la adhesión y fasciculación entre los axones mientras navegan hacia su objetivo (Whitlock and Westerfield, 1998; Pittman et al., 2008; Okumura et al., 2016). Los axones que nacen más tarde, cambian notablemente su ruta y adoptan un comportamiento “líder” tras la ablación de los axones pioneros, lo que sugiere una interacción directa entre los axones pioneros y los nacidos tras ellos, con estos últimos fasciculándose y navegando a lo largo de los axones pioneros. Ambos tipos de fasciculación están mediados tanto por moléculas de adhesión, cómo por moléculas de guía axonal, por lo que, en general, las interacciones entre los axones se ven facilitadas por el orden de nacimiento de las células, la expresión de las moléculas de adhesión y las vías de señalización conservadas que median la fasciculación adecuada a medida que los axones se alargan hasta su objetivo (Šmít et al., 2017).

Tras la llegada de los axones a su destino final, darán lugar los procesos de sinaptogénesis y mielinización.

## **2. La Habénula y el fascículo retroflejo**

### **2.1 El sistema límbico**

El sistema límbico es un sistema complejo, consistente en un conjunto de poblaciones neurales localizadas en todos los segmentos cerebrales: la amígdala, el hipocampo, la corteza cingular, el núcleo septal y el hipotálamo en el prosencéfalo secundario, el tálamo y el complejo habenular en el diencefalo, la SNc, el VTA, la sustancia gris periacueductal y la formación reticular en el mesencéfalo, y por último, el complejo del rafe, el locus cerúleo y la formación reticular en el rombencéfalo (Nieuwenhuys et al., 2008).

Las interconexiones entre las mismas juegan un papel fundamental en la emoción, la cual está compuesta por funciones tales como el comportamiento social, sentimientos sociales e intersociales o aspectos del comportamiento psicológico. Sin embargo, las emociones no son la única función de las diversas áreas límbicas, muchas relacionadas con procesos cognitivos básicos como son las sensaciones, el grado de percepción, la atención o la consolidación de la memoria (Roxo et al., 2011).

Alteraciones menores en la especificación de los subtipos neuronales o en su conectividad, podrían desembocar en múltiples síndromes o patologías relacionadas con el sistema límbico. Estas comprenderían las enfermedades mentales tales como depresión, esquizofrenia, adicciones, etc. y alteraciones del desarrollo que incluirían dificultades en el aprendizaje, motivación, circuito de recompensas, dolor o problemas de memoria (Aizawa et al., 2011; Fakhoury, 2017; Duman et al., 2019; Hu et al., 2020; Nikolenko et al., 2020; Bühler and Carl, 2021).

### **2.2 El complejo de la Habénula (Hb)**

La Hb es un núcleo bilateral que se encuentra a ambos lados de la línea media, en la parte más dorsal del prosómero talámico o p2. Junto con la glándula pineal y la



estría medular (sm) forma el denominado epitálamo (Hikosaka, 2010; Schmidt and Pasterkamp, 2017; Zahm and Root, 2017).

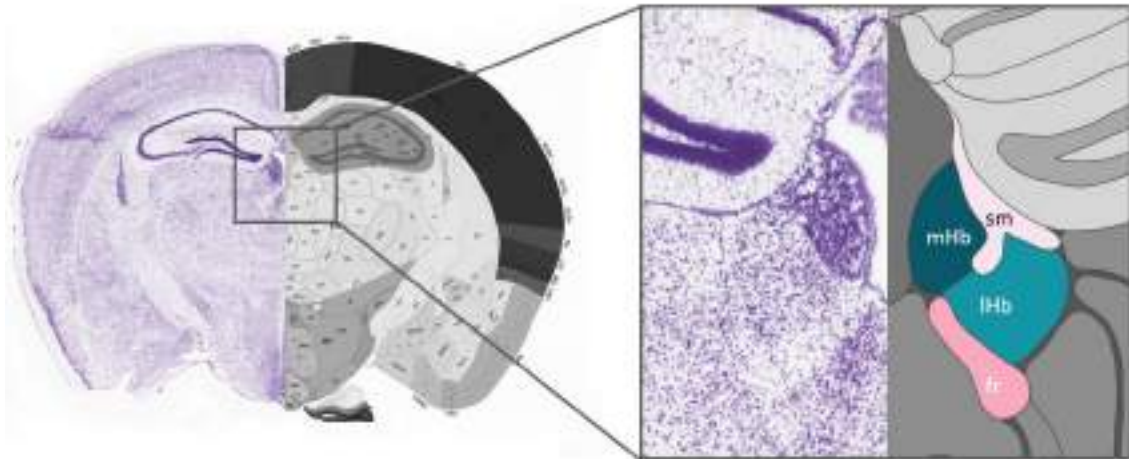
Se trata de un núcleo bilateral filogenéticamente conservado (Schmidt and Pasterkamp, 2017; Zahm and Root, 2017) sin embargo, en algunas especies, entre las que se encuentran los peces, es una estructura asimétrica, presentando diferencias izquierda-derecha, tanto en el tamaño, como en la organización neuronal, neuroquímica y conectividad.

En los teleósteos, y concretamente, en el pez cebra (ampliamente usado como modelo animal en investigación), el núcleo izquierdo se presenta de mayor tamaño que el derecho y posee una mayor densidad de neuropilo (Concha and Wilson, 2001). Además, difieren también en su conectividad. Ambas Hb proyectan hacia el núcleo interpeduncular (Ip) a través del fr izquierdo y derecho, pero los axones de la Hb izquierda llegan a la región más dorsal, mientras que los de la derecha conectan con la región ventral (Villalón et al., 2012).

Respecto a su estructura, el núcleo dorsal de la Hb en los peces se corresponde con el medial en mamíferos y el ventral en teleósteos con el núcleo lateral en mamíferos según su expresión génica (Bühler and Carl, 2021).

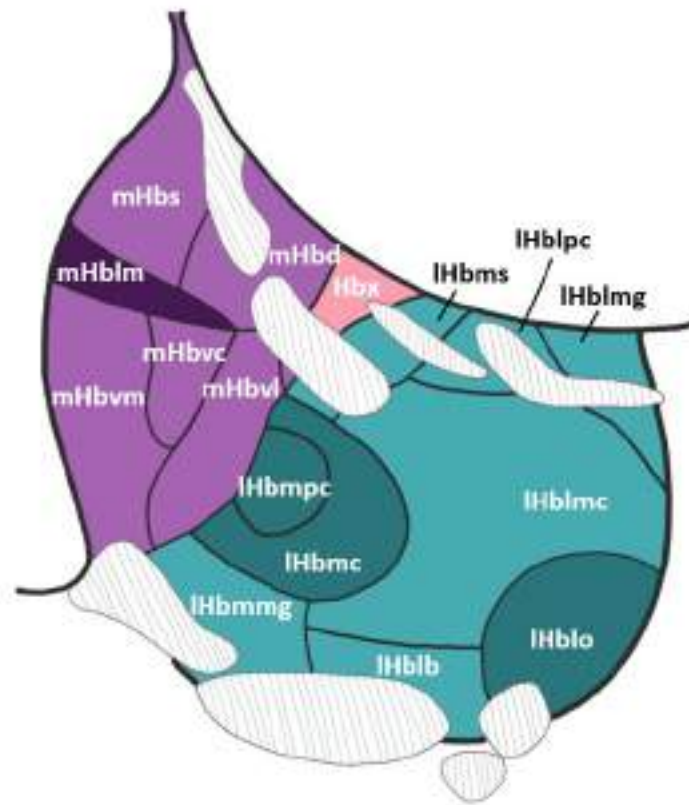
Centrándonos en los mamíferos, la Hb tiene dos subnúcleos principales, la Habénula medial (mHb) y la Habénula lateral (lHb; *Figura 10*) que difieren en su conectividad, características neuroquímicas y funciones relacionadas, siendo el núcleo lateral el más grande en superficie (Schmidt and Pasterkamp, 2017; Zahm and Root, 2017; Roman et al., 2020) pero el que cuenta con menor densidad neuronal (Hashikawa et al., 2020; Wallace et al., 2020).

Esta organización original ha sido fuertemente subdividida en diferentes subpoblaciones definidas por transcriptómica (expresión génica). De forma que, la lHb, queda dividida en nueve subpoblaciones, y la mHb en seis, más una pequeña subpoblación intercalada llamada Hbx (Wagner et al., 2014, 2016)



**Figura 10. Amplificación del núcleo habenular en una sección coronal de cerebro de ratón adulto.** Imagen modificada del Allen brain atlas.

La lHb está dividida en una porción medial (lHbm) y una lateral (lHbl). La lHbm está compuesta del subnúcleo parvocelular de la división medial de la lHb (lHbm<sub>pc</sub>), el subnúcleo central de la división medial de la lHb (lHbm<sub>c</sub>), el subnúcleo superior de la división medial de la lHb (lHbm<sub>s</sub>), y el subnúcleo marginal de la división medial de la lHb (lHbm<sub>mg</sub>). La lHbl puede ser subdividida en el subnúcleo marginal de la división lateral de la lHb (lHbl<sub>mg</sub>), subnúcleo parvocelular de la división lateral de la lHb (lHbl<sub>pc</sub>), el subnúcleo magnocelular de la división lateral de la lHb (lHbl<sub>mc</sub>), el subnúcleo basal de la división medial de lHb (lHbl<sub>b</sub>), y el subnúcleo oval de la división lateral de la lHb (lHbl<sub>o</sub>). Al mismo tiempo, la mHb está también dividida en una parte medial (mHbm) y una lateral (mHbl). La parte medial está compuesta por el subnúcleo intermedio de la mHb (mHb<sub>im</sub>), el subnúcleo superior de la mHb (mHb<sub>s</sub>), y el subnúcleo medial de la parte ventral de la mHb (mHb<sub>vm</sub>). Mientras, la mHbl está compuesta del subnúcleo central de la parte ventral de la mHbl (mHb<sub>vc</sub>), el subnúcleo dorsal de la mHbl (mHb<sub>d</sub>), y el subnúcleo lateral de la parte ventral de la mHbl (mHb<sub>vl</sub>). Hay también una pequeña región intercalada denominada Hbx que está compuesta principalmente por tractos de fibras (*Figura 11*; Wagner et al., 2016) y cuyo perfil transcriptómico la asemeja más a la lHb que a la mHb (Hashikawa et al., 2020).



**Figura 11.** Representación esquemática de los diferentes subnúcleos habenules definidos por Wagner et al, 2016. Imagen adaptada del propio artículo.

Estas subdivisiones han sido simplificadas pero corroboradas por experimentos de secuenciación de ARN en células individuales del conjunto de la Hb (Pandey et al., 2018; Hashikawa et al., 2020; Wallace et al., 2020).

La mayoría de las neuronas de lHb son glutamatérgicas (Li et al., 2011; Stamatakis and Stuber, 2012). Además, existe una pequeña población de interneuronas gabaérgicas inhibitorias y colinérgicas (Bianco and Wilson, 2009; Batalla et al., 2017).

La mayoría de neuronas de la mHb son colinérgicas, y en una menor proporción, peptidérgicas (neuropéptido P; Contestabile and Fonnum, 1983; Artymyshyn and Murray, 1985). Esta vía neuronal está altamente conservada en varias especies (Broms et al., 2015), sin embargo, los resultados de diversos estudios, sugieren que, al menos en ratones, también el glutamato se usa como neurotransmisor junto a la acetilcolina y sustancia P (Figura 12; Qin and Luo, 2009).

## 2.3 Desarrollo del núcleo habenular

El correcto desarrollo y circuitaría de los núcleos habenulares es esencial para mantener sus funciones intactas. Los programas moleculares que controlan la morfogénesis y la conectividad de la Hb en desarrollo son complejos (Schmidt and Pasterkamp, 2017).

Como se ha explicado anteriormente, el tubo neural sufre una segmentación AP que da como resultado unos segmentos denominados neurómeros que darán lugar a las distintas regiones cerebrales con características histogenéticas propias. El núcleo habenular es parte del diencefalo (Schmidt and Pasterkamp, 2017; Puelles, 2019). Esta estructura está formada por tres prosómeros p3, p2 y p1 (Puelles, 2019; Roman et al., 2020). La Hb deriva de la placa alar de p2 o prosómero talámico (Martinez-Ferre and Martinez, 2012), un dominio definido por la expresión de determinados factores de transcripción. *Fgf8* es un morfógeno importante en el control de la diferenciación y proliferación de progenitores habenulares (Regan et al., 2009). Además, varios estudios reportan evidencia del requerimiento de la vía *Wnt* en el desarrollo de la Hb (Beretta et al., 2013; Hüsken and Carl, 2013; Kuan et al., 2015; Schmidt and Pasterkamp, 2017; Guglielmi et al., 2020; Roman et al., 2020). El estudio del rol de *Wnt* en la formación de la Hb y el fr, constituye uno de los principales objetivos de este trabajo.

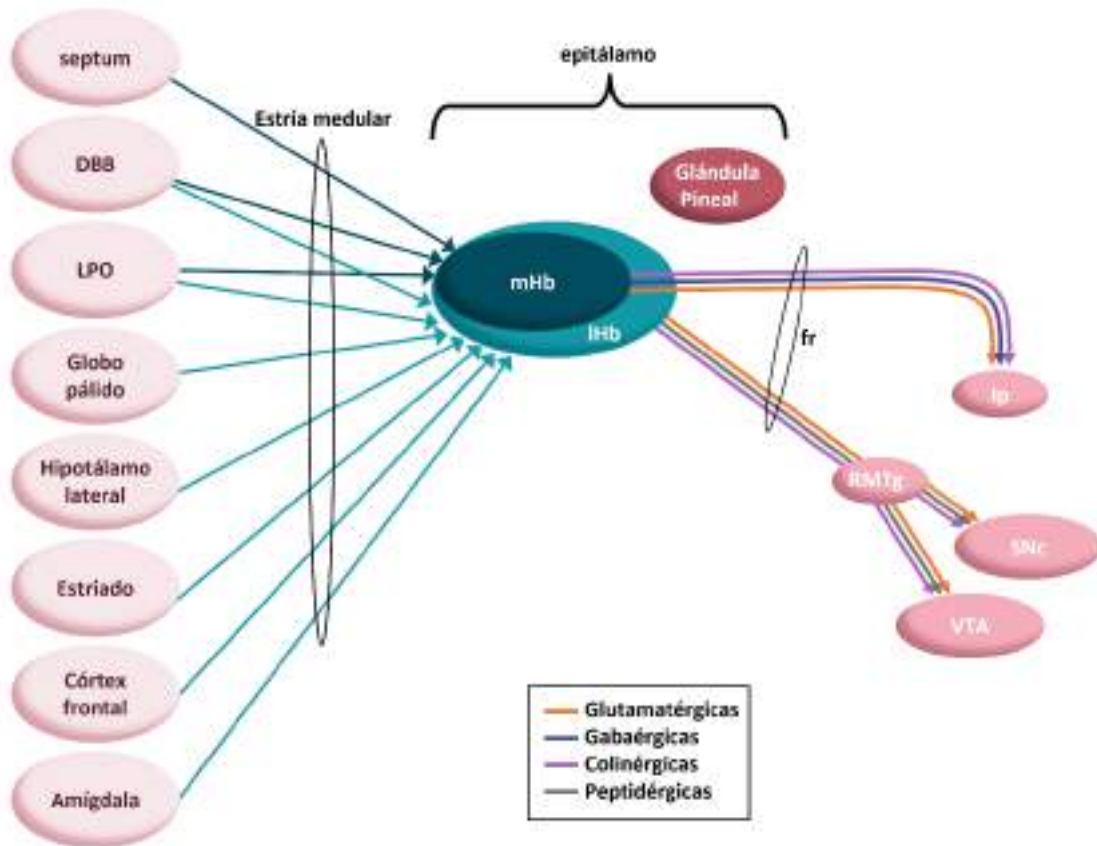
## 2.4 Conectividad del núcleo habenular

La Hb de los mamíferos constituye una estación de relevo de información entre el prosencéfalo secundario y el mesencéfalo y rombencéfalo (Schmidt and Pasterkamp, 2017). Es uno de los componentes del sistema de conducción dorsal diencefálico, sistema altamente conservado que une el prosencéfalo con el sistema monoaminérgico (Zahm and Root, 2017; Fakhoury, 2018; Roman et al., 2020). Este sistema proyecta a través de la sm a la Hb, que proyecta a través del fr al Ip en el rombencéfalo y a los núcleos monoaminérgicos en el diencefalo, mesencéfalo y rombencéfalo (Zahm and Root, 2017).

La Hb recibe inputs, por tanto, desde áreas límbicas rostrales con diferentes funciones a través de la sm. Esas áreas son: el núcleo triangular del septum y el núcleo septofimbrial involucrados en el placer y la motivación, el hipotálamo lateral con un rol descrito en dolor, algunas regiones de la corteza frontal (toma de decisiones) y diversos núcleos (pálido, estriado, amígdala) implicados en el control motor y conductual (Hu et al., 2020; Roman et al., 2020). Los inputs del septum llegan a la mHb y sus outputs al núcleo Ip. Los inputs del hipotálamo y los ganglios basales llegan a la lHb, y sus outputs inervan los núcleos monoaminérgicos (sistemas dopaminérgicos y serotoninérgicos) localizados en el diencéfalo, mesencéfalo y rombencéfalo (Viswanath et al., 2014; Zahm and Root, 2017; Roman et al., 2020). La banda diagonal de Broca (DBB) y el área lateral preóptica (LPO), inervan ambas Hb (mHb and lHb; Hikosaka, 2010; Hu et al., 2020).

Una vez esos inputs son integrados en la Hb, sus fibras eferentes confluyen para formar el fr. Este tracto se encuentra dividido en dos partes concéntricas, el centro de los axones de la mHb y la capa externa de los axones de la lHb (Roman et al., 2020). Las fibras mediales inervan el núcleo Ip mientras que los axones de la lHb inervan áreas monoaminérgicas, como el núcleo tegmental rotromedial (RMTg), la SNc y el VTA en el diencéfalo y mesencéfalo (involucradas en el sistema de liberación de dopamina). Mientras tanto, los axones del núcleo Ip proyectan hacia los núcleos medianos y dorsal del rafe, involucrados en la liberación de serotonina (*Figura 12*). Este tracto también tiene proyecciones ascendentes desde las SNc hacia la lHb (Hikosaka, 2010; Loonen and Ivanova, 2016; Mathuru, 2018).

Se ha postulado que la Hb actúa como un vínculo entre el prosencéfalo y estas regiones del mesencéfalo y del rombencéfalo que participan en la regulación de los comportamientos emocionales mediante la modulación de estos neuromoduladores que son esenciales para las actividades motoras y mentales normales (Hikosaka, 2010).



**Figura 12. Conectividad neuroquímica de los núcleos habenules.** La imagen muestra las principales aferencias y eferencias de los núcleos habenules y las características neuroquímicas de sus núcleos principales (mHb y lHb). DBB, Banda diagonal de Broca; LPO: área lateral preóptica; mHb, Habénula medial; lHb, Habénula lateral; Ip, núcleo interpeduncular; RMTg, núcleo rostromedial tegmental; SNc, substantia negra pars compacta; VTA, área tegmental ventral. Imagen adaptada de Hikosaka et al., 2010 y Loonen and Ivanova, 2016.

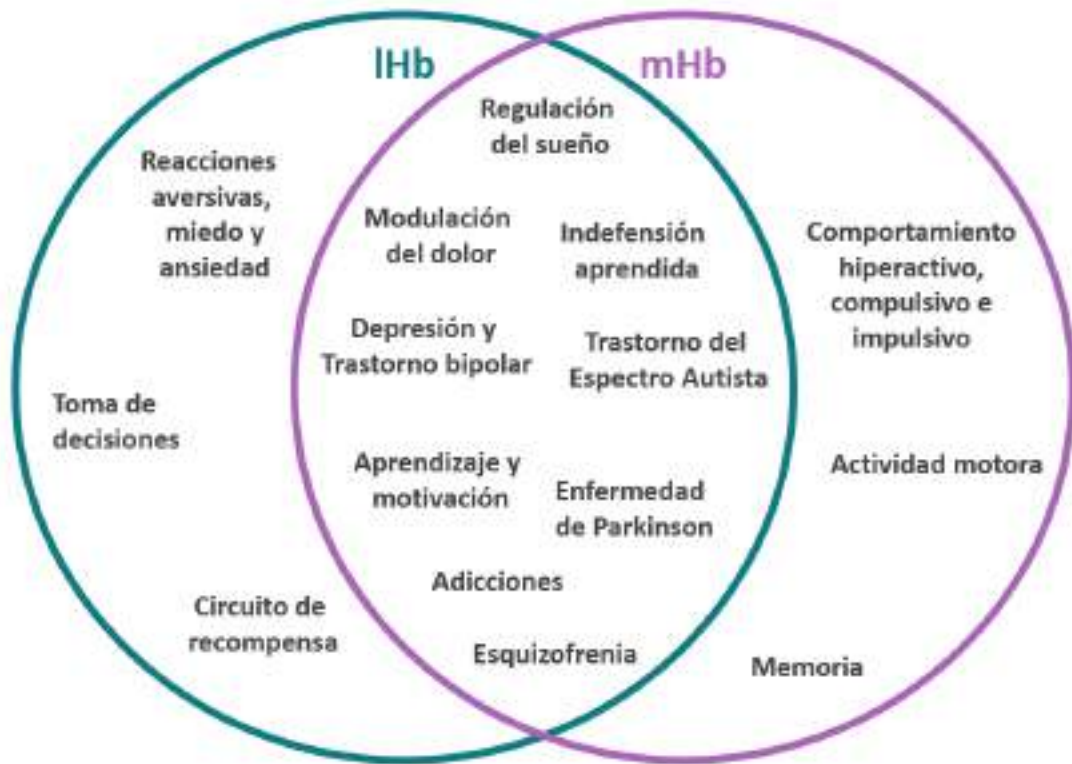
## 2.5 Función del núcleo habenular

En el pez cebra, se ha relacionado la Hb funcionalmente con el aprendizaje, el comportamiento social y la atención (Nakajo et al., 2020; Okamoto et al., 2021); toma de decisiones (Cherng et al., 2020); reacciones aversivas (Amo et al., 2014); miedo y ansiedad (Agetsuma et al., 2010; Jesuthasan, 2012; Mathuru and Jesuthasan, 2013; Okamoto et al., 2021); y comportamientos de “indefensión aprendida” (Lee et al., 2010).

En mamíferos, existe una amplia variedad de estudios funcionales del sistema habenular, que utilizan lesiones, estimulaciones eléctricas (Klemm, 2004; Lecourtier and Kelly, 2005, 2007) y optogenética para desentrañar sus funciones. Debido a sus proyecciones a través de los núcleos mes-diencefálicos monoaminérgicos, la Hb tiene un importante rol en su regulación. Este hecho implica a la Hb en la regulación de comportamientos relacionados con el circuito de recompensa (ver para revisión: Hikosaka et al., 2008; Hikosaka, 2010; Batalla et al., 2017; Fakhoury, 2018), tales como la toma de decisiones (Hong and Hikosaka, 2008; Koppensteiner et al., 2016; Otsu et al., 2018; Li et al., 2021); la evitación de estímulos aversivos (Matsumoto and Hikosaka, 2007, 2009; Salas et al., 2010; Schmidt and Pasterkamp, 2017; Hu et al., 2020), la modulación del dolor (Roman et al., 2020) y la actividad motora (Gifuni et al., 2012; Otsu et al., 2018).

Además, se ha relacionado con diferentes patologías mentales tales como la depresión, la esquizofrenia y la drogadicción, algunos trastornos como el Trastorno del Espectro Autista y con algunas enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Parkinson (Hikosaka, 2010; Benarroch, 2015; Fakhoury, 2017; Schmidt and Pasterkamp, 2017; Hu et al., 2020; Roman et al., 2020; Vickstrom et al., 2020; Bühler and Carl, 2021).

En el esquema representado en la *Figura 13* se observa un resumen de las funciones y patologías relacionadas clasificadas según el núcleo afectado.



**Figura 13.** Resumen de las funciones y patologías relacionadas con la Hb clasificadas según el núcleo afectado (mHb o lHb). Basado en Benarroch, 2015; Roman et al., 2020; y Bühler and Carl, 2021.

## 2.6 El fascículo retroflejo (fr)

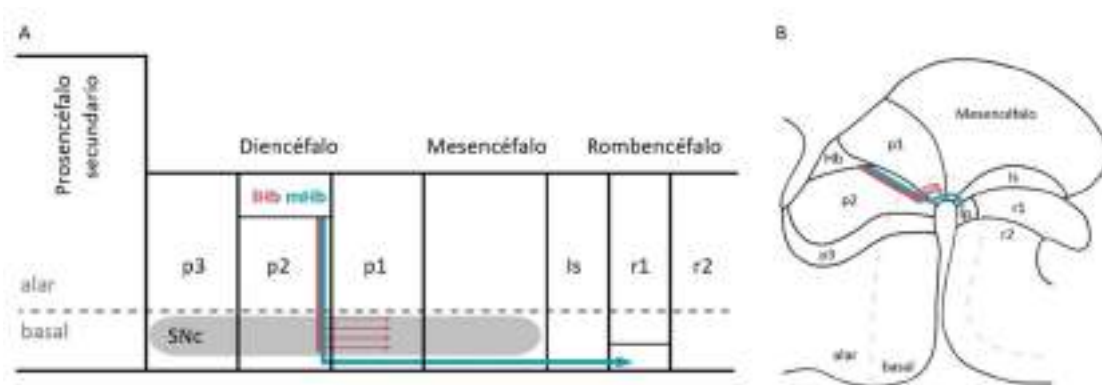
Cómo se ha comentado anteriormente, ambos núcleos habenulares proyectan a través del fr. Los axones de la mHb ocupan el centro del tracto, mientras que los de la lHb la superficie del mismo (Herkenham and Nauta, 1979; Ichijo and Toyama, 2015). Esta organización está acompañada de un comportamiento diferencial durante su trayectoria.

## 2.7 Trayectoria del fr en el contexto del paradigma prosomérico

La trayectoria del fr es compleja, teniendo sus axones que tomar diferentes decisiones clave durante su desarrollo. En primer lugar, el tracto viaja dentro de p2 desde la Hb de forma paralela al límite p2/p1 en dirección DV hacia la placa basal.



Llegados a este punto, el tracto evita penetrar en la placa del suelo y cambia su dirección, navegando en el eje AP. En este punto los axones de la mHb y los de la lHb, adoptan comportamientos diferentes: mientras los axones de la lHb desfasciulan para inervar los núcleos monoaminérgicos tanto del diencefalo como del mesencefalo (Hikosaka, 2010; Moreno-Bravo et al., 2016), los de la mHb siguen viajando a través de la placa basal del diencefalo, mesencefalo y el istmo (Moreno-Bravo et al., 2016), dónde alcanzan el r1 y cruzan la línea media del suelo varias veces formando un patrón característico en forma de ocho antes de inervar el núcleo Ip (Figura 14; Ramón y Cajal, 1909; Moreno-Bravo et al., 2016; Schmidt and Pasterkamp, 2017).



**Figura 14. Trayectoria del fr en el contexto del modelo prosomérico.** A: Vista lateral de un tubo neural esquematizado mostrando la trayectoria del fr y la inervación de los territorios diana de los axones de la lHb (rojo) y la mHb (verde). B: Representación de un tubo neural con la flexura céflica mostrando la trayectoria del fr y la inervación de los territorios diana de los axones de la lHb (rojo) y la mHb (verde). Abreviaturas: p, prosómero; ls, istmo; r, rombómero; SNC, sustancia negra pars compacta; Ip, Núcleo interpeduncular. Imagen modificada de Moreno-Bravo et al., 2016.

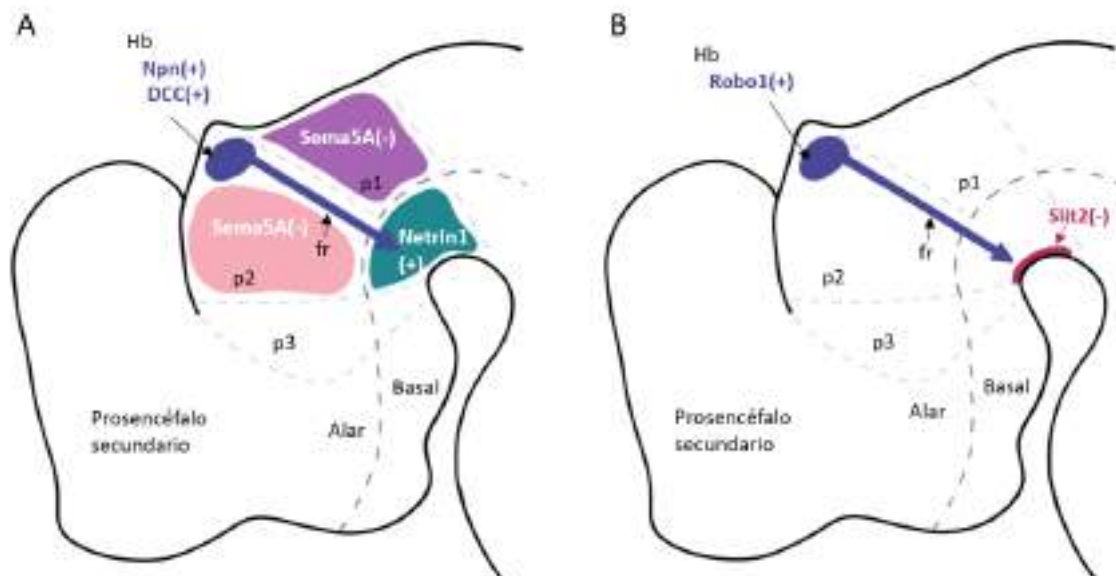
## 2.8 Guía axonal del fr en desarrollo

Mientras están creciendo, los axones siguen moléculas de señalización que establecen rutas específicas para alcanzar sus dianas. Estas moléculas de señalización pueden ser atractivas o repulsivas y pueden actuar por contacto o ser

secretadas en forma de gradiente de señalización (Tessier-Lavigne and Goodman, 1996; Kolodkin and Tessier-Lavigne, 2011).

La característica trayectoria del fr, previamente explicada, presenta una serie de decisiones claves durante su desarrollo (Moreno-Bravo et al., 2016) poco estudiadas por el momento. En primer lugar, el cono axonal crece gracias a la guía de moléculas expresadas en los neurómeros adyacentes. Crece desde la Hb, recorriendo de forma paralela al límite entre p1/p2 (Aizawa et al., 2011; Schmidt and Pasterkamp, 2017) gracias a una fuerte expresión de SEMA3F en p1 y SEMA5A en p2, moléculas de guía repulsivas reconocidas por NPN2 receptor expresado en los axones de la mHb (Funato et al., 2000; Kantor et al., 2004). Gracias a esas moléculas, y a señales atractivas de NTN1 reconocidas por el receptor DCC expresado en los axones de la mHb (Aizawa et al., 2011; Schmidt and Pasterkamp, 2017), el tracto viaja fasciculado hasta alcanzar la placa basal (*Figura 15A*; Funato et al., 2000; Schmidt and Pasterkamp, 2017; Roman et al., 2020).

Llegados a este punto de la trayectoria, el tracto no penetra la placa del suelo debido a la señalización repulsiva de Slit2 mediada por Robo1 expresados en los axones de la mHb (*Figura 15B*; Moreno-Bravo et al., 2016; Roman et al., 2020).



**Figura 15. Esquema de una visión sagital del fr y sus moléculas de señalización sobre la trayectoria del mismo.** A: Trayectoria DV. B: Evitación de la placa del suelo. Imagen modificada de Aizawa et al., 2011. Abreviaturas: fr, fascículo retroflejo, Hb, Habénula; p, prosómero.

Se desconocen los mecanismos de guía que median los siguientes pasos de la trayectoria: el giro en dirección caudal, el comportamiento diferencial de la mHb y la lHb (la primera sigue su camino para inervar el Ip mientras la segunda desfascicula para inervar los núcleos dopaminérgicos), y el cruce característico en forma de “ocho” de los axones de la mHb para inervar el Ip (Ramón y Cajal, 1909).

Conocer el mecanismo involucrado en el giro caudal de los axones, constituye otro de los objetivos del presente trabajo. Dada la complejidad de la trayectoria, hipotetizamos que la SNc juega un papel como diana intermedia de los axones mHb, dirigiéndolos caudalmente hacia su destino final.

Respecto al mecanismo involucrado en el comportamiento diferencial de la mHb y la lHb, creemos que podría deberse a la expresión diferencial de receptores y proteínas de membrana entre ambos núcleos. Las neuronas de la mHb y la lHb expresan una combinación diferencial de moléculas de guía axonal y de adhesión celular, como se demostró mediante microdissección de captura con láser y espectrometría de masas (Schmidt et al., 2014). Entre las moléculas encontradas en la mHb, Schmidt y colaboradores describieron la presencia de proteínas conocidas como el receptor de NTN1, DCC. También NPN2, receptor de SEMA3F, responsable de la respuesta aversiva de los axones de la mHb hacia el territorio alar pretectal (Funato et al., 2000; Giger et al., 2000; Sahay et al., 2003). Otras moléculas como Plexin-B2 (Worzfeld et al., 2004; Perälä et al., 2005) no se expresan en la Hb en la ventana de tiempo que comprende el desarrollo del fr.

Entre todas las moléculas, la expresión específica en la mHb de una de ellas, Amigo2, nos llevó a seleccionarla como molécula candidata para desempeñar un papel en el comportamiento diferencial, la trayectoria y la fasciculación de los axones de la mHb. Constituyendo, el estudio del rol de Amigo2 en el desarrollo de la Hb y el fr, el último de los objetivos de este trabajo.

### *Amigo2:*

La molécula de interés fue nombrada, tras su descubrimiento, como “immunoglobulin like protein named **am**photerin induced **g**ene and **ORF 2**”

(Amigo2; Laeremans et al., 2013), aunque en el presente es conocida como: “adhesion molecule with immunoglobulin like domain 2” (Park et al., 2015).

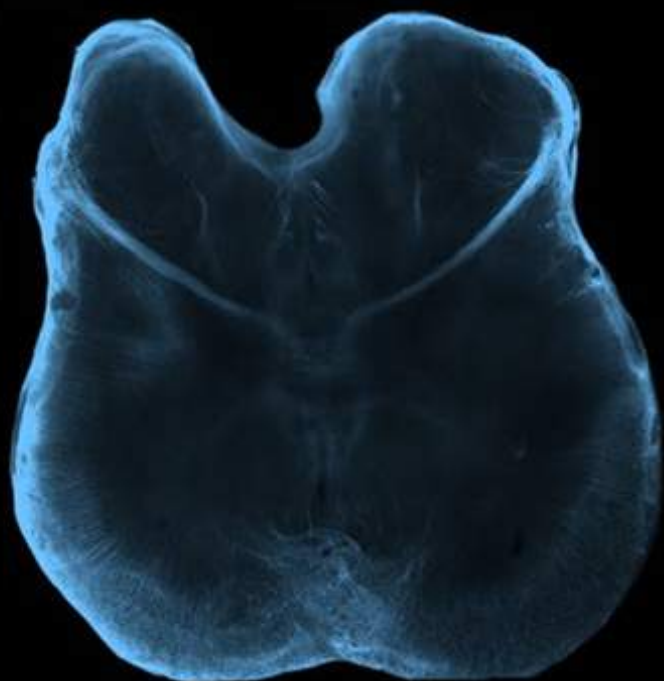
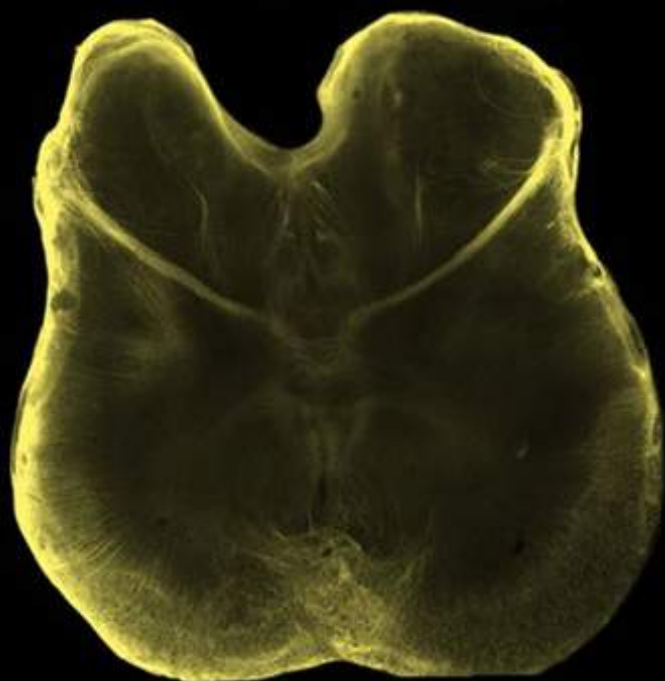
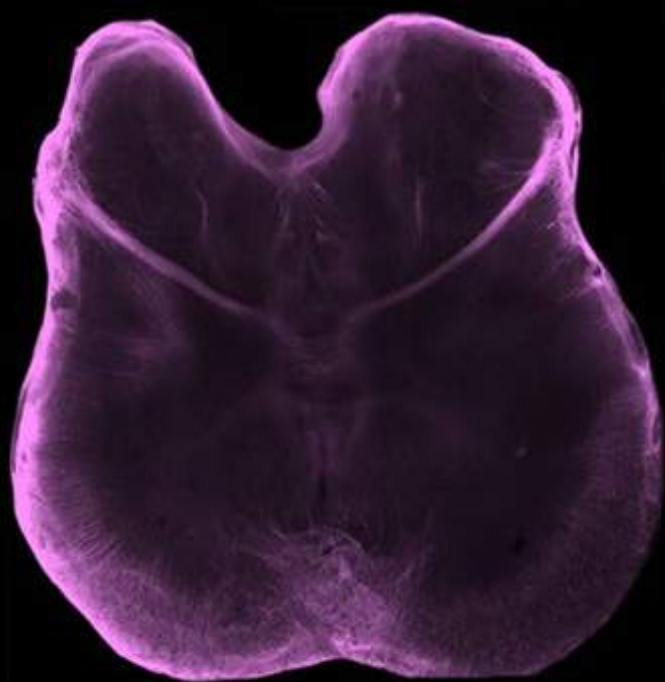
En el sistema nervioso central se expresa principalmente en el hipocampo (Kuja-Panula et al., 2003; Ono et al., 2003; Laeremans et al., 2013), aunque también lo hace en otras zonas como la mHb (Wagner et al., 2014) y núcleos del hipotálamo. Pertenece a la familia de las Proteínas transmembrana tipo I y media sus interacciones célula-célula mediante uniones homofílicas (Amigo2-Amigo2) y heterofílicas (Amigo1-Amigo2-Amigo3; Kuja-Panula et al., 2003). Su función ha sido relacionado con el desarrollo de los circuitos neuronales (Zhao et al., 2014) y con el crecimiento y fasciculación de neuritas (Kuja-Panula et al., 2003).

Han sido descritas diferentes alteraciones de este gen en humanos. La pérdida de función de Amigo2 en dos pacientes con delección proximal 12q ha sido relacionado con retrasos en el desarrollo psicomotor (Miyake et al., 2004). Por otra parte, el análisis genómico de un paciente con discapacidad intelectual entre múltiples anomalías congénitas, relacionó directamente las alteraciones de la secuencia de Amigo2 con su condición mental (Gimelli et al., 2011) y, además, ha sido relacionado con pacientes con Displasia oculoauriculovertebral (Rengasamy Venugopalan et al., 2019; Guida et al., 2021). Finalmente, la sobreexpresión de Amigo2 se ha relacionado con un incremento en las propiedades metastásicas de cánceres hepático, pulmonar, gástrico, ovárico o melanoma (Fontanals-Cirera et al., 2017; Huo et al., 2017; Kanda et al., 2017; Sonzogni et al., 2018; Nakamura et al., 2020; Liu et al., 2021).

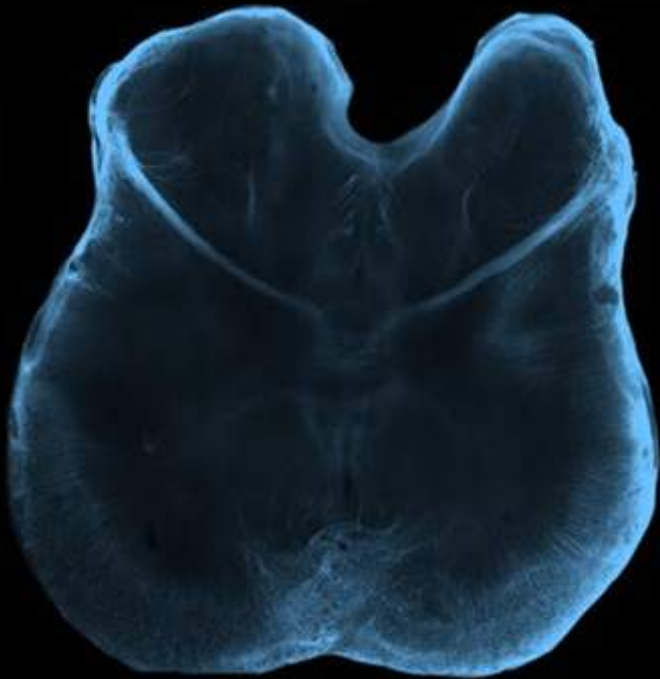
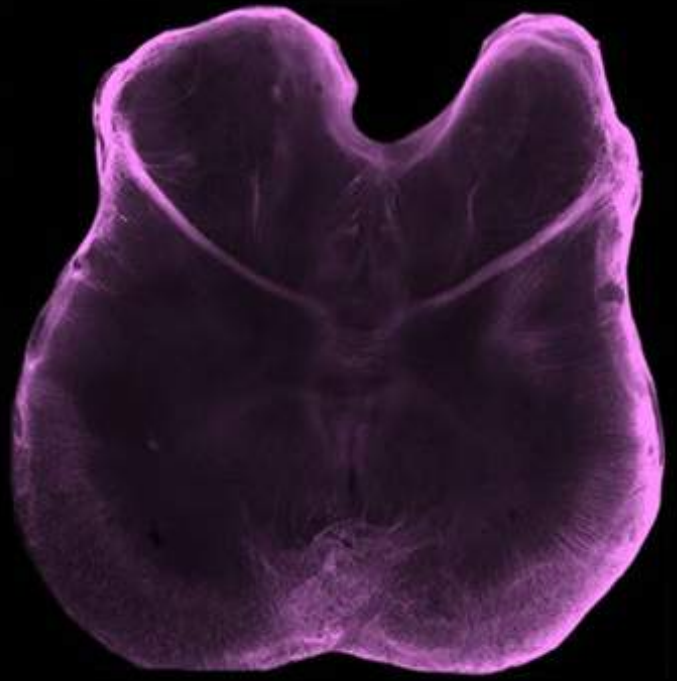
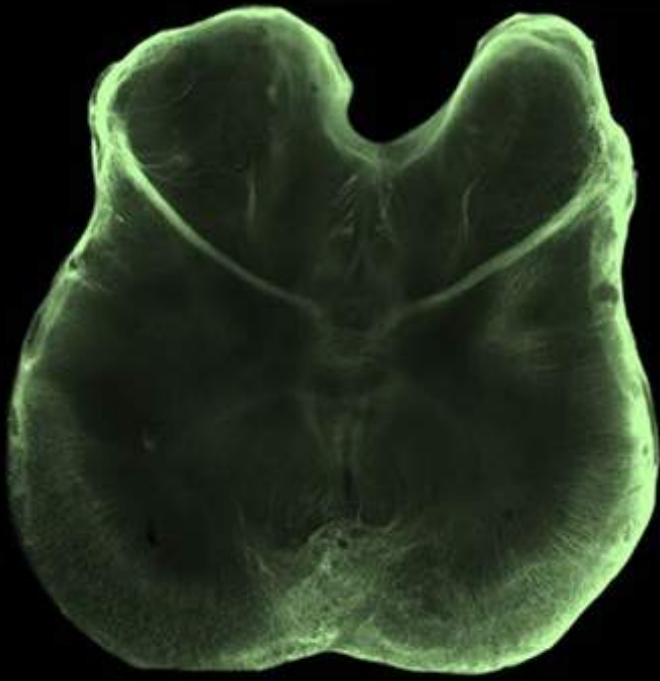
### 3. Objetivos

El objetivo principal del proyecto de tesis es profundizar en el conocimiento existente sobre el desarrollo del tracto retroflejo y su trayectoria. Para ello, hemos propuesto estos tres objetivos específicos:

1. Estudiar el rol de la Snc cómo diana intermedia de los axones habenulares mediales e identificar la molécula responsable del giro de los mismos en dirección caudal.
2. Determinar el rol del morfógeno *Wnt1* en el desarrollo habenular y del fr.
3. Analizar el rol de la molécula de superficie AMIGO2 en el comportamiento de los axones habenulares.







**MATERIALES Y  
MÉTODOS**







## Materiales y métodos

### Experimentación animal

Todas las líneas de ratones utilizadas comparten fondo genético C57BL/6J, y han sido obtenidas de la Unidad de Sant Joan d'Alacant del Servicio de Experimentación Animal de la Universidad Miguel Hernández de Elche. En el citado animalario, los animales se encuentran en condiciones controladas de temperatura ( $21 \pm 1^\circ\text{C}$  y 40-45% de humedad) con ciclos de 12 horas de luz/ oscuridad. La comida y agua están disponibles *ad libitum*.

Todos los experimentos han sido diseñados de acuerdo a las regulaciones y leyes de la Unión Europea (Directiva 2003/65/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 22 de julio de 2003) y del Gobierno Español (Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero de 2013) sobre la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos. Además, han sido autorizados por la Oficina de Investigación Responsable de la Universidad Miguel Hernández de Elche (2016/VSC/PEA/00190).

### Líneas de Modelos Murinos

- **Amigo2 knockout.** La cepa *Amigo2*<sup>-/-</sup> fue generada y cedida por el laboratorio del Dr. Heikki Rouvala en Helsinki (Finlandia). La región codificante completa de *Amigo2* fue remplazada por el gen de la Fosfatasa Alcalina de placenta humana bajo el promotor de *Amigo2*. Para la selección se usó un casete de resistencia a Neomicina (Li et al., 2017).
- **Dcc knockout.** Los embriones *Dcc*<sup>-/-</sup> fueron generados por el laboratorio del Dr. Robert Weinberg y cedidos por el laboratorio de la Dra. Guillermina López-Bendito en Alicante (España). La línea fue creada por recombinación homóloga, insertando un casete de neomicina en el exón 3 del gen *Dcc*. La proteína DCC resultante no es funcional (Fazeli et al., 1997).

- **Ntn1 knockout.** Los embriones *Ntn1*<sup>-/-</sup> fueron generados y cedidos por el laboratorio del Dr. Alain Chedotal en París (Francia). Para generar el alelo nulo de *Ntn1*, se cruzó la cepa condicional *Ntn1*<sup>flox/flox</sup> con la línea *Krox20:cre* que expresa la recombinasa Cre en la línea germinal de hembras y machos (Dominici et al., 2017).
- **Gli2 knockout.** La línea *Gli2*<sup>-/-</sup> fue generada en el laboratorio de la Dra. Alexandra Joyner en Nueva York (USA) y los ratones fueron cedidos por el laboratorio de la Dra. Marina Ros (Santander; España). La línea fue obtenida por recombinación homóloga insertando un casete de neomicina en la región codificante del gen *Gli2* (Mo et al., 1997).
- **Wnt1 knockout.** La línea *Wnt1*<sup>-/-</sup> fue generada en el laboratorio del Dr. McMahon y cedida por el laboratorio del Dr. Wolfgang Wurst (Munich; Alemania). La línea fue generada por recombinación homóloga insertando un casete de neomicina en el exón 2 del gen *Wnt1* (McMahon et al., 1992).

## Obtención y procesamiento de las muestras

El día de detección del tapón vaginal es considerado como día de desarrollo embrionario 0.5 (E0.5). Para obtener los embriones se sacrifica la hembra por dislocación cervical y se aísla a los embriones del útero con la ayuda de una lupa estereoscópica (modelo LEICA EZ4D). Seguidamente son lavados en una solución salina de PBS 1X (Phosphate Buffered Saline 10x: 137mM NaCl, 2.7mM HCl, 10mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; pH 7.4) e inmediatamente se procede a su fijación en una solución de paraformaldehído (PFA) al 4% (Paraformaldehyde 95%; Merck-Sigma; #158127-500G) en PBS 1X donde permanecen a 4°C O/N. Tras la fijación, las muestras se lavan en PBS 1X (2 cambios de 40 minutos) y a continuación, o bien se procede a su utilización, o se deshidratan progresivamente en una batería creciente de etanoles (EtOH; Montplet; #ALCH0321F5) 25%, 50%, 70% y 100% (1 cambio de 40 minutos en cada alcohol excepto en el de 100% que se realizan 2) y almacenados a 4°C o -20°C hasta su posterior selección y uso.

## Genotipado

### Extracción del ADN:

Con el objetivo de extraer el ADN, se obtiene un fragmento de tejido de cada embrión y se centrifuga la muestra a 13.000 rpm durante 1 minuto, a continuación, se añade 100  $\mu$ l de NaOH (Sodium Hydroxide solution; Sigma Aldrich; #72068) 50mM. Posteriormente se digiere la muestra en el termobloque a 95°C durante 25 minutos en agitación.

### Protocolo de PCR:

Tras la extracción del ADN, se añade 1 $\mu$ l del mismo, 1 $\mu$ l de primers y 13 $\mu$ l de Kappa mix (H<sub>2</sub>O, polimerasa, dNTPs y cofactores; Roche; KK5601) a cada tubo de PCR.

- Línea *Gli2*<sup>-/-</sup>:

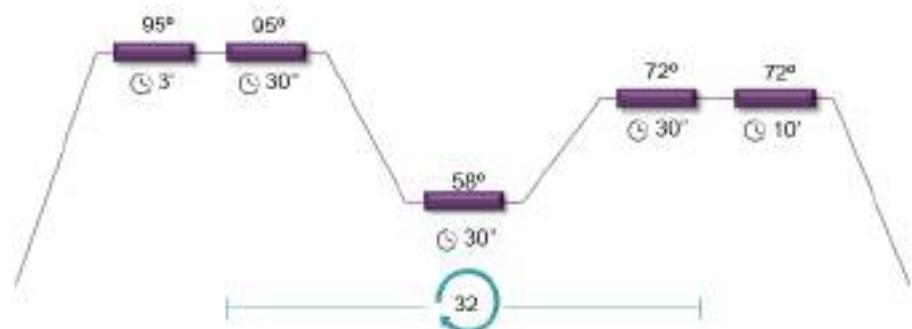
#### Primers:

- Sense *Gli2*: 5'AAACAAAGCTCCTGTACACG3'
- Antisense *Gli2*: 5'CACCCCAAAGCATGTGTTTT3'
- pPNT: 5'ATGCCTGCTCTTTACTGAAG3

#### Tamaño de bandas:

- WT: 300 bp
- Mutante: 600 bp

#### Condiciones:



○ Línea *Amigo2*<sup>-/-</sup>:

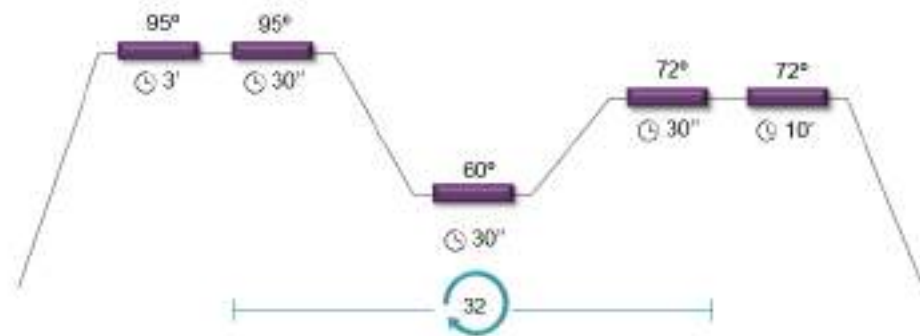
**Primers:**

- P1 (WT): 5'CGGACAGAATGGCAAAGTCAAG3'
- P2 (WT-MUT): 5'GGCTGGTCCTACTGCCTTCAAG3'
- P3 (MUT): 5'TACGAAGTTATTAGGTCCCTCGAC3'

**Tamaño de bandas:**

- WT: 421 bp
- Mutante: 494 bp

**Condiciones:**



○ Línea *Wnt1*<sup>-/-</sup>:

Se realiza una PCR independiente para cada banda.

**Primers:**

Banda WT (1.1):

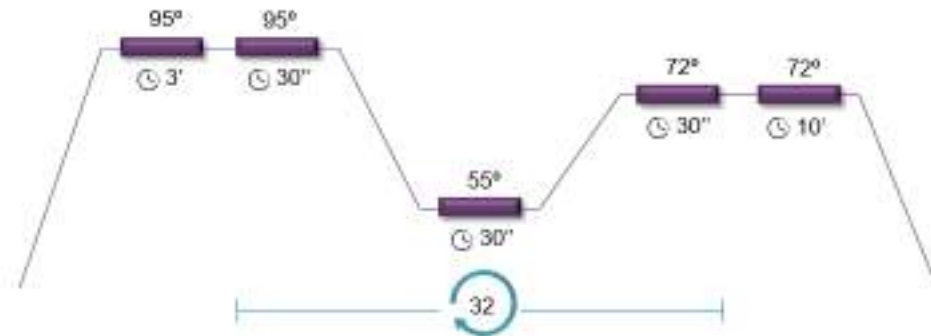
- Oligo *Wnt1*-19: 5'GTCACTGCAGCCCCCCCAGTG3'
- Oligo *Wnt1*-300: 5'GCCTCCTCCACGAACCTGTTGACG3'

Banda mutante (1.5):

- Oligo *Wnt1*-1114: 5'GAACTCTCGGCCAAAGAGGCGACCA3'
- Oligo *Wnt1*-1480: 5'CGGGCGAGGCCGGTGAGTGAGCG3'

**Tamaño de bandas:**

- WT: 996 bp
- Mutante: 1025 bp

**Condiciones:**

Los resultados de la PCR son visualizados por electroforesis. Las muestras son cargadas en un gel de agarosa al 2% de Green Safe Premium (NZYTech; #MB13201) en TAE 1x (TAE 50X: Tris base 242gr, Ácido acético glacial 57,1ml, EDTA 0.5M; pH 100ml), se corren y tras 20-30 minutos son visualizadas en una lámpara de luz ultravioleta (modelo TFX-20-M).

**Técnicas histológicas****Inclusión y corte en parafina**

En primer lugar, los cerebros/embriones almacenados en EtOH 100% son inmersos en butanol (Panreac; #131082.1611; 2 cambios de 15 minutos) para retirar toda traza de EtOH (no miscible con la parafina). A continuación, las muestras son incubadas en parafina líquida (Polysciences; #24198 -1Gold Standard Peel-A-Way) a 60°C, donde se realizan 6 cambios de 30 minutos con el fin de eliminar totalmente los restos de butanol.

Una vez incluida la muestra se deposita la misma en un molde de plástico con forma de cubo (Sigma-Aldrich; E6032-1CS) donde se orienta el embrión y se deja solidificar la parafina a temperatura ambiente. Una vez sólida la parafina, se extrae el bloque del molde, se talla y se procede a obtener las secciones, realizándose los cortes con un microtomo (modelo Microm HM 335 E). El grosor de cada sección se ha fijado en 10µm. Posteriormente, los cortes son depositados en un baño (modelo 610.1030.00; Falc Instruments) con agua destilada a 37-40°C y montados sobre portaobjetos (Portaobjetos StarFrost Advances Adhesive; KTVS111711APNDX), en series paralelas con la ayuda de un pincel. Después, se dejan secar en una estufa a 37°C durante un día y se almacenan a temperatura ambiente hasta su utilización.

### **Inclusión y corte en agarosa:**

En primer lugar, se rehidratan los cerebros mediante lavados de 30-60 minutos en EtOH a concentración decreciente (100%, 75%, 50%, 25%) y PBS 1X. A continuación, se prepara agarosa (Merck-Sigma; A9414) al 4% en PBS, se calienta en un microondas hasta su completa disolución y se incluyen los cerebros en la orientación adecuada. Se procede a la rápida solidificación del bloque sobre una bandeja con hielo y se cortan con el vibratomo (modelo VT1000S Leica). Se obtienen cortes de 100µm que se recogen con un pincel y se almacenan en los pocillos de una placa debidamente etiquetada en PBS 1X y azida sódica (Sigma Aldrich; S2002) al 0.02M hasta su utilización.

### **Técnicas de inmunodetección**

#### ***Cortes en parafina***

Con el objetivo de desparafinar los cortes, estos son introducidos 40 minutos en una estufa a 95°C y posteriormente inmersos en xilol (Panreac; 141769.2711), donde se realizan 2 cambios de 10 minutos. Posteriormente los cortes son rehidratados en una serie decreciente de alcoholes al 100%, 96%, 70% hasta agua. Cada paso es de 5 minutos.

A continuación, se procede a la re-exposición de los epítomos. Para ello, se hierven los portaobjetos en un tampón de citrato sódico (Sigma-Aldrich; S4641) a 0,01M pH6 en agua. El hervido se lleva a cabo en un microondas convencional a 750 vatios de potencia en 4 tiempos (1x 4 min y 3x 3 min).

Después del tratamiento, los cortes son lavados en PBST, PBS 1X con Tritón (Tritón X-100; Merck-sigma; 9002-93-1,) al 0,1% para eliminar los restos de citrato sódico. A continuación, se bloquea la peroxidasa endógena del tejido con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Sigma-Aldrich; 95321-500l) al 1,5% durante 30 minutos a temperatura ambiente en vasos coplin protegidos de la luz. Tras lavar de nuevo con PBST se procede a bloquear las uniones inespecíficas del anticuerpo primario con una solución de bloqueo compuesta por lisina (Sigma Aldrich; L-5626-1kg) al 10%, albúmina de suero bovino (BSA; Sigma Aldrich; A7906) al 1% y azida al 0,1% en PBST. El anticuerpo primario se incuba a la concentración indicada en la solución de bloqueo (ver anticuerpos utilizados en *Tabla 1*). Se deja actuar O/N a temperatura ambiente. Al día siguiente se recupera el anticuerpo primario y se lavan los portaobjetos 3 veces en PBST durante 5 minutos.

A continuación, en el caso de la **inmunohistoquímica**, se usa el anticuerpo secundario (específico contra la especie en la que se generó el anticuerpo primario y conjugado con una biotina para permitir su detección) a una concentración 1:200 en PBST durante una hora a temperatura ambiente. Tras varios lavados en PBST se añade el complejo Avidina-Biotina (ABC; Vector Laboratories; PK4000) a la concentración de 1:500 en PBST. Este complejo contiene avidina y la peroxidasa del rábano biotinilada. La avidina tiene una gran afinidad por la biotina y forma un complejo donde se unen la peroxidasa biotinilada dejando al menos un sitio de unión libre para la biotina del anticuerpo secundario (consultar los anticuerpos secundarios utilizados en la *Tabla 2*). Al añadirlo a los portaobjetos, la avidina se une al secundario biotinilado y ancla la peroxidasa al lugar de expresión de la proteína. Para el revelado (posterior a 3 lavados con PBST y 3 con PBS 1X) se usa, como sustrato cromóforo de la peroxidasa, 1 ml de DAB (3,3'-Diaminobenzidine tetrahydrochloride hydrate; Thermo Fisher; 112090000) con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0,6% por cada 100 ml de PBS 1X. La reacción se para con PBS 1X. Finalmente, se deshidratan los portaobjetos en una serie creciente de etanoles hasta llevarlos a 100% EtOH, desde



donde se pasan a xilol, para luego colocar el cubreobjetos con Eukitt Clasic Mounting Medium (Aname; 15322-10) y dejarlos secar varios días en una estufa a 37°C en horizontal.

En el caso de la **inmunofluorescencia**, se incuban las muestras con el anticuerpo secundario a una concentración 1:500 (conjugado a un fluoróforo que reconoce al primario), durante una hora a temperatura ambiente, en agitación y protegido de la luz. De esta forma, mediante la excitación del fluoróforo a una determinada longitud de onda, obtenemos una señal que nos permite localizar nuestra proteína de interés. Consultar los anticuerpos secundarios utilizados en la *Tabla 3*.

Tras la incubación del anticuerpo secundario se realizan tres lavados con PBS 1X de unos 10 minutos con el objetivo de eliminar el anticuerpo secundario que queda libre y se incuba la muestra diez minutos con DAPI (4'-6'-diamidino-2-fenilindol; Thermo Fisher; 11540206) a temperatura ambiente y en agitación con el objetivo de marcar los núcleos celulares. Por último, se recupera el DAPI y se realizan tres lavados con PBS 1X de unos 10 minutos para posteriormente colocar los cubreobjetos con Mowiol-NPG (475904; Sigma Aldrich). El Mowiol se prepara disolviendo 40g de Mowiol en 160ml de buffer K2HP04 se mezcla durante 16h y tras esto se añade 80 ml de glicerol al 99% tras lo que se vuelve a mezclar. Tras esto se prepara el NPG (protector de la fluorescencia), disolviendo 2,5g en 100 ml de glicerol 99%. Por último, se mezcla 1 parte de NPG por cada 10 de Mowiol y se almacena a 4°C.

### ***Cortes incluidos en Agarosa***

El protocolo es muy similar al anterior, a excepción de la ampliación de lavados durante el segundo día de inmunohistoquímica o inmunofluorescencia a 6 lavados y que el montaje de los cortes flotantes en los portaobjetos se realiza una vez finalizada la técnica de inmunodetección, con ayuda de una placa de petri llena de PBS 1x y un pincel. Posteriormente, se cubren con Glicerol Jelly a 42°C en el caso de la inmunohistoquímica y Mowiol a 4°C en el caso de la inmunofluorescencia. El Glycerol jelly lo preparamos de forma casera, mezclando gelatina al 5% [104072

de Merck] en una solución de glicerol al 50% en agua, se calienta a 50°C, para su completa disolución y se ajusta el pH a 7 con NaOH.

<i>Anticuerpo:</i>	<i>Referencia/ Casa comercial:</i>	<i>Concentración:</i>
$\alpha$ BrdU (mouse)	M 0744 Dako	1:200
$\alpha$ Br3a (mouse)	SC-8429 Santa Cruz	1:10
$\alpha$ Calb (rabbit)	CB-38 Swant	1:1000
$\alpha$ CHAT (rabbit)	PA1-4738 Invitrogen	1:500
$\alpha$ CNTN2 (goat)	AF4439 RD Systems	1:500
$\alpha$ DCC (goat)	#sc-6535 Santa Cruz	1:100
$\alpha$ NeuN (mouse)	MAB377 Chemicon	1:500
$\alpha$ NFEM (rabbit)	AB1987 Chemico	1:1000
$\alpha$ NFEM (mouse)	AB7794 Abcam	1:1000
$\alpha$ Ntn1 (rat)	MAB1109 RD Systems	1:500
$\alpha$ ROBO3 (goat)	AF3076 RD Systems	1:300
$\alpha$ Sox2 (rabbit)	ab97959 Abcam	1:500
$\alpha$ TH (rabbit)	Nº 268020234 Institute Jacques Boy Cat	1:1000

**Tabla 1.** Lista de anticuerpos primarios usados en las técnicas de inmunodetección.

<b>Anticuerpo:</b>	<b>Referencia/ Casa comercial:</b>	<b>Concentración:</b>
αGoat IgG (rabbit)	BA-5000	1:200
	Vector	
αMouse IgG (goat)	BA-9200	1:200
	Vector	
αRabbit IgG (goat)	BA-1000	1:200
	Vector	

**Tabla 2. Lista de anticuerpos secundarios usados en inmunohistoquímica.**

<b>Anticuerpo:</b>	<b>Referencia/ Casa comercial:</b>	<b>Concentración:</b>
αGoat IgG (Bovine) Alexa Fluor 647	805-605-180 Jackson Inmuno Research	1:500
αGoat IgG (Donkey) Alexa Fluor 488	A 11055 Molecular Probes	1:500
αMouse IgG (Donkey) Rhodamine red (570-590)	715-295-150 Jackson Inmuno Research	1:500
αRabbit IgG (Donkey) Alexa Fluor 488	A 21206 Molecular Probes	1:500
αRabbit IgG (Donkey) Alexa Fluor 594	A 21207 Molecular Probes	1:500
αRabbit IgG (Donkey) Alexa Fluor 647	711-605-152 Jackson Inmuno Research	1:500
αRat IgG (Goat) Alexa Fluor 488	A11006 Molecular Probes	1:500

**Tabla 3. Lista de anticuerpos secundarios usados en inmunofluorescencia.**

## Hibridación in situ (IHS)

### *Síntesis de la sonda de ARN*

Inicialmente se parte del plásmido circular dónde se encuentra insertada la secuencia del gen que queremos localizar en la IHS. Se realiza la digestión con las enzimas de restricción adecuadas sobre 10 µg de ADNc a una temperatura de 37°C durante 2 horas. Tras esto se comprueba el producto de la digestión en un gel de agarosa por electroforesis a 120mV durante 15 minutos. Posteriormente se mide la concentración, ya que para realizar la síntesis de sonda se necesita 1 µg de ADN lineal. La reacción de síntesis se produce tras la mezcla de 2µl de NTPs10X (5.65 µl de H<sub>2</sub>O, 2 µl de ATP 100mM/L, 2 µl de CTP 40mM, 2 µl de GTP 40mM, 1,35 µl de UTP 40mM y 7 µl de UTP-Digosigenina; ROCHE), 2 µl de inhibidor de la RNAsa, 2 µl de buffer de transcripción y 2 µl de la polimerasa correspondiente. Todo en un volumen total de 20 µl e incubado a 37 °C durante 2h. Se añade 1ul de DNAsa y se incuba 15 minutos a 37°C para eliminar el DNA que no ha sido transcrito a ARN y que puede producir marcaje inespecífico. Inmediatamente se añade inhibidor de la RNAsa para proteger la sonda y que no se degrade. Por último, se mide la concentración de sonda y se comprueba en un gel de agarosa por electroforesis.

### *Sondas de ARN utilizadas:*

- *Amigo2*: #BC095990 GENBANK
- *FGF8*: #22090 ADDGENE
- *Ntn1*: La sonda de ARN utilizada fue proporcionada amablemente por la Dra. O. Reiner; con un inserto de 2.7kb de la región 3' no traducida de *Ntn1*.

### *Cortes en parafina*

Las secciones se desparafinan y rehidratan tal y cómo se ha explicado previamente. Se realizan lavados con PBS 1x antes de realizar una incubación con Proteinasa k (03115801001; Roche) a 4ug/ml a 37°C, posteriormente, el tejido se fija durante

20 minutos a temperatura ambiente en PFA al 4%. A continuación, se lava 3 veces en PBS 1x y se prehibrida con buffer de hibridación compuesto por Salt 10x (ClNa, Tris-ClH, Tris-Base, NaHPO<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, EDTA 0,5 M) usado al 1x, Formamida desionizada (VWR-Amresco 0606-950ml 50%), Dextran Sulfato 50% (AMRE0198-250gr; VWR-Amresco), tRNA 10mg/ml, solución Denhardt's (Biotech; D-0062; 1x), añadiendo agua milliQ (W4502-1L, Sigma Aldrich) hasta el volumen de preparación. Se incuba dos horas a temperatura ambiente, dentro de una cámara húmeda con una solución de 50% de formamida ionizada y SSC 1x (Stock 20X: ClNa 175g, Sodium Citrate 88,2g para 1 litro de agua y ajustado a pH 7 con NaOH). La sonda de ARN marcada con digoxigenina (DIG-11-UTP, Roche Diagnostics 11209256910) se desnaturaliza a 80°C durante 10 minutos. Tras esto, el tejido se incuba en buffer de hibridación con la sonda O/N a 65°C. A continuación, las muestras se lavan con SSC 1x (formamida al 50%, SSC 1x pH 7 y Tween al 0,1%; Tween-20; P7949) 3 veces a 65°C durante 30 minutos. Se continúa con 2 lavados de MABT 1x (NaCl 150 mM, ácido maleico 100 mM, Sigma -Aldrich), NaOH (Sigma-Aldrich) para pH 7,5 y Tween 20 0,1%) a temperatura ambiente de 20 minutos. Posteriormente, el tejido se bloquea en suero de oveja al 10%, (Sigma-Aldrich; #S3772) y al 20% de solución bloqueante (Roche; #11096176001) en MABT 1x durante 2 horas y se incuba O/N con un anticuerpo anti-digoxigenina acoplado a fosfatasa alcalina (Roche Diagnostics; #11093274910). Al día siguiente, las muestras se lavan (4 x 30 min) con MABT 1x para eliminar las trazas de anticuerpos unidos no específicos. Pevio a la reacción colorimétrica, las muestras se incuban en dos tiempos de 30 minutos en NTMT (NaCl 0,1 M; Tris-HCl 0,2 M, pH 9,5; MgCl<sub>2</sub> 0,05 M y Tween 20 al 0,1%). Se utiliza NBT (Cloruro de nitroblue tetrazolium; 100mg/ml) / BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate; 50mg/ml; Boehringer, Mannheim) como sustrato cromogénico para detectar las sondas. La fosfatasa alcalina reacciona con este sustrato produciendo un precipitado sólido. Para terminar, después de varios lavados en PBST se deshidratan los portaobjetos en una serie creciente de etanoles hasta llevarlos a 100% EtOH, desde donde se pasan a xilol, para luego colocar el cubreobjetos con pegamento Eukitt y se deja secar varios días en una estufa a 37°C.

### ***Cortes en agarosa/ cerebros enteros “whole mount”***

El protocolo de hibridación In Situ en cortes de agarosa o whole mount es muy similar al anterior, salvo por algunas diferencias:

- Se realiza un pretratamiento que consiste en la deshidratación mediante lavados de 30-60 minutos en EtOH a concentración crecientes (25%, 50%, 75%, 100%), y posterior exposición a una solución 2% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en EtOH 100% durante 1 hora. Tras esto se rehidrata la muestra de forma inversa, y se inicia el protocolo.
- Previo a la postfijación, se realizan lavados (3x20 min) en una mezcla de detergentes (IGEPAL 1% (NP-40), SDS 1%, Sodium deoxycholate 0.5%, Tris 50mM pH8, EDTA 1mM y NaCl 150mM) con el fin de permeabilizar el tejido.
- El buffer de hibridación formado por: 50% formamida desionizada, 5x SSC pH5.3.
- En el caso del buffer de lavado el pH de SSC1x es de 5.3.
- El montaje de los cortes flotantes se realiza una vez finalizada la técnica, con ayuda de una placa llena de PBS1X y un pincel, para posteriormente cubrirlos con Glicerol Jelly.

### **Tinción con violeta de cresilo (Tinción de Nissl)**

Se trata de un proceso de tinción en el que se emplea violeta de cresilo (Acros, 10045203), un tinte que tiñe los ácidos nucleicos de cualquier célula. Los portaobjetos se sumergen en una cubeta con este tinte durante 5 minutos. Después se realizan dos inmersiones en agua destilada para regular la tonalidad de la tinción en el tejido. Tras estas inmersiones, se realizan lavados en etanoles a concentración creciente: dos lavados rápidos, de pocos segundos, en EtOH al 70%, un lavado rápido en EtOH 96%, un lavado en EtOH a esta misma concentración de

5 minutos y, por último, dos lavados con EtOH 100% de 5 minutos. Seguidamente, se realizan dos inmersiones de 10 minutos cada una en xilol. Finalmente, se cubren los portaobjetos fijándolos con el pegamento Eukitt.

### **Obtencion de Imágenes 3D (protocolo iDisco)**

#### ***Blanqueamiento, técnica de inmunofluorescencia y clarificación de cerebros.***

En el caso de las imágenes tridimensionales correspondientes a las *Figuras 2 y 5* y vídeos del *Anexo 1A*, estas han sido obtenidas adaptando el protocolo descrito por Belle et al, 2017.

Los cerebros son blanqueados tras una deshidratación usando cambios de 90 minutos en agitación a temperatura ambiente de concentraciones crecientes de metanoles: 20%, 40%, 60%, 80% y 100%. Tras esto, son incubadas en metanol 100% al 0,5% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> O/N a 4°C en oscuridad. El día siguiente, las muestras son rehidratadas mediante cambios en sentido inverso al día anterior.

Posteriormente, las muestras son bloqueadas 24 horas en agitación a temperatura ambiente con PBSGT, compuesto por PBS 1X, 0,2% gelatina (Prolabo; 2435.262), 0,5% Tritón y 0,01% thimerosal (Sigma; T8784).

Tras esto, las muestras se incuban con el anticuerpo primario (ver *Tabla 4*) diluido en PBSGT durante 10 días a 37°C en agitación.

Las muestras son lavadas a lo largo del día siguiente (6 cambios de media hora) en PBSGT a temperatura ambiente en agitación, tras lo cual, se incuban O/N en el anticuerpo secundario fluorescente (ver *Tabla 5*) a 37 °C en agitación (a partir de este punto los tubos se mantienen permanentemente en oscuridad) para finalmente lavar con PBSGT (6 cambios de 30 minutos) a temperatura ambiente en agitación y almacenar a 4°C en PBS 1X hasta el proceso de clarificación.

Para el siguiente proceso, las muestras son deshidratadas de nuevo en concentraciones crecientes de metanoles: 20%, 40%, 60%, 80% y 100% (cambios de 90 minutos en agitación a temperatura ambiente). Posteriormente, los lípidos



son eliminados con diclorometano (DCM; Sigma-Aldrich; #270997). Primero se realiza un cambio a una mezcla de 2/3 de DCM, y 1/3 de metanol 100% O/N a temperatura ambiente y tras esto dos cambios de DCM de 20 minutos, para finalizar con ultimo cambio de 30 minutos de dibenziléter (DBE; #108014 Sigma-Aldrich) dónde puede mantenerse almacenado.

En el caso de las imágenes tridimensionales correspondientes a las *Figuras 2 y 6* y vídeos del *Anexo 1B*, el protocolo seguido es el iDISCO+ protocolo, la versión de diciembre de 2016 descrita en su página web (<https://idisco.info/>), que introduce algunos cambios:

- En el pretratamiento, una vez deshidratado y previo al blanqueamiento se realiza una incubación en 66% DCM / 33% metanol a 4°C, y el lavado posterior a la rehidratación se realiza en PTx.2 (PBS1X; 0,2% Tritón).
- El proceso de inmunodetección es diferente, en primer lugar, se incuban las muestras en Solución de permeabilización a 37°C en agitación durante dos días. Esta solución está compuesta por 400ml de PTx.2, 11.5g de glicina (Sigma; G7126-500G) y 100ml de DMSO (Fisher; D128-4).
- Tras esto se procede a bloquear otros dos días a 37°C con solución de bloqueo, que está compuesta, para 50ml de 42ml de PTx.2, 3ml de suero de burro (Jackson ImmunoResearch; 017-000-121) y 5ml de DMSO.
- Posteriormente, se incuba la muestra en el anticuerpo primario (*Tabla 4*) en PTwH al 5% de DMSO y el 3% de suero de burro durante 7 días. El PTwH está compuesto, para 1l, de 100ml de PBS 10X, 2 ml de Tween-20 y 1 ml de heparina a 10mg/ml (Sigma; H3393-50KU).
- Tras esto se lava en PTwH durante el día siguiente (6-7 cambios de 60 minutos) y se incuba el anticuerpo secundario (*Tabla 5*) conjugado al fluorocromo en PTwH al 3% de suero de burro durante 1 día, para lavarlo durante el siguiente día nuevamente con PTwH.

<b>Anticuerpo:</b>	<b>Referencia/ Casa comercial:</b>	<b>Concentración:</b>
$\alpha$ Ntn1 (rat)	R&D Systems MAB1109	1:500
$\alpha$ Robo3 (goat)	R&D Systems AF3076	1:300
$\alpha$ TH (rabbit)	Abcam AB152	1:1000

**Tabla 4. Lista de anticuerpos primarios usados en las técnicas de iDisco**

En ambos protocolos, en los cerebros en los que se usa el anticuerpo  $\alpha$ Ntn1 se ha sometido al cerebro a un pretratamiento antes de comenzar con el fin de sobreexponer los epítomos y optimizar su detección. Para ello, previo al inicio, se hierve durante 8 minutos en 80°C en un tampón citrato sódico a 0,01M pH6 en agua.

<b>Anticuerpo:</b>	<b>Referencia/ Casa comercial:</b>	<b>Concentración:</b>
$\alpha$ Goat IgG (Bovine) Alexa Fluor 647	805-605-180 Jackson Inmuno Research	1:500
$\alpha$ Rabbit IgG (Donkey) Alexa Fluor 594	A 21207 Molecular Probes	1:500
$\alpha$ Rat IgG (Donkey) Alexa Fluor 647	712-605-153 Jackson Inmuno Research	1:500

**Tabla 5. Lista de anticuerpos secundarios usados en las técnicas de iDisco**

## Trazadores axonales

Esta técnica consiste en la colocación de un cristal lipofílico fluorescente, que difunde por la membrana citoplasmática de las neuronas, lo que nos permite seguir la trayectoria de sus axones y estudiar su morfología.

Se selecciona la muestra (que no debe deshidratarse previamente para mantener intactas las membranas celulares) y se incluye en agarosa al 4%. Posteriormente se corta hasta exponer la zona donde se va a colocar el cristal, y se inserta el cristal con ayuda de un hilo de tungsteno afilado. Los cristales utilizados han sido DiI (1,1'-dioctadecil 3,3,3',3'-tetra-metilindicarbo-cianina perclorato; Pfizer; D282), que se excita a una longitud de onda de 594 nm (rojo) y DiD (1,1'-dioctadecil 3,3,3',3'-tetra-metilindodicarbo-cianina clorobenzeno sulfonato), que lo hace a una longitud de onda de 647nm (rojo lejano).

En este momento, se dejan las muestras un mínimo de 7 días (en el caso de los cerebros embrionarios) y 2-3 días (en el caso de los explantes) en la estufa a 37°C en PFA al 4% con el fin de que el cristal difunda lo suficiente. En el caso del DiD la velocidad de difusión es más lenta, por lo que, si se usan los dos cristales conjuntamente, se recomienda poner este varios días antes que el DiI. Una vez pasados estos días, cuando el cristal ha difundido, se cortan los cerebros en el vibratomo. Es importante recalcar que el proceso de inmunohistoquímica posterior ha de hacerse en ausencia de detergentes (Triton x100) para evitar la pérdida de lípidos en la membrana con la consecuente pérdida de señal de los cristales.

## Cultivos organotípicos de tejido neural (ONTCs)

El tubo neural se disecciona al estadio embrionario adecuado, E12.5/E13.5, posteriormente se eliminan las vesículas telencefálicas y la región hipotalámica y se abre a través de la línea media dorsal, dejando intacta el área de desarrollo del fr. Finalmente, los explantes son cultivados sobre una membrana policarbonada (MilliCell; PICMORG50, en el caso de los explantes del *Anexo 1A* de resultados y

Whatman Nuclepore 110414-PCTrack-Etched Membranes en el caso de los explantes del Anexo 2 de resultados) a modo de “libro abierto”, colocando la superficie ventricular hacia arriba. Los ONTCs son cultivados a 37°C en DMEM completo (SBF al 10%, 1% P/S, 1%L-Glutamina, 1% aminoácidos no esenciales; Termofisher; 21969035) con un 5% CO<sub>2</sub> hasta su posterior procesado.

### ***Trasplantes ectópicos de SNc en ONTCs***

Cómo donante, se utilizan secciones de vibratomo de 250 µm de grosor de cerebros de ratón GFP+ a E14.5. De estas, se extrae un trozo de tejido correspondiente a la SNc para el lado experimental, y un trozo de placa alar de p1 como control. Esta última región es seleccionada como control debido a que no ejerce un rol atractivo sobre los axones habenuares (Funato et al., 2000). Se inserta el tejido en la placa basal de p2 en los ONTCs y se cultivan durante 48 horas. Para los experimentos de bloqueo, se ha usado αDCC (AF5 clone) a 3µg/ml o IgG mouse como control, añadido al medio de cultivo.

### ***Sobreexpresión de Ntn1 en ONTCs***

Se transfectan por lipofección (Lipofectamine 2000 reagent; Invitrogen) células COS7 con *Ntn1* o un vector *GFP (PCX-GFP)* como control y se cultivan durante 48h. Los agregados de células COS7 transfectadas se preparan incluyendo las células en Matrigel (BD Biosciences; Franklin Lakes). Posteriormente, estos agregados se cortan a un tamaño apropiado y se insertan en p2.

### ***Electroporaciones en ONTCs***

Se electroporaron los plásmidos *Amigo2* (BC095990) y/o *PCX-GFP* a modo de control. Para ello, se diluyen a 1,5µg/ml y se añaden 0,5µl de Fast Green por cada volumen de 10µl. Posteriormente, se prepara agarosa al 1% en PBS 1X y se cortan pequeñas columnas y bloques cuadrados bajo campana. Para electroporar, el setup

consiste en dos electrodos orientados en un eje vertical. En el electrodo inferior se coloca un bloque de agarosa y sobre él la membrana con el explante. En el electrodo superior se coloca una columna de agarosa. Posteriormente, se inyecta el plásmido con la ayuda de un microinyector (Nanoliter 2010; World Precision Instruments), se coloca el electrodo superior con su columna sobre la zona a electroporar, y se aplican dos pulsos eléctricos de 80V y 5ms espaciados por 500ms usando un electroporador (Intracel; TSS20 Ovodyne Electroporator) bajo campana. Los ONTCS electroporados se cultivan 72 horas a 37°C, con 5% de CO<sub>2</sub> en medio de cultivo DMEM.

### ***Inmunofluorescencia en ONTCS***

Para los experimentos del *Anexo 1A*, tras el cultivo, los ONTCS son fijados en PFA al 4% durante 3 horas. Tras esto, se lavaron varias horas en PBS-T, para posteriormente bloquear durante dos horas en PBS-T, BSA al 0.1% y Lisina 1M al 10%. Tras esto, se incuban los anticuerpos primarios durante 2-3 días a 4°C en PSBT, BSA (0.1%) y azida sódica (0.01%). Los anticuerpos primarios que se han usado son:  $\alpha$ DCC (1:100; Santa Cruz #sc-6535),  $\alpha$ GFP (1:1000; Aves lab GFP-1020) and  $\alpha$ TH (1:1000; Institute Jacques Boy Cat. N<sup>o</sup>. 268020234). Tras la incubación, se lava O/N en PBST y se incuba con el anticuerpo secundario O/N a 37°C en PBST. Al día siguiente se incuba el DAPI diluido en PBS 1X al 0,001% durante 10 min a temperatura ambiente, y tras esto se lavan con PBS 1X. Por último, se montan en un portaobjetos y se cubren con Mowiol.

Para los experimentos del *Anexo 1B*, tras el cultivo, los ONTCS fueron fijados en PFA al 4% durante 3 horas. Tras ello se deshidratan en cambios de 90 minutos crecientes de metanol (20%, 40%, 60%, 80% y 100%) y se blanquean O/N a 4°C en una solución de peróxido de hidrógeno en metanol 100%. Al día siguiente, las muestras son bloqueadas en PBS-GT (PBS al 0,2% Gelatina, Prolabo y 0.5% Triton X-100 Sigma-Aldrich) O/N a temperatura ambiente y después incubadas en agitación at 37°C durante 7 días con los anticuerpos primarios: (1:500; AF4439/RD Systems),  $\alpha$ NFEM (1:1000; AB7794/Abcam) and  $\alpha$ GFP (1:500: GFP-1020/AVES). Esto es seguido por 6 lavados de 30 minutos con PBSGT 0.5% a

temperatura ambiente y la incubación del anticuerpo secundario O/N a 37°C. Al día siguiente se incubó el DAPI diluido en PBS 1X al 0,001% durante 10 min a temperatura ambiente, y tras esto se lavan con PBS 1X.

## **BrdU**

Los ensayos de incorporación de Bromodesoxiuridina (BrdU) se han utilizado durante mucho tiempo para detectar la síntesis de ADN in vivo e in vitro. El principio clave de este método es que el BrdU se incorpora como un análogo de timidina en el ADN nuclear y representa una etiqueta que se puede rastrear usando anticuerpos.

### ***Experimentos de mapa de destino***

Para la detección del destino final de las células en proliferación, se inyectó a las hembras preñadas BrdU por vía intraperitoneal (3mg /100g de peso corporal) cada 2 h, durante un período de 10 h (cinco inyecciones en total) comenzando la mañana del día señalado (E.10.5, E11.5, E12.5 y E13.5). Los embriones se extrajeron a E15.5.

### ***Experimentos de pulso corto***

Para la detección de la tasa de proliferación, se inyectó BrdU por vía intraperitoneal a las hembras preñadas (3mg /100g de peso corporal) la mañana del día de desarrollo de interés (E11.5, E12.5 y E13.5), y se extrajeron los embriones transcurridas dos horas de la inyección.

## **Adquisición y procesamiento de imagen**

### **Cortes y ONTCs**

En el caso de las imágenes en campo claro, han sido adquiridas con una cámara digital de alta resolución modelo Leica DFC550 asociada a microscopio

estereoscópico modelo Leica MZ16FA. Las imágenes fluorescentes han sido adquiridas con un microscopio confocal modelo Leica SPEII.

El tratamiento de las fotografías se ha realizado con el software de edición de imagen Adobe Photoshop CS6 y se han montado las figuras con el programa de maquetación Adobe Illustrator CS6.

## **Imágenes 3D**

Las imágenes se han obtenido con el ultramicroscopio (Ultramicroscope II; LaVision BioTec) con el software InspectorPro (LaVision BioTec). Las películas e imágenes 3D han sido generadas con el Software Imaris x64 (Bitplane AG: Versión 9.3.0). Las imágenes obtenidas fueron primero convertidas a archivos tipo Imaris usando el convertidor ImarisFileConverter.

La reconstrucción 3D de las muestras se ha obtenido usando la herramienta "Volume rendering" de Imaris. Las estructuras de interés (fr, mHB) han sido marcadas creando una máscara alrededor del marcaje de Robo3 una usando la herramienta "surface". Las imágenes estáticas se han obtenido con la herramienta "snapshot" y las películas con la herramienta "animation".

## **Cuantificación**

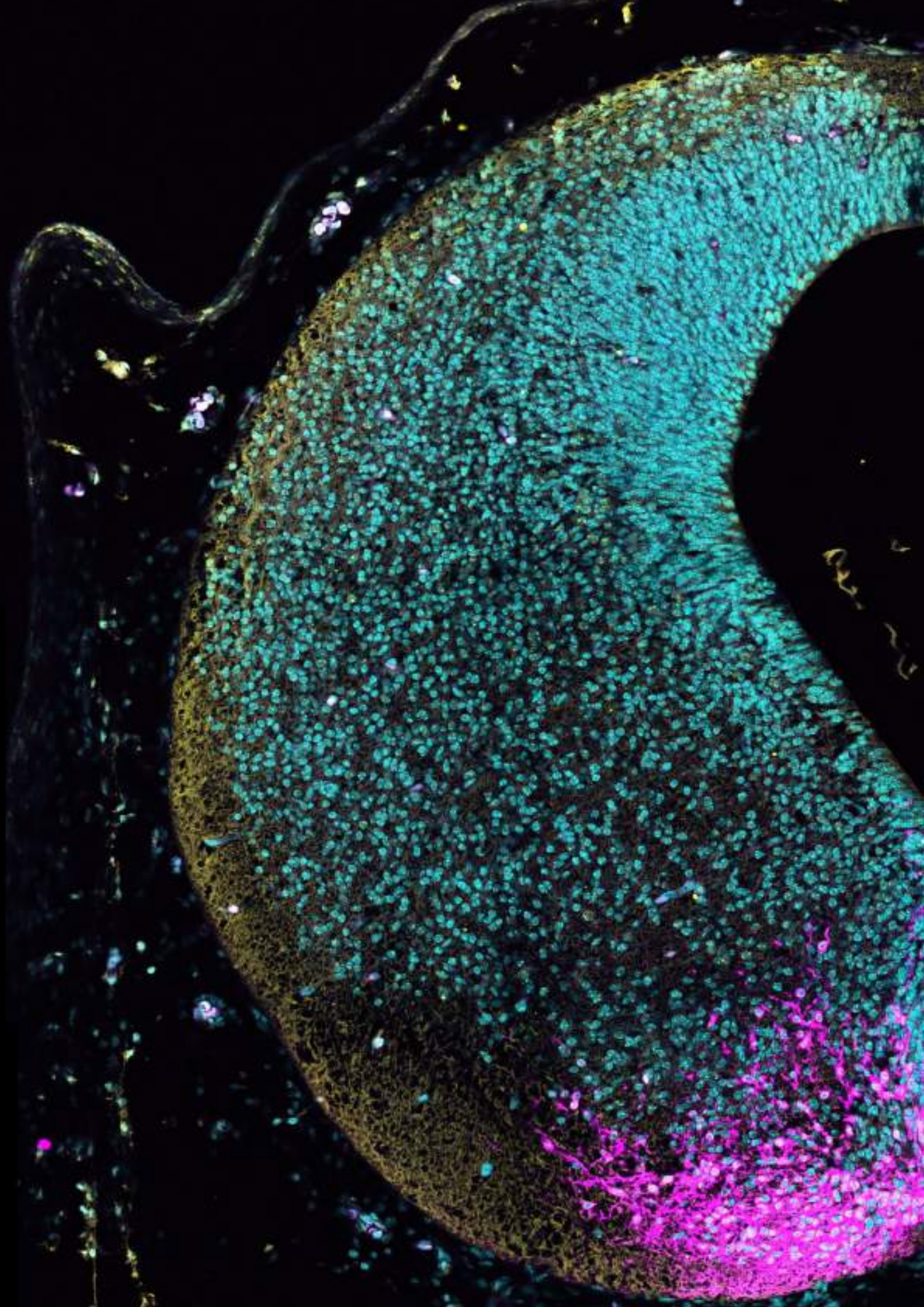
En todos los análisis estadísticos se ha considerado cómo significativo una probabilidad p-valor <0,05 y todos los tests y gráficas se han hecho con el software GraphPad Prism 8.

- *Figuras 3 y 6 del Anexo 1A:* Para la cuantificación del comportamiento de los axones, los cultivos se clasificaron como "trayectoria normal" cuando se reorientaron <6 axones hacia la fuente ectópica. Los casos en los que se reorientaron más de 6 axones se consideraron como una "trayectoria modificada". Para estos experimentos, el análisis estadístico se realizó con la prueba de chi-cuadrado.

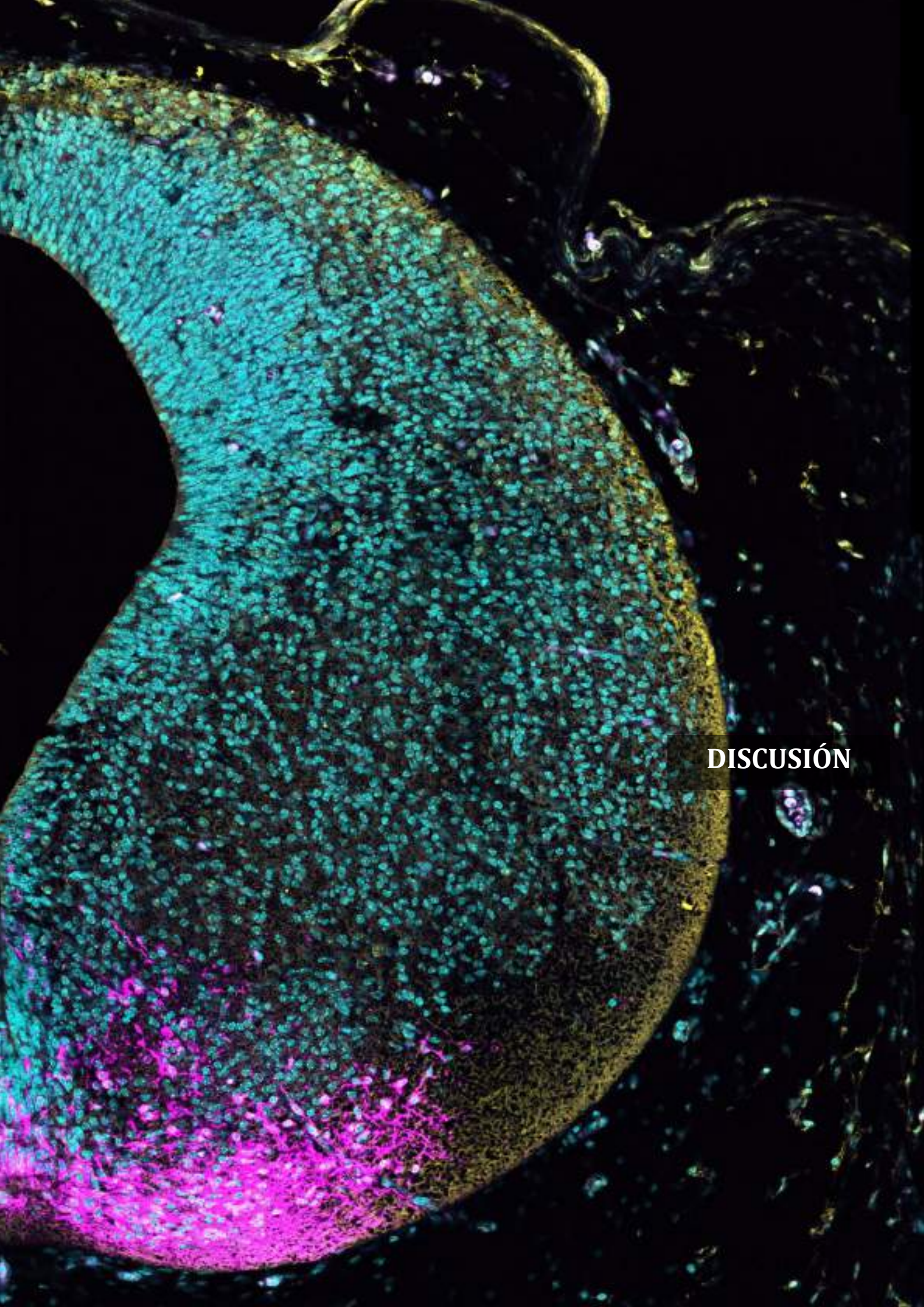


- *Figura 2 del Anexo 1B*: El volumen habenu lar de las mHB fue calculado con la herramienta “Volume rendering” del software Imaris. Para analizar las diferencias de tamaños se utilizó un t test no apareado.
- *Figura 4 del Anexo 1B*: La proliferación fue medida cuantificando con la herramienta “measure” del software Fiji el porcentaje ocupado por la fluorescencia roja en un área predeterminada tras binarizar la imagen. El test estadístico usado fue un t test no apareado.
- *Figura 4 del Anexo 2*: El comportamiento axonal en el mutante *Amigo2* y control se ha cuantificado estudiando la distribución de fluoróforos verdes y rojos en el área del fr mediante la herramienta “Plot Profile” del software Fiji. El análisis estadístico utilizado fue el Kolmogorov-Smirnov test.
- *Figuras 5 y 6 del Anexo 2*: El fenotipo en los ONTC mutantes, control y electroporados de *Amigo2* se cuantificó midiendo el diámetro del tracto en tres niveles fijos a lo largo del eje longitudinal del fascículo mediante el software Fiji. El análisis estadístico se realizó con t test no apareado (*Figura 5*) y ANOVA oneway (*Figura 6*).









**DISCUSIÓN**



## Discusión

La comprensión de los procesos del desarrollo necesarios para la correcta conectividad del sistema límbico nos permitirá la detección de posibles alteraciones en el cerebro humano. Algunos síntomas observados en las enfermedades mentales asociadas al complejo habenular podrían ser debidos a pequeñas perturbaciones en esta conectividad. El interés de nuestro trabajo, por lo tanto, ha sido profundizar en nuestro conocimiento sobre los mecanismos de diferenciación de la Hb y los mecanismos de guía axonal y fasciculación del fr.

La reinterpretación de la trayectoria del fr bajo el modelo prosomérico ha abierto la posibilidad de comprender adecuadamente el comportamiento de este tracto (Moreno-Bravo et al., 2016).

En primer lugar, planteamos identificar el origen, así como la señal involucrada en la flexión caudal del fr al llegar a las proximidades de la placa del suelo en p2. Considerando las poblaciones neuronales que rodean la trayectoria del tracto, seleccionamos la SNc como una candidata potencial. Nuestros enfoques, tanto in vitro como in vivo, nos han permitido demostrar el papel de la SNc y el VTA como fuente de la señal atractiva y el de NTN1, a través del receptor DCC, como la molécula responsable de la atracción de los axones mHb.

En segundo lugar, nos propusimos estudiar la actividad morfógena dorsalizante producida por la placa de techo sobre la especificación de la Hb. Dada su localización en la región más dorsal del prosómero talámico (Martinez-Ferre and Martinez, 2012) nos llevó hipotetizar que esta población neuronal podría estar bajo el control de *Wnt1*, uno de los morfógenos generados por la placa del techo (Navarro-Garberi et al., 2016; Brafman and Willert, 2017). Por tanto, nuestro objetivo en este trabajo fue analizar el papel de *Wnt1* en el desarrollo de la Hb y de su tracto eferente. Demostramos que su falta de función resultó en un incremento en la tasa de proliferación de los neuroblastos habenulares provocando un mayor tamaño habenular. La trayectoria del fr apareció alterada debido a la malformación de los territorios neuronales por los que discurre.



Por último, nos planteamos profundizar en nuestro conocimiento sobre la fasciculación del fr. Las proteínas de superficie responsables del comportamiento diferencial entre los axones de la mHb y la lHb no están identificadas. Por ello, seleccionamos, entre un grupo de estas moléculas de superficie específicas de la mHb, a AMIGO2 como candidato para desempeñar un papel en el comportamiento de fasciculación de sus axones (Schmidt et al., 2014). Nuestros resultados demostraron que AMIGO2 juega un papel en el proceso de fasciculación, pero no en sus mecanismos de guía, ya que el fascículo es capaz de alcanzar su objetivo final en su ausencia.

### **Rol de la SNc y VTA, mediado por *Ntn1*, en la guía de los axones habenulares mediales.**

Los axones pueden utilizar dianas intermedias para llegar a su destino (Bielle and Garel, 2011). En el caso del fr, hay un punto de decisión clave que es la llegada a la placa basal de p2 donde los axones giran caudalmente navegando longitudinalmente hasta sus destinos (Moreno-Bravo et al., 2016). Seleccionamos la SNc y el VTA como poblaciones candidatas para controlar este punto de decisión, debido a que el fr está relacionado con ambas estructuras (la SNc es un objetivo directo de los axones de lHb y los axones de mHb navegan longitudinalmente en contacto con la superficie pial debajo de estas poblaciones neuronales).

Una vez demostramos que en la ausencia de estas poblaciones el fr no es capaz de desarrollarse adecuadamente, así como que la aplicación de explantes ectópicos de SNc pueden redirigir el tracto y forzar la flexión rostral del mismo, decidimos comprobar el papel de NTN1, ligando del receptor DCC que es expresado específicamente en la mHb (Keino-Masu et al., 1996).

Las neuronas del SNc y el VTA expresan *Ntn1* en la capa del manto del diencefalo y el mesencefalo, por lo tanto, generan una fuente caudal de señal atrayente para los axones de la mHb. Además, la distribución de estas neuronas dopaminérgicas permite la generación de una concentración mayor en la zona caudal dado que son más abundantes en esa área. La suma de estos dos efectos es la responsable de la flexión caudal del tracto.

La NTN1 producida por la placa del suelo participa en acciones de quimiotaxis, atrayendo axones. Mientras tanto, la NTN1 producida por la capa ventricular está involucrada en los procesos de haptotaxis, dirigiendo los axones mediante interacciones de contacto cercano (Dominici et al., 2017; Varadarajan et al., 2017; Moreno-Bravo et al., 2019; Wu et al., 2019). El hecho de que SNC y VTA sean derivados de la placa del suelo (Joksimovic et al., 2009) postula la NTN1 que expresan como un efector quimiotáctico, como ha quedado demostrado tras los trasplantes ectópicos en ONTC. Los axones de la mHb se desviaron fuertemente por la presencia de la fuente ectópica, que remodeló la ubicación de la NTN1 existente y produjo la redirección observada. Para probar el rol directo de NTN1, colocamos células que expresan *Ntn1* en los ONTC. Estas células pudieron imitar el fenómeno observado y, por lo tanto, evidencian que NTN1 es necesaria y suficiente para dirigir los axones de la mHb a lo largo del eje longitudinal.

Una vez comprobada in vitro la interacción NTN1-DCC en los axones de la mHb, decidimos confirmar in vivo los resultados obtenidos. Analizamos cepas de ratones con pérdida de función *Ntn1* y *Dcc*. En primer lugar, resulta sorprendente el hecho de que encontramos algunos axones de la mHb navegando ventralmente desde la Hb hacia la placa basal p2, fenómeno también observado por Schmidt et al., 2014. Este comportamiento podría deberse a que el tálamo y la placa alar pretectal no permiten la entrada de los axones de Hb por las interacciones de *Nrp2*, *Sema3F* y *Sema5a* entre otros (Funato et al., 2000; Sahay et al., 2003; Kantor et al., 2004).

En el mutante *Ntn1*, una pequeña cantidad de axones se dirigen en direcciones anómalas, incluso paralelas a la placa del techo pretectal (como se observa en Belle et al., 2014). El tracto principal puede moverse ventralmente, pero gira caudalmente tan pronto como entran en la placa basal diencefálica lejos de la placa del suelo. En el mutante *Dcc*, el fenotipo es aún más fuerte, la gran mayoría de los axones fr permanecen estancados tan pronto como entran en la placa basal del tálamo. Solo unos pocos axones pueden girar caudalmente en una posición ectópica (Belle et al., 2014).

En resumen, el papel de SNC como diana intermedia es orquestar la ubicación precisa de NTN1. Esta distribución, en el momento temporoespacial correcto, genera la señal necesaria para la flexión caudal de los axones de la mHb que



expresan DCC. Se necesitarán experimentos futuros para descifrar los mecanismos involucrados en la llegada de estos axones al r1 y su característico entrecruzamiento de la placa del suelo a medida que inervan el núcleo Ip.

### **Papel *Wnt1* en el desarrollo del complejo habenular y el fr**

Los morfógenos son cruciales para el correcto desarrollo de las poblaciones neuronales al menos en dos aspectos. Por un lado, especifican las cascadas genéticas que dirigen los programas de diferenciación específicos de las poblaciones neuronales (Brafman and Willert, 2017). Por otro lado, regulan la tasa de proliferación de los neuroblastos que dará lugar a las distintas neuronas (Cayuso and Martí, 2005).

Nuestros resultados indican que *Wnt1* no está directamente relacionado con la especificación de las neuronas habenulares ya que pudimos identificar todos los diferentes subnúcleos que componen este complejo. Sin embargo, el aumento del volumen habenular en el mutante indicó que *Wnt1* está involucrado en el control del número de neuronas habenulares. El fenotipo observado puede deberse a dos fenómenos diferentes. Por un lado, la falta de función de *Wnt1* puede inducir un cambio en el programa de diferenciación del neuroblasto talámico y modificar su destino hacia neuronas habenulares (Martinez-Ferre and Martinez, 2009). Otra posibilidad es que esta ausencia pueda modificar la tasa de proliferación de los progenitores habenulares y dar lugar por incremento a un complejo habenular de mayor tamaño (Cayuso and Martí, 2005).

Sin embargo, el hecho de que las subpoblaciones de la mHb no cambiaran sus proporciones de tamaño entre ellas nos llevó a descartar esta primera hipótesis. El fuerte incremento en la proliferación de los neuroblastos habenulares que hemos mostrado apoya la segunda hipótesis. La disminución del territorio talámico también podría explicarse por una reducción en su proliferación más que por un cambio en su identidad. Por lo tanto, se necesita *Wnt1* para determinar la tasa de proliferación de los precursores habenulares. Cabe destacar que el efecto más fuerte se encontró en la mHb. El hecho de que el mayor aumento de proliferación en el mutante se encontró a E12.5, estadio en el que se diferencia la mHb, sustenta

este hecho (Funato et al., 2000; Belle et al., 2014). Los experimentos de ARNseq de "célula única" demuestran que las neuronas de la mHb expresan varios genes de la cascada de señalización de *Wnt1*, entre los que se encuentran los factores de transcripción *Lef / Tcf* mientras que solo *Tcf7l1*, un represor de los genes diana de *Wnt1* (Mao and Byers, 2011), se expresa tanto en mHb como en la lHb. Por tanto, no es sorprendente que la ausencia de *Wnt1* tenga un efecto más profundo en la mHb en comparación con la lHb (Hashikawa et al., 2020; Wallace et al., 2020).

Los defectos encontrados en la trayectoria del fr en el ratón *Wnt1*<sup>-/-</sup> muestran dos aspectos diferentes. Primero, detectamos un claro incremento en el tamaño del tracto y una ligera desorganización de las fibras dentro del fascículo. Evidentemente, el incremento de tamaño se debe al aumento del número de neuronas habenuares en el mutante. La falta de *Wnt1* no produjo cambios en la diferenciación de los subnúcleos habenuares, pero el incremento de tamaño y extensión superficial puede explicar la ligera desorganización que hemos observado en el fascículo mutante. En segundo lugar, encontramos una clara desviación en la trayectoria final del fr. Este fenotipo también puede deberse a alteraciones en las moléculas superficiales de los axones del fr que alteran su respuesta a las señales de navegación circundantes, o a alteraciones en la especificación de los territorios que los axones deben atravesar y por tanto de las señales de navegación (Company et al., 2021). El hecho de que se especifiquen todos los diferentes subnúcleos habenuares sugiere que los axones de la Hb contienen la combinación correcta de receptores. Sin embargo, se ha descrito que la falta de función de *Wnt1* produce severas alteraciones en la especificación del IsO (McMahon et al., 1992). Como hemos demostrado, el IsO mutante mostró una fuerte reducción de la expresión de *Fgf8*, su principal morfógeno. Estudios previos han mostrado que la reducción progresiva en la cantidad de FGF8 en el IsO resulta en un aumento en la severidad de los fenotipos observados (Garda et al., 2001; Chi et al., 2003; Basson et al., 2008). Por lo tanto, un mal funcionamiento de este organizador produce fuertes alteraciones de diferenciación en el mesencéfalo y el rombencéfalo rostral. El efecto sobre el territorio circundante no es simétrico, siendo el mesencéfalo más sensible que el rombencéfalo (Basson et al., 2008). De hecho, la SNc y el VTA están fuertemente reducidos en nuestro IsO no funcional, debido a la reducción de *Fgf8* y la pérdida de *Wnt1* (Prakash et al., 2006; Smidt and

Burbach, 2007; Santos and Smidt, 2011), mientras que el Ip generado en el rombómero 1 casi no se ve afectado (Basson et al., 2008). Recientemente, hemos comprobado que la SNc y el VTA están involucrados, a través de NTN1, en la correcta navegación de los axones del fr por este territorio (Company et al., 2021). La ausencia de una señal correcta de NTN1 podría ser responsable de la dirección incorrecta adoptada por una parte de los axones del fr. Algunos de ellas todavía pueden alcanzar el Ip probablemente debido al hecho de que no se pierden todas las neuronas dopaminérgicas (Wurst and Prakash, 2014). Por tanto, la falta de función de *Wnt1* altera la funcionalidad de IsO, lo que produce una fuerte reducción de las poblaciones neuronales de la SNc y el VTA. La falta de especificación de este objetivo intermedio de los axones del fr podría ser responsable de su trayectoria anómala en nuestro modelo mutante.

### **La molécula de adhesión *Amigo2* está involucrada en el proceso de fasciculación del fascículo retroflejo.**

El comportamiento axonal está regulado por moléculas de superficie que controlan la formación de tractos mediante procesos de fasciculación y por receptores de superficie que reciben señales de corta y larga distancia para guiar a los axones en crecimiento hacia sus objetivos finales (Chédotal and Richards, 2010; Kolodkin and Tessier-Lavigne, 2011; Spead and Poulain, 2020). El fr es un tracto muy compacto que se origina en el complejo habenular. Los axones del mHb están concentrados en una región central mientras que los axones del lHb se localizan en la periferia del tracto (Herkenham and Nauta, 1979; Ichijo and Toyama, 2015). Desde un punto de vista evolutivo, se ha propuesto que las Habénulas de lampreas y de los teleosteos son homólogas a la mHb de mamíferos y que la lHb habría aparecido más tarde en la evolución de los vertebrados (Concha and Wilson, 2001). Esta teoría estaría en concordancia con la organización en mamíferos de los axones mHb localizados en el núcleo del tracto y los axones de la lHb evolucionados tardíamente y localizados en la periferia. Todos los axones del fr muestran el mismo comportamiento inicial, pero difieren en el segmento final. Esto significa que, aunque comparten las mismas moléculas de guía inicial, posteriormente los axones de la lHb muestran un proceso de desfasciculación para seguir su propia

trayectoria. Se desconocen los procesos de fasciculación/desfasciculación implicados en el desarrollo de este tracto. Algunas de las moléculas de guía conocidas, como DCC, ROBO o EPHRINAS entre otras, promueven la fasciculación (Spead and Poulain, 2020). De entre el grupo de moléculas de superficie que muestra una expresión específica en la mHb, seleccionamos a AMIGO2 como candidato involucrado en la fasciculación del fr.

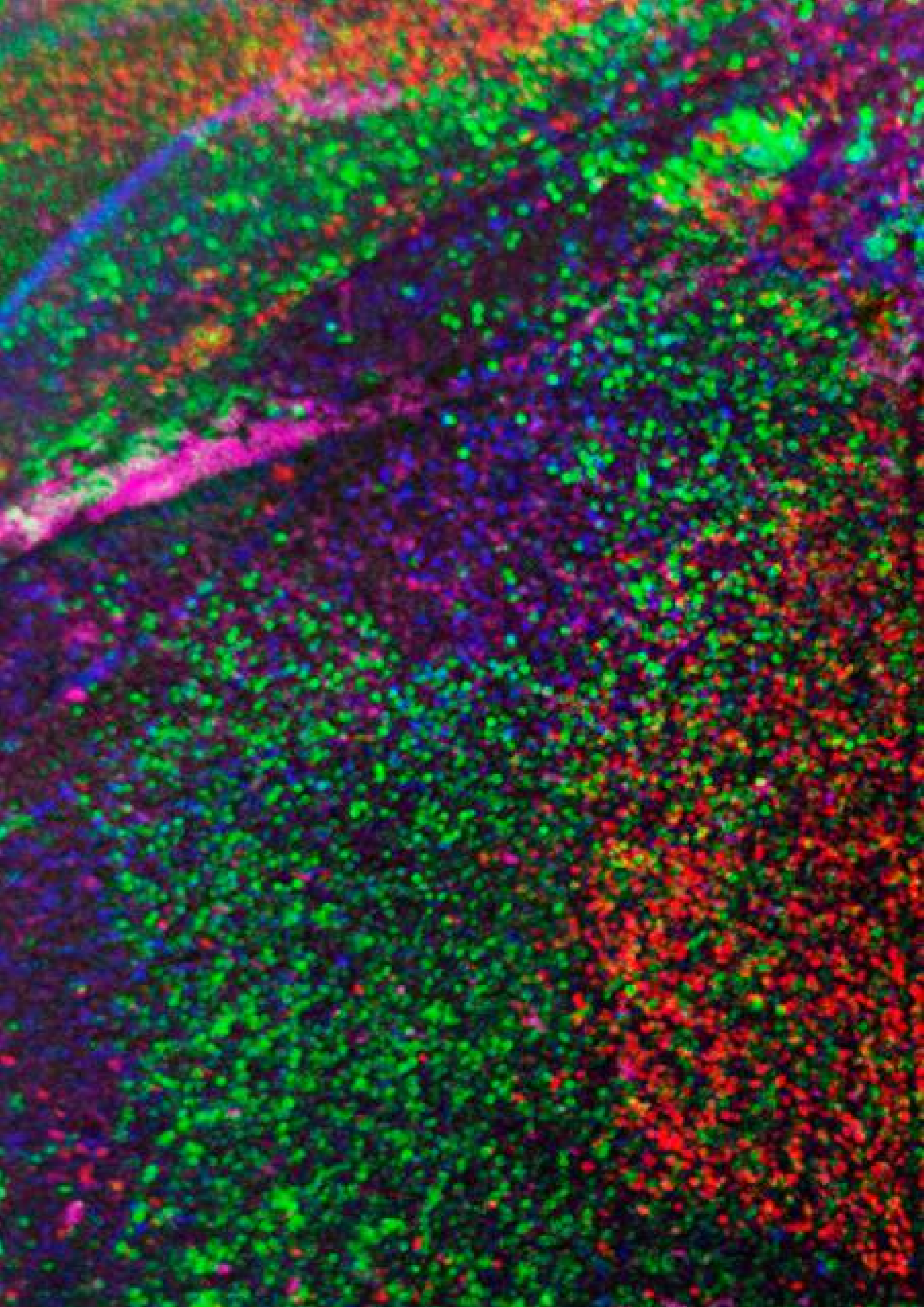
La falta de función de este gen da como resultado una desfasciculación variable del fr que tiende a ser ligeramente asimétrica. La Hb de los mamíferos, así como su fr, es una estructura simétrica en contraste con reptiles, anfibios y peces donde se han descrito fuertes asimetrías (Concha and Wilson, 2001; Bianco and Wilson, 2009). Sin embargo, también se han descrito diferencias sutiles en algunas cepas de roedores (Concha and Wilson, 2001). Por lo tanto, la alteración de *Amigo2* puede haber desvelado sutiles heterogeneidades entre ambos lados de la Hb.

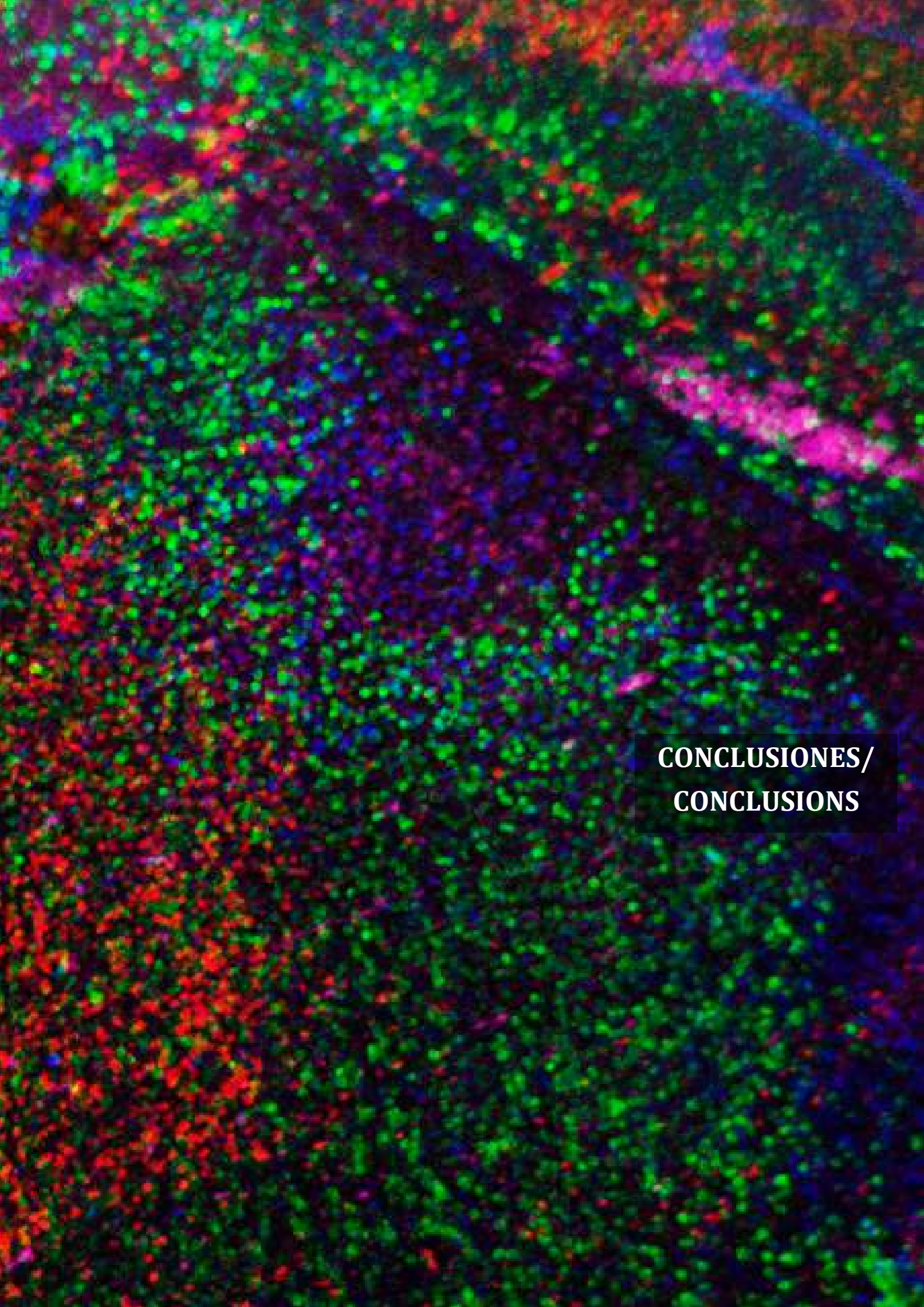
Es racional pensar que los axones contienen un cóctel específico de moléculas de superficie que podría tener funciones redundantes en el comportamiento de las fibras neuronales. Además, la capacidad de los diferentes miembros de la familia de genes *Amigo* para interactuar de manera heterofílica junto con los roles redundantes entre las moléculas de adhesión podrían explicar la variabilidad en el fenotipo que hemos observado cuando eliminamos solo una de estas proteínas de superficie. Pequeñas alteraciones en la combinación de estas moléculas darían como resultado un fenotipo severo mientras que la alteración de un solo componente produciría un fenotipo leve. Cabe destacar que la desfasciculación de los axones de la mHb, produjo a su vez una alteración en el proceso de fasciculación de los axones de la lHb. Una vez que el núcleo del fr está desorganizado, la periferia no puede ensamblarse correctamente. Este resultado muestra la fuerte interacción molecular entre los receptores de membrana de los axones de la lHb y la mHb en el fr.

Finalmente, la electroporación de *Amigo2* incrementó la fasciculación del fr en los embriones silvestres. Mientras tanto, en el mutante conseguimos recuperar el fenotipo alterado, pero no alcanzamos el nivel de fasciculación del tipo silvestre electroporado. Así, *Amigo2* es determinante para definir el nivel de fasciculación del fr y nuestros resultados nos permitieron postular que *Amigo2* está involucrado

en la fasciculación de este tracto. Este proceso debe involucrar otras moléculas de superficie que en sincronía con *Amigo2* sean capaces de compactar este fascículo.







**CONCLUSIONES/  
CONCLUSIONS**





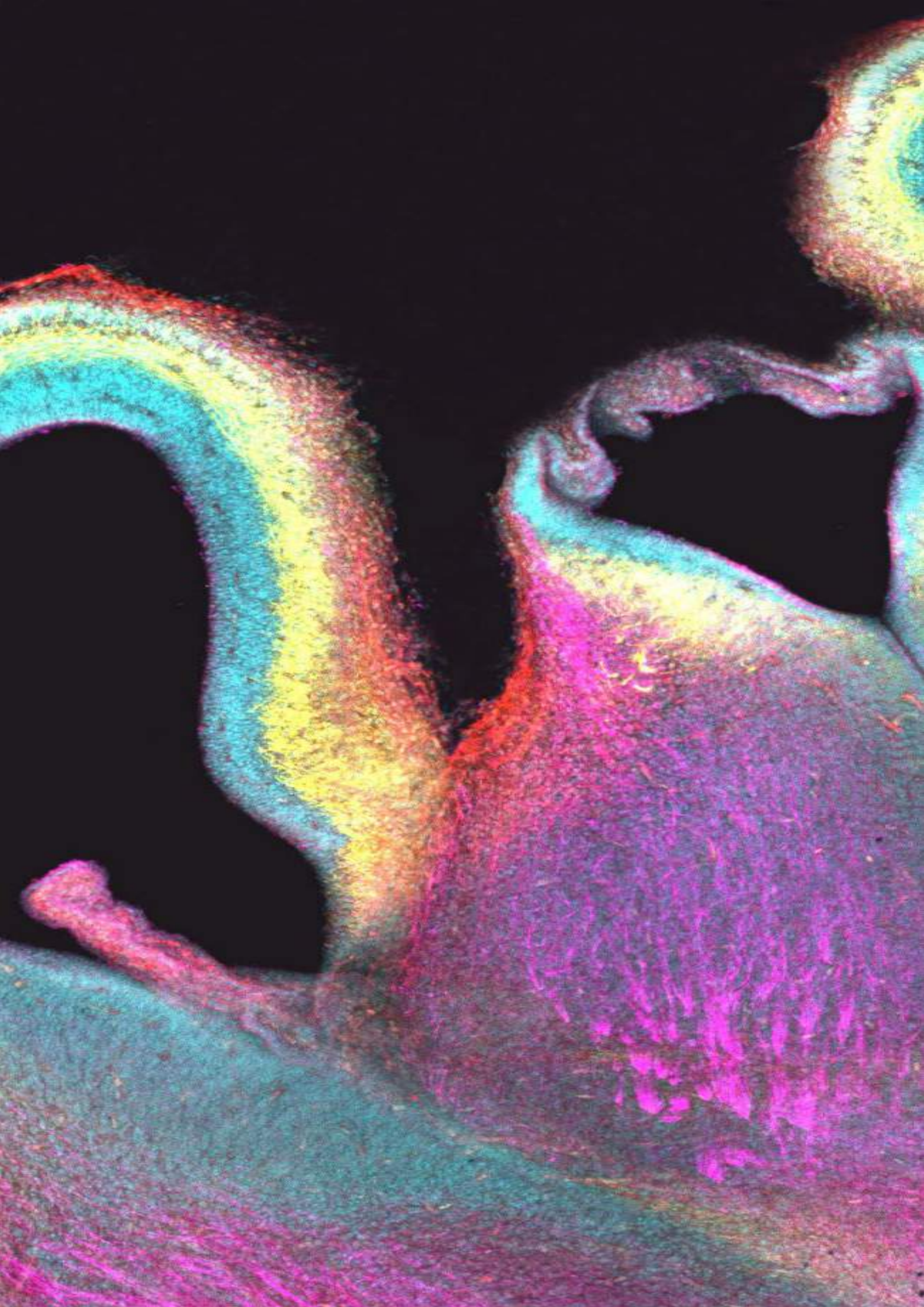
## Conclusiones

1. Las poblaciones neuronales de la SNc y el VTA actúan como diana intermedia de los axones de la mHb contenidos en el fr. Su papel es fundamental para la correcta llegada de dichos axones al núcleo Ip, su diana final.
2. El papel como diana intermedia de la SNc y el VTA se lleva a cabo a través de la proteína NTN1, localizada en ambas poblaciones, cuyo receptor DCC se localiza en los axones de la mHb.
3. En ausencia de *Wnt1*, se produce un aumento del tamaño habenular, siendo este más dramático en la mHb. *Wnt1* es responsable, por lo tanto, de la regulación de la proliferación de los neuroblastos habenulares.
4. En ausencia de *Wnt1*, se identifican todas las subpoblaciones habenulares. *Wnt1* no está directamente relacionado, por lo tanto, con la especificación de las neuronas habenulares.
5. El incremento en el volumen de la Hb, en la ausencia de *Wnt1*, resulta en un claro incremento en el tamaño del tracto y en una ligera desorganización de las fibras dentro del propio fascículo.
6. *Wnt1* es necesario para la correcta especificación de los territorios del mesencéfalo y del rombencéfalo que debe cruzar el fr. La anómala formación de los mismos, en la ausencia de *Wnt1*, provoca alteraciones en los mecanismos de guía de los axones habenulares.
7. En ausencia de *Wnt1*, el mecanismo de guía dependiente de la señal de Ntn1 del fr está afectado debido a la malformación de las poblaciones dopaminérgicas mes-diencefálicas.
8. La molécula de superficie AMIGO2 no actúa como molécula de guía axonal de los axones de la mHb.

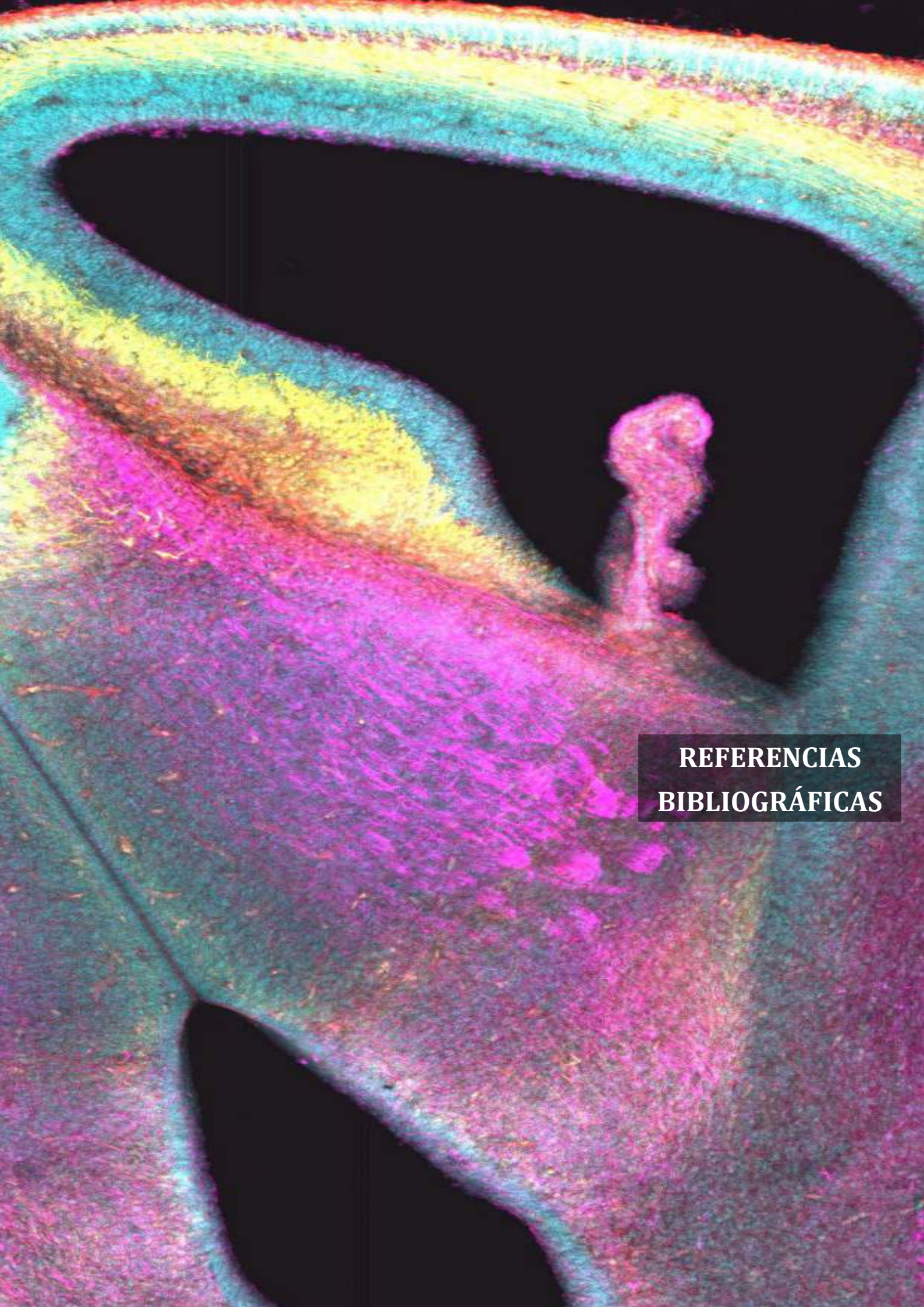
9. La molécula de superficie AMIGO2 es determinante para definir el nivel de fasciculación de fr.

## Conclusions

1. The neuronal populations of the SNc and the VTA act as intermediate targets of the mHb axons of the fr. Their role is necessary for the correct navigation of these axons to the Ip nucleus, their final target.
2. The role as intermediate target of the SNc and VTA is mediated by the NTN1 protein, located in both populations. Its DCC receptor is located in the axons of the mHb.
3. In the absence of *Wnt1*, the habenular size is increased, being the effect more dramatic in the mHb. Therefore, *Wnt1* is responsible for regulating the proliferation of habenular neuroblasts.
4. In the absence of *Wnt1*, all the habenular subpopulations are identified. Therefore, *Wnt1* is not directly related to the specification of habenular neurons.
5. The increase in the Hb volume, in the absence of *Wnt1*, results in a clear increase in the fr size and in a slight disorganization of its fibers.
6. *Wnt1* is necessary for the correct specification of the territories that the fr must cross (midbrain and rhombencephalon). Their abnormal formation, in the absence of *Wnt1*, causes alterations in the guidance mechanisms of the habenular axons.
7. In the absence of *Wnt1*, the guidance mechanism, *Ntn1* signal dependent, of the fr is affected due to the mes-diencephalic dopaminergic populations malformation.
8. The AMIGO2 surface molecule does not act as an axonal guide molecule for the mHb axons.
9. The AMIGO2 surface molecule is decisive to define the level of fr fasciculation.







**REFERENCIAS  
BIBLIOGRÁFICAS**



## Referencias bibliográficas

Abeliovich, A., and Hammond, R. (2007). Midbrain dopamine neuron differentiation: factors and fates. *Dev. Biol.* 304, 447–454. doi: 10.1016/j.ydbio.2007.01.032

Agetsuma, M., Aizawa, H., Aoki, T., Nakayama, R., Takahoko, M., Goto, M., et al. (2010). The habenula is crucial for experience-dependent modification of fear responses in zebrafish. *Nat. Neurosci.* 13, 1354–1356. doi:10.1038/nn.2654.

Aizawa, H., Amo, R., and Okamoto, H. (2011). Phylogeny and ontogeny of the habenular structure. *Front. Neurosci.* 5. doi:10.3389/fnins.2011.00138.

Amo, R., Fredes, F., Kinoshita, M., Aoki, R., Aizawa, H., Agetsuma, M., et al. (2014). The habenulo-raphé serotonergic circuit encodes an aversive expectation value essential for adaptive active avoidance of danger. *Neuron* 84, 1034–1048. doi:10.1016/j.neuron.2014.10.035.

Andres, K. H., von Düring, M., and Veh, R. W. (1999). Subnuclear organization of the rat habenular complexes. *J. Comp. Neurol.* 407, 130–150. doi: 10.1002/(sici)1096-9861(19990428)407:1<130::aid-cne10>3.0.co;2-8

Araki, M., McGeer, P. L., and Kimura, H. (1988). The efferent projections of the rat lateral habenular nucleus revealed by the PHA-L anterograde tracing method. *Brain Res.* 441, 319–330. doi: 10.1016/0006-8993(88)91410-2

Artymyshyn, R., and Murray, M. (1985). Substance P in the interpeduncular nucleus of the rat: normal distribution and the effects of deafferentation. *J. Comp. Neurol.* 231, 78–90. doi:10.1002/CNE.902310107.

Basson, M. A., Echevarria, D., Ahn, C. P., Sudarov, A., Joyner, A. L., Mason, I. J., et al. (2008). Specific regions within the embryonic midbrain and cerebellum require different levels of FGF signaling during development. *Development* 135, 889–898. doi:10.1242/dev.011569.

Barth, K. A., Kishimoto, Y., Rohr, K. B., Seydler, C., Schulte-Merker, S., and Wilson, S. W. (1999). Bmp activity establishes a gradient of positional information throughout the entire neural plate. *Development* 126, 4977–4987.

Batalla, A., Homberg, J. R., Lipina, T. V., Sescousse, G., Luijten, M., Ivanova, S. A., et al. (2017). The role of the habenula in the transition from reward to misery in substance use and mood disorders. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 80, 276–285. doi:10.1016/j.neubiorev.2017.03.019.



Belle, M., Godefroy, D., Dominici, C., Heitz-Marchaland, C., Zelina, P., Hellal, F., et al. (2014). A Simple Method for 3D Analysis of Immunolabeled Axonal Tracts in a Transparent Nervous System. *Cell Rep.* 9, 1191–1201. doi:10.1016/j.celrep.2014.10.037.

Belle, M., Godefroy, D., Couly, G., Malone, S. A., Collier, F., Giacobini, P., et al. (2017). Tridimensional visualization and analysis of early human development. *Cell* 169, 161–173.e12. doi: 10.1016/j.cell.2017.03.008

Benarroch, E. E. (2015). Habenula. *Neurology* 85, 992–1000. doi:10.1212/WNL.0000000000001937.

Bennett, K. L., Bradshaw, J., Youngman, T., Rodgers, J., Greenfield, B., Aruffo, A., et al. (1997). Deleted in colorectal carcinoma (DCC) binds heparin via its fifth fibronectin type III domain. *J. Biol. Chem.* 272, 26940–26946. doi: 10.1074/jbc.272.43.26940

Bengoa-Vergniory, N., and Kypta, R. M. (2015). Canonical and noncanonical Wnt signaling in neural stem/progenitor cells. *Cell. Mol. Life Sci.* 72, 4157–4172. doi:10.1007/s00018-015-2028-6.

Beretta, C. A., Dross, N., Bankhead, P., and Carl, M. (2013). The ventral habenulae of zebrafish develop in prosomere 2 dependent on Tcf712 function. *Neural Dev.* 8, 19. doi:10.1186/1749-8104-8-19.

Bianco, I. H., and Wilson, S. W. (2009). The habenular nuclei: A conserved asymmetric relay station in the vertebrate brain. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 364, 1005–1020. doi:10.1098/rstb.2008.0213.

Bielle, F., and Garel, S. (2011). L'occasion fait la connexion La migration cellulaire dans l'évolution du néocortex. *Medecine/Sciences* 27, 802–804. doi:10.1051/medsci/20112710003.

Brafman, D., and Willert, K. (2017). Wnt/ $\beta$ -catenin signaling during early vertebrate neural development. *Dev. Neurobiol.* 77, 1239–1259. doi:10.1002/dneu.22517.

Braisted, J. E., Catalano, S. M., Stimac, R., Kennedy, T. E., Tessier-Lavigne, M., Shatz, C. J., et al. (2000). Netrin-1 promotes thalamic axon growth and is required for proper development of the thalamocortical projection. *J. Neurosci.* 20, 5792–5801. doi:10.1523/jneurosci.20-15-05792.2000.

Brignani, S., Raj, D., Schmidt, E., Düdükçü, Ö, Adolfs, Y., De Ruiter, A. A., et al. (2020). Remotely produced and axon-derived netrin-1 instructs GABAergic neuron migration and dopaminergic substantia nigra development. *Neuron* 107, 684–

702.e9. doi: 10.1016/j.neuron.2020.05.037

Brinschwitz, K., Dittgen, A., Madai, V. I., Lommel, R., Geisler, S., and Veh, R. W. (2010). Glutamatergic axons from the lateral habenula mainly terminate on GABAergic neurons of the ventral midbrain. *Neuroscience* 168, 463–476. doi: 10.1016/j.neuroscience.2010.03.050

Broms, J., Antolin-Fontes, B., Tingström, A., and Ibañez-Tallon, I. (2015). Conserved expression of the GPR151 receptor in habenular axonal projections of vertebrates. *J. Comp. Neurol.* 523, 359–380. doi:10.1002/CNE.23664.

Bühler, A., and Carl, M. (2021). Zebrafish tools for deciphering habenular network-linked mental disorders. *Biomolecules* 11, 1–18. doi:10.3390/biom11020324.

Cayuso, J., and Martí, E. (2005). Morphogens in motion: Growth control of the neural tube. *J. Neurobiol.* 64, 376–387. doi:10.1002/NEU.20169.

Charron, F., and Tessier-Lavigne, M. (2005). Novel brain wiring functions for classical morphogens: A role as graded positional cues in axon guidance. *Development* 132, 2251–2262. doi:10.1242/dev.01830.

Chédotal, A., and Richards, L. J. (2010). Wiring the brain: The biology of neuronal guidance. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2. doi:10.1101/cshperspect.a001917.

Cherng, B. W., Islam, T., Torigoe, M., Tsuboi, T., and Okamoto, H. (2020). The Dorsal Lateral Habenula-Interpeduncular Nucleus Pathway Is Essential for Left-Right-Dependent Decision Making in Zebrafish. *Cell Rep.* 32. doi:10.1016/j.celrep.2020.108143.

Chi, C. L., Martinez, S., Wurst, W., and Martin, G. R. (2003). The isthmic organizer signal FGF8 is required for cell survival in the prospective midbrain and cerebellum. *Development* 130, 2633–2644. doi:10.1242/dev.00487.

Chilton, J. K. (2006). Molecular mechanisms of axon guidance. *Dev. Biol.* 292, 13–24. doi:10.1016/j.ydbio.2005.12.048.

Ciani, L., and Salinas, P. C. (2005). WNTs in the vertebrate nervous system: From patterning to neuronal connectivity. *Nat. Rev. Neurosci.* 6, 351–362. doi:10.1038/nrn1665.

Company, V., Andreu-Cervera, A., Madrigal, M. P., Andrés, B., Almagro-García, F., Chédotal, A., et al. (2021). Netrin 1-Mediated Role of the Substantia Nigra Pars Compacta and Ventral Tegmental Area in the Guidance of the Medial Habenular Axons. *Front. Cell Dev. Biol.* 9, 1183. doi:10.3389/fcell.2021.682067.

Concha, M. L., and Wilson, S. W. (2001). Asymmetry in the epithalamus of

vertebrates. *J. Anat.* 199, 63–84. doi:10.1046/j.1469-7580.2001.19910063.x.

Contestabile, A., and Flumerfelt, B. A. (1981). Afferent connections of the interpeduncular nucleus and the topographic organization of the habenulo-interpeduncular pathway: an HRP study in the rat. *J. Comp. Neurol.* 196, 253–270. doi: 10.1002/cne.901960206

Contestabile, A., and Fonnum, F. (1983). Cholinergic and GABAergic forebrain projections to the habenula and nucleus interpeduncularis: surgical and kainic acid lesions. *Brain Res.* 275, 287–297. doi:10.1016/0006-8993(83)90989-7.

de Ramon Francàs, G., Zuñiga, N. R., and Stoeckli, E. T. (2017). The spinal cord shows the way - How axons navigate intermediate targets. *Dev. Biol.* 432, 43–52. doi: 10.1016/j.ydbio.2016.12.002

Dickson, B. (2002). Molecular mechanisms of axon guidance. *Science* 298, 1959–1964. doi:10.1126/SCIENCE.1072165.

Dominici, C., Moreno-Bravo, J. A., Puiggros, S. R., Rappeneau, Q., Rama, N., Vieugue, P., et al. (2017). Floor-plate-derived netrin-1 is dispensable for commissural axon guidance. *Nature* 545, 350–354. doi:10.1038/nature22331.

Duman, R. S., Sanacora, G., and Krystal, J. H. (2019). Altered Connectivity in Depression: GABA and Glutamate Neurotransmitter Deficits and Reversal by Novel Treatments. *Neuron* 102, 75–90. doi:10.1016/j.neuron.2019.03.013.

Echevarría, D., Vieira, C., Gimeno, L., and Martínez, S. (2003). Neuroepithelial secondary organizers and cell fate specification in the developing brain. *Brain Res. Rev.* 43, 179–191. doi:10.1016/j.brainresrev.2003.08.002.

Fakhoury, M., Rompré, P. P., and Boye, S. M. (2016). Role of the dorsal diencephalic conduction system in the brain reward circuitry. *Behav. Brain Res.* 296, 431–441. doi: 10.1016/j.bbr.2015.10.038

Fakhoury, M. (2017). The habenula in psychiatric disorders: More than three decades of translational investigation. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 83, 721–735. doi:10.1016/j.neubiorev.2017.02.010.

Fakhoury, M. (2018). The dorsal diencephalic conduction system in reward processing: Spotlight on the anatomy and functions of the habenular complex. *Behav. Brain Res.* 348, 115–126. doi:10.1016/j.bbr.2018.04.018.

Fazeli, A., Dickinson, S. L., Hermiston, M. L., Tighe, R. V., Steen, R. G., Small, C. G., et al. (1997). Phenotype of mice lacking functional Deleted in colorectal cancer (Dcc) gene. *Nature* 386, 796–804. doi:10.1038/386796a0.

- Fontanals-Cirera, B., Hasson, D., Vardabasso, C., Di Micco, R., Agrawal, P., Chowdhury, A., et al. (2017). Harnessing BET Inhibitor Sensitivity Reveals AMIGO2 as a Melanoma Survival Gene. *Mol. Cell* 68, 731-744.e9. doi:10.1016/j.molcel.2017.11.004.
- Funato, H., Saito-Nakazato, Y., and Takahashi, H. (2000). Axonal growth from the habenular nucleus along the neuromere boundary region of the diencephalon is regulated semaphorin 3F and netrin-1. *Mol. Cell. Neurosci.* 16, 206–220. doi:10.1006/mcne.2000.0870.
- Garda, A. L., Echevarría, D., and Martínez, S. (2001). Neuroepithelial co-expression of Gbx2 and Otx2 precedes Fgf8 expression in the isthmic organizer. *Mech. Dev.* 101, 111–118. doi:10.1016/S0925-4773(00)00567-0.
- Garel, S., and López-Bendito, G. (2014). Inputs from the thalamocortical system on axon pathfinding mechanisms. *Curr. Opin. Neurobiol.* 27, 143–150. doi:10.1016/J.CONB.2014.03.013.
- Gifuni, A. J., Jozaghi, S., Gauthier-Lamer, A. C., and Boye, S. M. (2012). Lesions of the lateral habenula dissociate the reward-enhancing and locomotor-stimulant effects of amphetamine. *Neuropharmacology* 63, 945–957. doi:10.1016/j.neuropharm.2012.07.032.
- Giger, R. J., Cloutier, J. F., Sahay, A., Prinjha, R. K., Levengood, D. V., Moore, S. E., et al. (2000). Neuropilin-2 is required in vivo for selective axon guidance responses to secreted semaphorins. *Neuron* 25, 29–41. doi:10.1016/S0896-6273(00)80869-7.
- Gimelli, S., Makrythanasis, P., Stouder, C., Antonarakis, S. E., Bottani, A., and Béna, F. (2011). A de novo 12q13.11 microdeletion in a patient with severe mental retardation, cleft palate, and high myopia. *Eur. J. Med. Genet.* 54, 94–96. doi:10.1016/j.ejmg.2010.09.008.
- Guglielmi, L., Bühler, A., Moro, E., Argenton, F., Poggi, L., and Carl, M. (2020). Temporal control of Wnt signaling is required for habenular neuron diversity and brain asymmetry. *Dev.* 147. doi:10.1242/dev.182865.
- Guida, V., Calzari, L., Fadda, M. T., Picci-Sparascio, F., Digilio, M. C., Bernardini, L., et al. (2021). Genome-Wide DNA Methylation Analysis of a Cohort of 41 Patients Affected by Oculo-Auriculo-Vertebral Spectrum (OAVS). *Int. J. Mol. Sci.* 22, 1–19. doi:10.3390/ijms22031190.
- Hammerschmidt, M., Bitgood, M., and McMahon, A. (1996). Protein kinase A is a common negative regulator of Hedgehog signaling in the vertebrate embryo. *Genes Dev.* 10, 647–658. doi:10.1101/GAD.10.6.647.

Hashikawa, Y., Hashikawa, K., Rossi, M., Basiri, M., Liu, Y., Johnston, N., et al. (2020). Transcriptional and Spatial Resolution of Cell Types in the Mammalian Habenula. *Neuron* 106, 743-758.e5. doi:10.1016/J.NEURON.2020.03.011.

Herkenham, M., and Nauta, W. J. H. (1979). Efferent connections of the habenular nuclei in the rat. *J. Comp. Neurol.* 187, 19–47. doi:10.1002/cne.901870103.

Hikosaka, O. (2010). The habenula: From stress evasion to value-based decision-making. *Nat. Rev. Neurosci.* 11, 503–513. doi:10.1038/nrn2866.

Hikosaka, O., Sesack, S. R., Lecourtier, L., and Shepard, P. D. (2008). Habenula: Crossroad between the basal ganglia and the limbic system. in *Journal of Neuroscience* (J Neurosci), 11825–11829. doi:10.1523/JNEUROSCI.3463-08.2008.

Hollis, E., and Zou, Y. (2012). Expression of the Wnt signaling system in central nervous system axon guidance and regeneration. *Front. Mol. Neurosci.* 5. doi:10.3389/FNMOL.2012.00005.

Hong, S., and Hikosaka, O. (2008). The Globus Pallidus Sends Reward-Related Signals to the Lateral Habenula. *Neuron* 60, 720–729. doi:10.1016/j.neuron.2008.09.035.

Hu, H., Cui, Y., and Yang, Y. (2020). Circuits and functions of the lateral habenula in health and in disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 21, 277–295. doi:10.1038/s41583-020-0292-4.

Huo, T., Canepa, R., Sura, A., Modave, F., and Gong, Y. (2017). Colorectal cancer stages transcriptome analysis. *PLoS One* 12, 1–11. doi:10.1371/journal.pone.0188697.

Hüsken, U., and Carl, M. (2013). The Wnt/beta-catenin signaling pathway establishes neuroanatomical asymmetries and their laterality. *Mech. Dev.* 130, 330–335. doi:10.1016/J.MOD.2012.09.002.

Ichijo, H., and Toyama, T. (2015). Axons from the medial habenular nucleus are topographically sorted in the fasciculus retroflexus. *Anat. Sci. Int.* 90, 229–234. doi:10.1007/s12565-014-0252-z.

Jasmin, M., Ahn, E. H., Voutilainen, M. H., Fombonne, J., Guix, C., Viljakainen, T., et al. (2020). Netrin-1 and its receptor DCC modulate survival and death of dopamine neurons and Parkinson's disease features. *EMBO J.* 40:e105537. doi:10.15252/embj.2020105537

Jesuthasan, S. (2012). Fear, anxiety, and control in the zebrafish. *Dev. Neurobiol.* 72, 395–403. doi:10.1002/dneu.20873.

- Jhou, T. C., Geisler, S., Marinelli, M., Degarmo, B. A., and Zahm, D. S. (2009). The mesopontine rostromedial tegmental nucleus: A structure targeted by the lateral habenula that projects to the ventral tegmental area of Tsai and substantia nigra compacta. *J. Comp. Neurol.* 513, 566–596. doi:10.1002/cne.21891.
- Joksimovic, M., Anderegg, A., Roy, A., Campochiaro, L., Yun, B., Kittappa, R., et al. (2009). Spatiotemporally separable Shh domains in the midbrain define distinct dopaminergic progenitor pools. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 19185–19190. doi:10.1073/pnas.0904285106.
- Kanda, Y., Osaki, M., Onuma, K., Sonoda, A., Kobayashi, M., Hamada, J., et al. (2017). Amigo2-upregulation in tumour cells facilitates their attachment to liver endothelial cells resulting in liver metastases. *Sci. Rep.* 7, 1–13. doi:10.1038/srep43567.
- Kantor, D. B., Chivatakarn, O., Peer, K. L., Oster, S. F., Inatani, M., Hansen, M. J., et al. (2004). Semaphorin 5A is a bifunctional axon guidance cue regulated by heparan and chondroitin sulfate proteoglycans. *Neuron* 44, 961–975. doi:10.1016/j.neuron.2004.12.002.
- Kazanskaya, O., Glinka, A., and Niehrs, C. (2000). The role of *Xenopus dickkopf1* in prechordal plate specification and neural patterning. *Development* 127, 4981–4992. doi:10.1242/DEV.127.22.4981.
- Keino-Masu, K., Masu, M., Hinck, L., Leonardo, E. D., Chan, S. S. Y., Culotti, J. G., et al. (1996). Deleted in Colorectal Cancer (DCC) encodes a netrin receptor. *Cell* 87, 175–185. doi:10.1016/S0092-8674(00)81336-7.
- Kim, S. W., and Kim, K.-T. (2020). Expression of Genes Involved in Axon Guidance: How Much Have We Learned? *Int. J. Mol. Sci.* 21. doi:10.3390/IJMS21103566.
- Klemm, W. R. (2004). Habenular and interpeduncularis nuclei: Shared components in multiple-function networks. *Med. Sci. Monit.* 10, 261–274.
- Kolodkin, A., and Tessier-Lavigne, M. (2011). Mechanisms and molecules of neuronal wiring: a primer. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 3, 1–14. doi:10.1101/CSHPERSPECT.A001727.
- Koppensteiner, P., Galvin, C., and Ninan, I. (2016). Development- and experience-dependent plasticity in the dorsomedial habenula. *Mol. Cell. Neurosci.* 77, 105–112. doi:10.1016/j.mcn.2016.10.006.
- Kuan, Y. S., Roberson, S., Akitake, C. M., Fortunato, L., Gamse, J., Moens, C., et al. (2015). Distinct requirements for Wntless in habenular development. *Dev. Biol.* 406, 117–128. doi:10.1016/J.YDBIO.2015.06.006.

Kuja-Panula, J., Kiiltomäki, M., Yamashiro, T., Rouhiainen, A., and Rauvala, H. (2003). AMIGO, a transmembrane protein implicated in axon tract development, defines a novel protein family with leucine-rich repeats. *J. Cell Biol.* 160, 963–973. doi:10.1083/jcb.200209074.

Laeremans, A., Nys, J., Luyten, W., D’Hooge, R., Paulussen, M., and Arckens, L. (2013). AMIGO2 mRNA expression in hippocampal CA2 and CA3a. *Brain Struct. Funct.* 218, 123–130. doi:10.1007/s00429-012-0387-4.

Lecourtier, L., and Kelly, P. H. (2005). Bilateral lesions of the habenula induce attentional disturbances in rats. *Neuropsychopharmacology* 30, 484–496. doi:10.1038/sj.npp.1300595.

Lecourtier, L., and Kelly, P. H. (2007). A conductor hidden in the orchestra? Role of the habenular complex in monoamine transmission and cognition. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 31, 658–672. doi:10.1016/j.neubiorev.2007.01.004.

Lee, A., Mathuru, A. S., Teh, C., Kibat, C., Korzh, V., Penney, T. B., et al. (2010). The habenula prevents helpless behavior in larval zebrafish. *Curr. Biol.* 20, 2211–2216. doi:10.1016/j.cub.2010.11.025.

Lewis, A., Vasudevan, H., O’Neill, A., Soriano, P., and Bush, J. (2013). The widely used Wnt1-Cre transgene causes developmental phenotypes by ectopic activation of Wnt signaling. *Dev. Biol.* 379, 229–234. doi:10.1016/J.YDBIO.2013.04.026.

Li, B., Piriz, J., Mirrione, M., Chung, C., Proulx, C., Schulz, D., et al. (2011). Synaptic potentiation onto habenula neurons in the learned helplessness model of depression. *Nature* 470, 535–541. doi:10.1038/NATURE09742.

Li, J., Duarte, T., Kocabas, A., Works, M., McConnell, S. K., and Hynes, M. A. (2014). Evidence for topographic guidance of dopaminergic axons by differential Netrin-1 expression in the striatum. *Mol. Cell. Neurosci.* 61, 85–96. doi:10.1016/j.mcn.2014.05.003

Li, J., Fan, R., Liu, X., Shen, X., Liu, X., and Zhao, H. (2021). The convergence of aversion and reward signals in individual neurons of the mice lateral habenula. *Exp. Neurol.* 339, 113637. doi:10.1016/j.expneurol.2021.113637.

Li, Z., Khan, M. M., Kuja-Panula, J., Wang, H., Chen, Y., Guo, D., et al. (2017). AMIGO2 modulates T cell functions and its deficiency in mice ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain. Behav. Immun.* 62, 110–123. doi:10.1016/j.bbi.2017.01.009.

Liem, K., Tremml, G., and Roelink, H. (1995). Dorsal differentiation of neural plate cells induced by BMP-mediated signals from epidermal ectoderm. *Cell*

82, 969–979. doi:10.1016/0092-8674(95)90276-7.

Lim, Y., and Golden, J. A. (2007). Patterning the developing diencephalon. *Brain Res. Rev.* 53, 17–26. doi:10.1016/j.brainresrev.2006.06.004.

Liu, G., Li, W., Wang, L., Kar, A., Guan, K. L., Rao, Y., et al. (2009). DSCAM functions as a netrin receptor in commissural axon pathfinding. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 2951–2956. doi:10.1073/PNAS.0811083106.

Liu, Y., Yang, J., Shi, Z., Tan, X., Jin, N., O'Brien, C., et al. (2021). In vivo selection of highly metastatic human ovarian cancer sublines reveals role for AMIGO2 in intra-peritoneal metastatic regulation. *Cancer Lett.* 503, 163–173. doi:10.1016/j.canlet.2021.01.024.

Livesey, F. J., and Hunt, S. P. (1997). Netrin and netrin receptor expression in the embryonic mammalian nervous system suggests roles in retinal, striatal, nigral, and cerebellar development. *Mol. Cell. Neurosci.* 8, 417–429. doi:10.1006/mcne.1997.0598

Loonen, A. J. M., and Ivanova, S. A. (2016). Circuits regulating pleasure and happiness: The evolution of the amygdalar-hippocampal-habenular connectivity in vertebrates. *Front. Neurosci.* 10. doi:10.3389/fnins.2016.00539.

Ly, A., Nikolaev, A., Suresh, G., Zheng, Y., Tessier-Lavigne, M., and Stein, E. (2008). DSCAM Is a Netrin Receptor that Collaborates with DCC in Mediating Turning Responses to Netrin-1. *Cell* 133, 1241–1254. doi:10.1016/j.cell.2008.05.030.

Lyuksyutova, A., Lu, C., Milanesio, N., King, L., Guo, N., Wang, Y., et al. (2003). Anterior-posterior guidance of commissural axons by Wnt-frizzled signaling. *Science* 302, 1984–1988. doi:10.1126/SCIENCE.1089610.

Mao, C. D., and Byers, S. W. (2011). Cell-context dependent TCF/LEF expression and function: Alternative tales of repression, de-repression and activation potentials. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* 21, 207–236. doi:10.1615/CritRevEukarGeneExpr.v21.i3.10.

Martinez-Ferre, A., and Martinez, S. (2009). The development of the thalamic motor learning area is regulated by Fgf8 expression. *J. Neurosci.* 29, 13389–13400. doi:10.1523/JNEUROSCI.2625-09.2009.

Martinez-Ferre, A., and Martinez, S. (2012). Molecular regionalization of the diencephalon. *Front. Neurosci.* 6. doi:10.3389/fnins.2012.00073.

Masai, I., Heisenberg, C. P., Barth, K. A., Macdonald, R., Adamek, S., and Wilson, S. W. (1997). Floating head and masterblind regulate neuronal patterning in the roof of the forebrain. *Neuron* 18, 43–57. doi:10.1016/S0896-6273(01)80045-3.



Mathuru, A. S. (2018). A little rein on addiction. *Semin. Cell Dev. Biol.* 78, 120–129. doi:10.1016/J.SEMCDB.2017.09.030.

Mathuru, A. S., and Jesuthasan, S. (2013). The medial habenula as a regulator of anxiety in adult zebrafish. *Front. Neural Circuits* 7, 99. doi:10.3389/fncir.2013.00099.

Matsumoto, M., and Hikosaka, O. (2007). Lateral habenula as a source of negative reward signals in dopamine neurons. *Nature* 447, 1111–1115. doi:10.1038/nature05860.

Matsumoto, M., and Hikosaka, O. (2009). Representation of negative motivational value in the primate lateral habenula. *Nat. Neurosci.* 12, 77–84. doi:10.1038/nn.2233.

McMahon, A. P., Joyner, A. L., Bradley, A., and McMahon, J. A. (1992). The midbrain-hindbrain phenotype of Wnt-1- Wnt-1- mice results from stepwise deletion of engrailed-expressing cells by 9.5 days postcoitum. *Cell* 69, 581–595. doi:10.1016/0092-8674(92)90222-X.

Meijers, R., Smock, R., Zhang, Y., and Wang, J. (2020). Netrin Synergizes Signaling and Adhesion through DCC. *Trends Biochem. Sci.* 45, 6–12. doi:10.1016/J.TIBS.2019.10.005.

Miyake, N., Tonoki, H., Gallego, M., Harada, N., Shimokawa, O., Yoshiura, K. I., et al. (2004). Phenotype-genotype correlation in two patients with 12q proximal deletion. *J. Hum. Genet.* 49, 282–284. doi:10.1007/s10038-004-0144-5.

Mo, R., Freer, A. M., Zinyk, D. L., Crackower, M. A., Michaud, J., Heng, H. H. Q., et al. (1997). Specific and redundant functions of Gli2 and Gli3 zinc finger genes in skeletal patterning and development. *Development* 124, 113–123. doi:10.1242/dev.124.1.113.

Moffat, J., Ka, M., EM, J., and Kim, W. (2015). Genes and brain malformations associated with abnormal neuron positioning. *Mol. Brain* 8. doi:10.1186/S13041-015-0164-4.

Moreno-Bravo, J. A., Martinez-Lopez, J. E., Madrigal, M. P., Kim, M., Mastick, G. S., Lopez-Bendito, G., et al. (2016). Developmental guidance of the retroflex tract at its bending point involves Robo1-Slit2-mediated floor plate repulsion. *Brain Struct. Funct.* 221, 665–678. doi:10.1007/s00429-014-0932-4.

Moreno-Bravo, J. A., Perez-Balaguer, A., Martinez-Lopez, J. E., Aroca, P., Puellas, L., Martínez, S., et al. (2014). Role of Shh in the development of molecularly characterized tegmental nuclei in mouse rhombomere 1. *Brain Struct. Funct.* 219,

777–792. doi: 10.1007/s00429-013-0534-6

Moreno-Bravo, J. A., Roig Puiggros, S., Mehlen, P., and Chédotal, A. (2019). Synergistic Activity of Floor-Plate- and Ventricular-Zone-Derived Netrin-1 in Spinal Cord Commissural Axon Guidance. *Neuron* 101, 625–634.e3. doi:10.1016/j.neuron.2018.12.024.

Morissette, M. C., and Boye, S. M. (2008). Electrolytic lesions of the habenula attenuate brain stimulation reward. *Behav. Brain Res.* 187, 17–26. doi: 10.1016/j.bbr.2007.08.021

Murcia-Ramón, R., Company, V., Juárez-Leal, I., Andreu-Cervera, A., Almagro-García, F., Martínez, S., et al. (2020). Neuronal tangential migration from Nkx2.1-positive hypothalamus. *Brain Struct. Funct.* 225, 2857–2869. doi:10.1007/s00429-020-02163-x.

Nakajima, M., Mori, H., Nishikawa, C., Tsuruta, M., Okuyama, S., and Furukawa, Y. (2013). Psychiatric disorder-related abnormal behavior and habenulointerpeduncular pathway defects in Wnt1-cre and Wnt1-GAL4 double transgenic mice. *J. Neurochem.* 124, 241–249. doi:10.1111/jnc.12085.

Nakajo, H., Tsuboi, T., and Okamoto, H. (2020). The behavioral paradigm to induce repeated social defeats in zebrafish. *Neurosci. Res.* 161, 24–32. doi:10.1016/j.neures.2019.11.004.

Nakamura, S., Kanda, M., Shimizu, D., Tanaka, C., Inokawa, Y., Hattori, N., et al. (2020). AMIGO2 Expression as a Potential Prognostic Biomarker for Gastric Cancer. *Anticancer Res.* 40, 6713–6721. doi:10.21873/anticancer.14694.

Navarro-Garberi, M., Bueno, C., and Martinez, S. (2016). Wnt1 signal determines the patterning of the diencephalic dorso-ventral axis. *Brain Struct. Funct.* 221, 3693–3708. doi:10.1007/s00429-015-1126-4.

Nieuwenhuys, R., Voogd, J., and van Huijzen, C. (2008a). “Greater Limbic System,” in *The Human Central Nervous System* (Springer Verlag), 917–946. doi:10.1007/978-3-540-34686-9\_23.

Nieuwenhuys, R., Voogd, J., and Van Huijzen, C. (2008b). “Desarrollo,” in *El sistema Nervioso Central*. (Editorial Médica Panamericana), 7–53.

Nikolenko, V. N., Oganessian, M. V., Rizaeva, N. A., Kudryashova, V. A., Nikitina, A. T., Pavliv, M. P., et al. (2020). Amygdala: Neuroanatomical and morphophysiological features in terms of neurological and neurodegenerative diseases. *Brain Sci.* 10, 1–18. doi:10.3390/brainsci10080502.

Okamoto, H., Agetsuma, M., and Aizawa, H. (2012). Genetic dissection of the

zebrafish habenula, a possible switching board for selection of behavioral strategy to cope with fear and anxiety. *Dev. Neurobiol.* 72, 386–394. doi:10.1002/dneu.20913

Okamoto, H., Cherng, B. W., Nakajo, H., Chou, M. Y., and Kinoshita, M. (2021). Habenula as the experience-dependent controlling switchboard of behavior and attention in social conflict and learning. *Curr. Opin. Neurobiol.* 68, 36–43. doi:10.1016/j.conb.2020.12.005.

Okumura, M., Kato, T., Miura, M., and Chihara, T. (2016). Hierarchical axon targeting of *Drosophila* olfactory receptor neurons specified by the proneural transcription factors *Atonal* and *Amos*. *Genes Cells* 21, 53–64. doi:10.1111/GTC.12321.

Ono, T., Sekino-Suzuki, N., Kikkawa, Y., Yonekawa, H., and Kawashima, S. (2003). *Alivin 1*, a novel neuronal activity-dependent gene, inhibits apoptosis and promotes survival of cerebellar granule neurons. *J. Neurosci.* 23, 5887–5896. doi:10.1523/jneurosci.23-13-05887.2003.

Ota, C., Baarsma, H. A., Wagner, D. E., Hilgendorff, A., and Königshoff, M. (2016). Linking bronchopulmonary dysplasia to adult chronic lung diseases: role of WNT signaling. *Mol. Cell. Pediatr.* 3. doi:10.1186/s40348-016-0062-6.

Otsu, Y., Lecca, S., Pietrajtis, K., Rousseau, C. V., Marcaggi, P., Dugué, G. P., et al. (2018). Functional Principles of Posterior Septal Inputs to the Medial Habenula. *Cell Rep.* 22, 693–705. doi:10.1016/j.celrep.2017.12.064.

Pandey, S., Shekhar, K., Regev, A., and Schier, A. (2018). Comprehensive Identification and Spatial Mapping of Habenular Neuronal Types Using Single-Cell RNA-Seq. *Curr. Biol.* 28, 1052–1065.e7. doi:10.1016/J.CUB.2018.02.040.

Park, H., Lee, S., Shrestha, P., Kim, J., Park, J. A., Ko, Y., et al. (2015). AMI GO2, a novel membrane anchor of PDK1, controls cell survival and angiogenesis via Akt activation. *J. Cell Biol.* 211, 619–637. doi:10.1083/jcb.201503113.

Perälä, N. M., Immonen, T., and Sariola, H. (2005). The expression of plexins during mouse embryogenesis. *Gene Expr. Patterns* 5, 355–362. doi:10.1016/j.modgep.2004.10.001.

Petrovic, M., and Schmucker, D. (2015). Axonal wiring in neural development: Target-independent mechanisms help to establish precision and complexity. *BioEssays* 37, 996–1004. doi:10.1002/BIES.201400222.

Pittman, A., Law, M., and Chien, C. (2008). Pathfinding in a large vertebrate axon tract: isotypic interactions guide retinotectal axons at multiple choice points.

*Development* 135, 2865–2871. doi:10.1242/DEV.025049.

Prakash, N., Brodski, C., Naserke, T., Puelles, E., Gogoi, R., Hall, A., et al. (2006). A Wnt1-regulated genetic network controls the identity and fate of midbrain-dopaminergic progenitors in vivo. *Development* 133, 89–98. doi:10.1242/dev.02181.

Puelles, L. (2019). Survey of Midbrain, Diencephalon, and Hypothalamus Neuroanatomic Terms Whose Prosomeric Definition Conflicts With Columnar Tradition. *Front. Neuroanat.* 13. doi:10.3389/FNANA.2019.00020.

Puelles, L., Harrison, M., Paxinos, G., and Watson, C. (2013). A developmental ontology for the mammalian brain based on the prosomeric model. *Trends Neurosci.* 36, 570–578. doi:10.1016/j.tins.2013.06.004.

Puelles, L., Martínez, S., and Martínez de la Torre, M. (2008). *Neuroanatomía*. Madrid: Editorial Medica Panamericana.

Puelles, L., and Rubenstein, J. L. R. (2003). Forebrain gene expression domains and the evolving prosomeric model. *Trends Neurosci.* 26, 469–476. doi:10.1016/S0166-2236(03)00234-0.

Qin, C., and Luo, M. (2009). Neurochemical phenotypes of the afferent and efferent projections of the mouse medial habenula. *Neuroscience* 161, 827–837. doi:10.1016/J.NEUROSCIENCE.2009.03.085.

Quina, L. A., Wang, S., Ng, L., and Turner, E. E. (2009). Brn3a and Nurr1 mediate a gene regulatory pathway for habenula development. *J. Neurosci.* 29, 14309–14322. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2837-05.2005

Ramón y Cajal, S. (1909). *Histologie du système nerveux de l'homme & des vertébrés*. Madrid: Re-edition by CSIC, 1955. doi:10.5962/bhl.title.48637.

Regan, J. C., Concha, M. L., Roussigne, M., Russell, C., and Wilson, S. W. (2009). An Fgf8-Dependent Bistable Cell Migratory Event Establishes CNS Asymmetry. *Neuron* 61, 27–34. doi:10.1016/j.neuron.2008.11.030.

Rengasamy Venugopalan, S., Farrow, E., Sanchez-Lara, P. A., Yen, S., Lypka, M., Jiang, S., et al. (2019). A novel nonsense substitution identified in the AMIGO2 gene in an Occulo-Auriculo-Vertebral spectrum patient. *Orthod. Craniofacial Res.* 22, 163–167. doi:10.1111/ocr.12259.

Roelink, H., Porter, J., Chiang, C., Tanabe, Y., Chang, D., Beachy, P., et al. (1995). Floor plate and motor neuron induction by different concentrations of the amino-terminal cleavage product of sonic hedgehog autoproteolysis. *Cell* 81, 445–455. doi:10.1016/0092-8674(95)90397-6.

Roman, E., Weininger, J., Lim, B., Roman, M., Barry, D., Tierney, P., et al. (2020). Untangling the dorsal diencephalic conduction system: a review of structure and function of the stria medullaris, habenula and fasciculus retroflexus. *Brain Struct. Funct.* 225, 1437–1458. doi:10.1007/s00429-020-02069-8.

Roxo, M., Franceschini, P., Zubaran, C., Kleber, F., and Sander, J. (2011). The limbic system conception and its historical evolution. *ScientificWorldJournal.* 11, 2427–2440. doi:10.1100/2011/157150.

Sahay, A., Molliver, M. E., Ginty, D. D., and Kolodkin, A. L. (2003). Semaphorin 3F is critical for development of limbic system circuitry and is required in neurons for selective CNS axon guidance events. *J. Neurosci.* 23, 6671–6680. doi:10.1523/jneurosci.23-17-06671.2003.

Salas, R., Baldwin, P., de Biasi, M., and Montague, P. R. (2010). BOLD responses to negative reward prediction errors in human habenula. *Front. Hum. Neurosci.* 4, 1–7. doi:10.3389/fnhum.2010.00036.

Santos, M. T. A. dos, and Smidt, M. P. (2011). En1 and Wnt signaling in midbrain dopaminergic neuronal development. *Neural Dev.* 2011 61 6, 1–15. doi:10.1186/1749-8104-6-23.

Schmidt, E. R. E., Brignani, S., Adolfs, Y., Lemstra, S., Demmers, J., Vidaki, M., et al. (2014). Subdomain-mediated axon-axon signaling and chemoattraction cooperate to regulate afferent innervation of the lateral habenula. *Neuron* 83, 372–387. doi:10.1016/j.neuron.2014.05.036.

Schmidt, E. R. E., and Pasterkamp, R. J. (2017). The molecular mechanisms controlling morphogenesis and wiring of the habenula. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 162, 29–37. doi:10.1016/j.pbb.2017.08.008.

Serafini, T., Colamarino, S. A., Leonardo, E. D., Wang, H., Beddington, R., Skarnes, W. C., et al. (1996). Netrin-1 is required for commissural axon guidance in the developing vertebrate nervous system. *Cell* 87, 1001–1014. doi: 10.1016/s0092-8674(00)81795-x

Shibata, H., and Suzuki, T. (1984). Efferent projections of the interpeduncular complex in the rat, with special reference to its subnuclei: a retrograde horseradish peroxidase study. *Brain Res.* 296, 345–349. doi: 10.1016/0006-8993(84)90071-4

Shu, T., Valentino, K. M., Seaman, C., Cooper, H. M., and Richards, L. J. (1999). Expression of the netrin-1 receptor, deleted in colorectal cancer (DCC), is largely confined to projecting neurons in the developing forebrain. *J. Comp. Neurol.* 416, 201–212. doi:10.1002/(SICI)1096-9861(2000110)416:2<201::AID-CNE6>3.0.CO;2-Z.

- Smidt, M. P., and Burbach, J. P. H. (2007). How to make a mesodiencephalic dopaminergic neuron. *Nat. Rev. Neurosci.* 2007 81 8, 21–32. doi:10.1038/nrn2039.
- Smits, S. M., Burbach, J. P., and Smidt, M. P. (2006). Developmental origin and fate of meso-diencephalic dopamine neurons. *Progress Neurobiol.* 78, 1–16. doi:10.1016/j.pneurobio.2005.12.003
- Šmít, D., Fouquet, C., Pincet, F., Zapotocky, M., and Trembleau, A. (2017). Axon tension regulates fasciculation/defasciculation through the control of axon shaft zippering. *Elife* 6. doi:10.7554/ELIFE.19907.
- Squarzoni, P., Thion, M. S., and Garel, S. (2015). Neuronal and microglial regulators of cortical wiring: usual and novel guideposts. *Front. Neurosci.* 9:248. doi:10.3389/fnins.2015.00248
- Song, H. J., and Poo, M. M. (2001). The cell biology of neuronal navigation. *Nat. Cell Biol.* 3, E81--E88. doi:10.1038/35060164.
- Song, H., and Poo, M. (1999). Signal transduction underlying growth cone guidance by diffusible factors. *Curr. Opin. Neurobiol.* 9, 355–363. doi:10.1016/S0959-4388(99)80052-X.
- Sonzogni, O., Haynes, J., Seifried, L. A., Kamel, Y. M., Huang, K., BeGora, M. D., et al. (2018). Reporters to mark and eliminate basal or luminal epithelial cells in culture and in vivo. *PLoS Biol.* 16. doi:10.1371/journal.pbio.2004049.
- Spead, O., and Poulain, F. E. (2020). Trans-Axonal Signaling in Neural Circuit Wiring. *Int. J. Mol. Sci.* 21, 1–19. doi:10.3390/IJMS21145170.
- Stamatakis, A., and Stuber, G. (2012). Activation of lateral habenula inputs to the ventral midbrain promotes behavioral avoidance. *Nat. Neurosci.* 15, 1105–1107. doi:10.1038/NN.3145.
- Sutherland, R. J. (1982). The dorsal diencephalic conduction system: A review of the anatomy and functions of the habenular complex. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 6, 1–13. doi:10.1016/0149-7634(82)90003-3.
- Taciak, B., Pruszyńska, I., Kiraga, L., Bialasek, M., and Krol, M. (2018). Wnt signaling pathway in development and cancer. *J. Physiol. Pharmacol.* 69. doi:10.26402/jpp.2018.2.07.
- Tessier-Lavigne, M., and Goodman, C. S. (1996). The molecular biology of axon guidance. *Science (80-. )*. 274, 1123–1133. doi:10.1126/science.274.5290.1123.
- Varadarajan, S., Kong, J., Phan, K., Kao, T., Panaitof, S., Cardin, J., et al. (2017). Netrin1 Produced by Neural Progenitors, Not Floor Plate Cells, Is Required for

Axon Guidance in the Spinal Cord. *Neuron* 94, 790-799.e3. doi:10.1016/J.NEURON.2017.03.007.

Vickstrom, C. R., Liu, X., Liu, S., Hu, M. M., Mu, L., Hu, Y., et al. (2020). Role of endocannabinoid signaling in a septohabenular pathway in the regulation of anxiety- and depressive-like behavior. *Mol. Psychiatry*. doi:10.1038/s41380-020-00905-1.

Villalón, A., Sepúlveda, M., Guerrero, N., Meynard, M. M., Palma, K., and Concha, M. L. (2012). Evolutionary plasticity of habenular asymmetry with a conserved efferent connectivity pattern. *PLoS One* 7. doi:10.1371/journal.pone.0035329.

Villar-Cerviño, V., Kappeler, C., Nóbrega-Pereira, S., Henkemeyer, M., Rago, L., Nieto, M., et al. (2015). Molecular mechanisms controlling the migration of striatal interneurons. *J. Neurosci.* 35, 8718–8729. doi:10.1523/JNEUROSCI.4317-14.2015.

Viswanath, H., Carter, A. Q., Baldwin, P. R., Molfese, D. L., and Salas, R. (2014). The medial habenula: Still neglected. *Front. Hum. Neurosci.* 7. doi:10.3389/fnhum.2013.00931.

Wagner, F., French, L., and Veh, R. W. (2016). Transcriptomic-anatomic analysis of the mouse habenula uncovers a high molecular heterogeneity among neurons in the lateral complex, while gene expression in the medial complex largely obeys subnuclear boundaries. *Brain Struct. Funct.* 221, 39–58. doi:10.1007/s00429-014-0891-9.

Wagner, F., Stroh, T., and Veh, R. W. (2014). Correlating habenular subnuclei in rat and mouse by using topographic, morphological, and cytochemical criteria. *J. Comp. Neurol.* 522, 2650–2662. doi:10.1002/cne.23554.

Wallace, M., Huang, K., Hochbaum, D., Hyun, M., Radeljic, G., and Sabatini, B. (2020). Anatomical and single-cell transcriptional profiling of the murine habenular complex. *Elife* 9. doi:10.7554/ELIFE.51271.

Wang, R. Y., and Aghajanian, G. K. (1977). Physiological evidence for habenula as major link between forebrain and midbrain raphe. *Science* 197, 89–91. doi:10.1126/science.194312)

Wang, L., and Marquardt, T. (2013). What axons tell each other: axon–axon signaling in nerve and circuit assembly. *Curr. Opin. Neurobiol.* 23, 974–982. doi:10.1016/J.CONB.2013.08.004.

Wang, D., Li, Y., Feng, Q., Guo, Q., Zhou, J., and Luo, M. (2017). Learning shapes the aversion and reward responses of lateral habenula neurons. *ELife* 6:e23045. doi:10.7554/eLife.23045

Whitlock, K., and Westerfield, M. (1998). A transient population of neurons pioneers the olfactory pathway in the zebrafish. *J. Neurosci.* 18, 8919–8927. doi:10.1523/JNEUROSCI.18-21-08919.1998.

Worzfeld, T., Puschel, A. W., Offermanns, S., and Kuner, R. (2004). Plexin-B family members demonstrate non-redundant expression patterns in the developing mouse nervous system: an anatomical basis for morphogenetic effects of Sema4D during development. *Eur. J. Neurosci.* 19, 2622–2632. doi:10.1111/j.0953-816X.2004.03401.x.

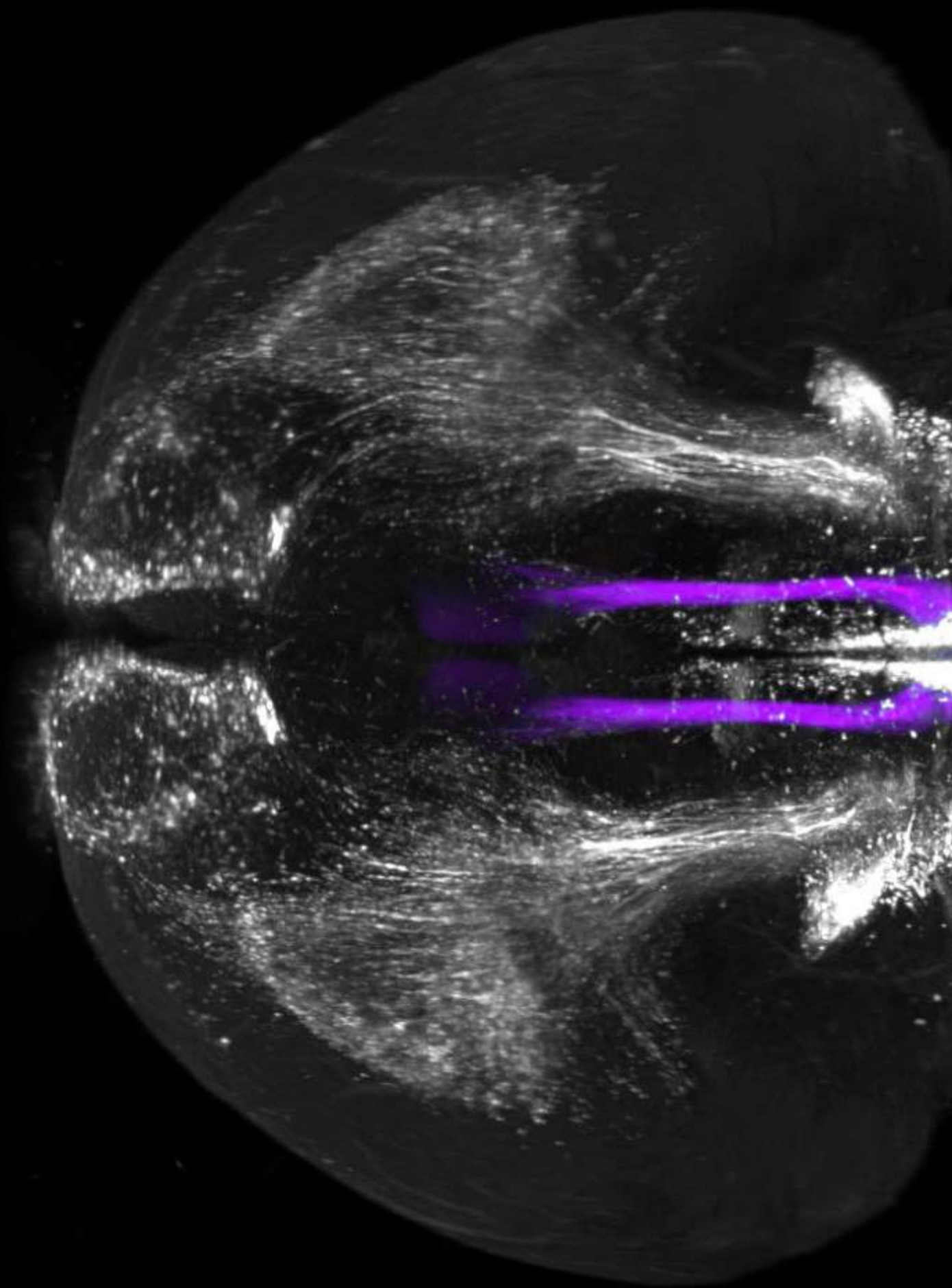
Wu, Z., Makihara, S., Yam, P. T., Teo, S., Renier, N., Balekoglou, N., et al. (2019). Long-Range Guidance of Spinal Commissural Axons by Netrin1 and Sonic Hedgehog from Midline Floor Plate Cells. *Neuron* 101, 635–647.e4. doi:10.1016/j.neuron.2018.12.025.

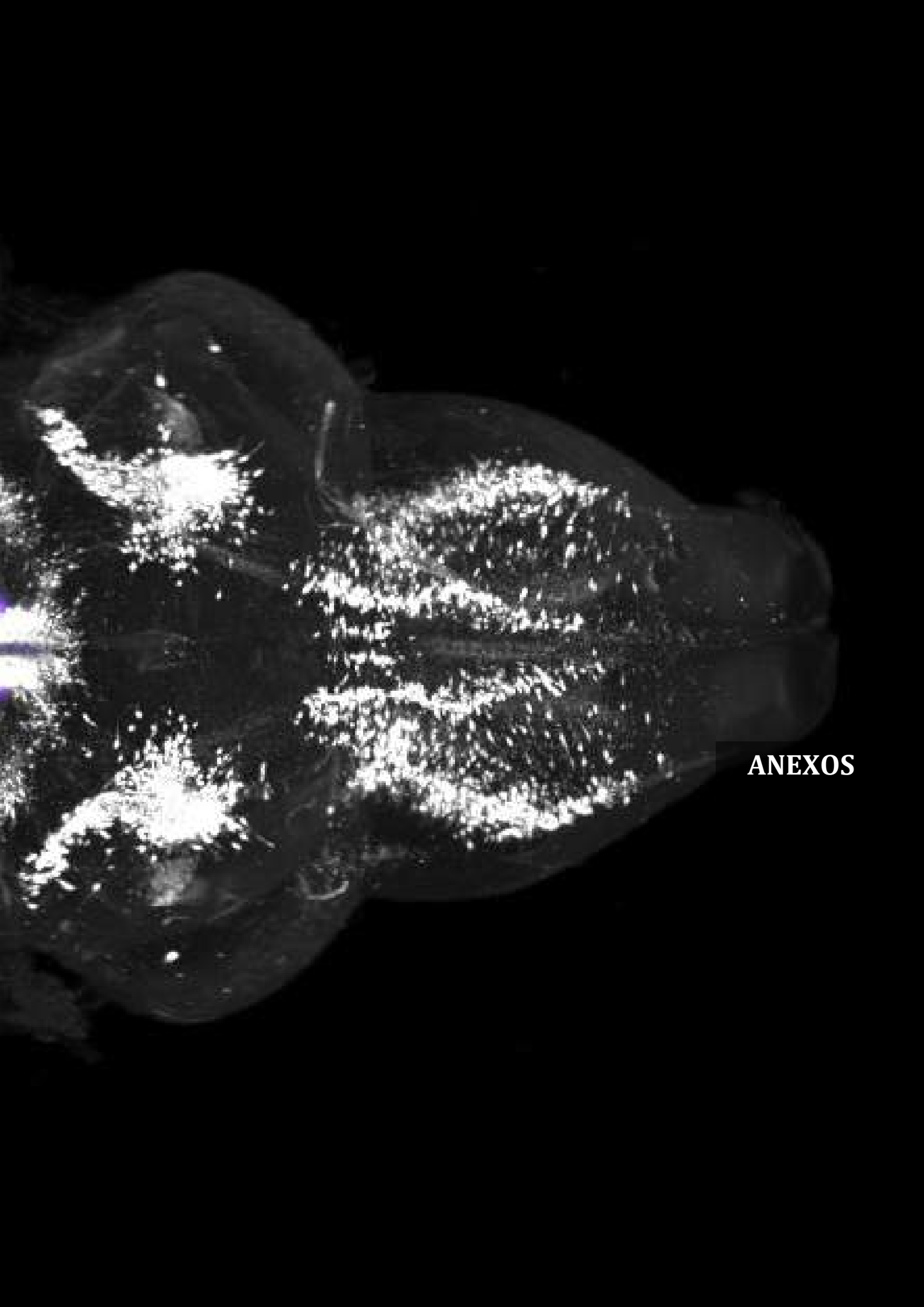
Wurst, W., and Prakash, N. (2014). Wnt1-regulated genetic networks in midbrain dopaminergic neuron development. *J. Mol. Cell Biol.* 6, 34–41. doi:10.1093/JMCB/MJT046.

Zahm, D. S., and Root, D. H. (2017). Review of the cytology and connections of the lateral habenula, an avatar of adaptive behaving. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 162, 3–21. doi:10.1016/j.pbb.2017.06.004.

Zhao, X., Kuja-Panula, J., Sundvik, M., Chen, Y. C., Aho, V., Peltola, M. A., et al. (2014). Amigo adhesion protein regulates development of neural circuits in zebrafish brain. *J. Biol. Chem.* 289, 19958–19975. doi:10.1074/jbc.M113.545582.







**ANEXOS**



## **Anexo 1A:**

### **Rol mediado por Netrin 1 de la Sustancia Negra Pars Compacta y el Área Tegmental Ventral en la guía de los axones habenulares mediales**

### **Netrin 1-Mediated Role of the Substantia Nigra Pars Compacta and Ventral Tegmental Area in the Guidance of the Medial Habenular Axons**

Verónica Company <sup>1</sup>, Abraham Andreu-Cervera <sup>1</sup>, M Pilar Madrigal <sup>1</sup>, Belén Andrés <sup>1</sup>, Francisca Almagro-García <sup>1</sup>, Alain Chédotal <sup>2</sup>, Guillermina López-Bendito <sup>1</sup>, Salvador Martínez <sup>1</sup>, Diego Echevarría <sup>1</sup>, Juan A Moreno-Bravo <sup>1</sup>, Eduardo Puelles <sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Instituto de Neurociencias de Alicante, Universidad Miguel Hernández-CSIC, Alicante, Spain.

<sup>2</sup>Sorbonne Université, INSERM, CNRS, Institut de la Vision, Paris, France.

Cell Dev Biol. 2021 Jun 8;9:682067. doi: 10.3389/fcell.2021.682067. PMID: 34169076; PMCID: PMC8217627.

The article presented here contain supplementary movies that are available online in this link:

<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcell.2021.682067/full#supplementary-material>





# Netrin 1-Mediated Role of the Substantia Nigra Pars Compacta and Ventral Tegmental Area in the Guidance of the Medial Habenular Axons

Verónica Company<sup>1</sup>, Abraham Andreu-Cervera<sup>1</sup>, M. Pilar Madrigal<sup>1</sup>, Belén Andrés<sup>1</sup>, Francisca Almagro-García<sup>1</sup>, Alain Chédotal<sup>2</sup>, Guillermina López-Bendito<sup>1</sup>, Salvador Martínez<sup>1</sup>, Diego Echevarría<sup>1</sup>, Juan A. Moreno-Bravo<sup>1\*</sup> and Eduardo Puelles<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Neurociencias de Alicante, Universidad Miguel Hernández-CSIC, Alicante, Spain, <sup>2</sup> Sorbonne Université, INSERM, CNRS, Institut de la Vision, Paris, France

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Florencia Cavodeassi,  
St George's, University of London,  
United Kingdom

### Reviewed by:

Mónica Folgueira,  
University of A Coruña, Spain  
Matthias Carl,  
University of Trento, Italy

### \*Correspondence:

Eduardo Puelles  
epuelles@umh.es  
Juan A. Moreno-Bravo  
juan.moreno@umh.es

### Specialty section:

This article was submitted to  
Morphogenesis and Patterning,  
a section of the journal  
Frontiers in Cell and Developmental  
Biology

**Received:** 17 March 2021

**Accepted:** 16 April 2021

**Published:** 08 June 2021

### Citation:

Company V, Andreu-Cervera A,  
Madrigal MP, Andrés B,  
Almagro-García F, Chédotal A,  
López-Bendito G, Martínez S,  
Echevarría D, Moreno-Bravo JA and  
Puelles E (2021) Netrin 1-Mediated  
Role of the Substantia Nigra Pars  
Compacta and Ventral Tegmental  
Area in the Guidance of the Medial  
Habenular Axons.  
*Front. Cell Dev. Biol.* 9:682067.  
doi: 10.3389/fcell.2021.682067

The fasciculus retroflexus is an important fascicle that mediates reward-related behaviors and is associated with different psychiatric diseases. It is the main habenular efference and constitutes a link between forebrain regions, the midbrain, and the rostral hindbrain. The proper functional organization of habenular circuitry requires complex molecular programs to control the wiring of the habenula during development. However, the mechanisms guiding the habenular axons toward their targets remain mostly unknown. Here, we demonstrate the role of the mesodiencephalic dopaminergic neurons (substantia nigra pars compacta and ventral tegmental area) as an intermediate target for the correct medial habenular axons navigation along the anteroposterior axis. These neuronal populations are distributed along the anteroposterior trajectory of these axons in the mesodiencephalic basal plate. Using *in vitro* and *in vivo* experiments, we determined that this navigation is the result of *netrin 1* attraction generated by the mesodiencephalic dopaminergic neurons. This attraction is mediated by the receptor deleted in colorectal cancer (DCC), which is strongly expressed in the medial habenular axons. The increment in our knowledge on the fasciculus retroflexus trajectory guidance mechanisms opens the possibility of analyzing if its alteration in mental health patients could account for some of their symptoms.

**Keywords:** habenula, fasciculus retroflexus, *netrin 1*, DCC, axon guidance, substantia nigra pars compacta, ventral tegmental area

## INTRODUCTION

The habenulae (Hb), located in the dorsal part of prosomere 2 (p2), is constituted by two main nuclei, the medial and the lateral habenulae (mHb and lHb, respectively; Andres et al., 1999). Transcriptomic analysis unveiled a concise subdivision of the mHb in different subnuclei and a not-so-precise transcript subdivision of the lHb subnuclei (Wagner et al., 2016). The mHb axons project almost exclusively and in a topographic manner to the interpeduncular (IP) nucleus in rhombomere 1 (r1). These axons constitute the core of the fasciculus retroflexus

(fr; Herkenham and Nauta, 1979; Contestabile and Flumerfelt, 1981). In turn, the IP innervates secondary targets, including the median raphe, ventral tegmental area (VTA), and dorsal tegmental nuclei (Shibata and Suzuki, 1984). The main efferents of IHB are the VTA (Araki et al., 1988; Brinschwitz et al., 2010), the substantia nigra pars compacta (SNc), the raphe complex (Wang and Aghajanian, 1977), and the locus coeruleus (Herkenham and Nauta, 1979). These IHB axons form the shield portion of the bundle around the mHb fibers (Bianco and Wilson, 2009; Schmidt et al., 2014; Ichijo and Toyama, 2015).

In zebrafish, it has been functionally related with learning, social behavior, and attention (Nakajo et al., 2020; Okamoto et al., 2021); decision making (Cherng et al., 2020); aversive reactions (Amo et al., 2014); fear and anxiety (Agetsuma et al., 2010; Jesuthasan, 2012; Okamoto et al., 2012; Mathuru and Jesuthasan, 2013); and helpless behavior (Lee et al., 2010). In mammals, there are a wide variety of functional studies of this system, using lesions, electrical stimulations (Klemm, 2004; Lecourtier and Kelly, 2005, 2007), and optogenetics to unravel its functions in reward-related behaviors (see, for a review, Hikosaka et al., 2008; Hikosaka, 2010; Batalla et al., 2017; Fakhoury, 2018). Among the different identified functions, we could mention the negative reward prediction error (Matsumoto and Hikosaka, 2007, 2009; Salas et al., 2010), reward- and aversion-related processes (Hong and Hikosaka, 2008; Koppensteiner et al., 2016; Wang et al., 2017; Otsu et al., 2018; Li et al., 2021), brain stimulation reward (Morissette and Boye, 2008; Fakhoury et al., 2016), and locomotor activity (Gifuni et al., 2012; Otsu et al., 2018). In humans, it has been related to depression, drug addiction, and Parkinson disease (Benarroch, 2015; Fakhoury, 2017; Vickstrom et al., 2020). However, the molecular mechanisms controlling the complex pathfinding decisions of the Hb axons remain poorly understood.

We described the fr trajectory in the prosomeric paradigm context (see **Figures 1, 3** of Moreno-Bravo et al., 2016). This precise anatomic interpretation of the axon path was a prerequisite to understanding which mechanisms are involved in the guidance of these axons. Contrary to the previous bibliographic references, where the fr is considered a straight fascicle, we suggested a complex axonal trajectory. The Hb subnuclei specification and differentiation has been related with the Wnt signaling (Guglielmi et al., 2020). Focusing on the mHb, the first step of the mHb axons is to grow dorsoventrally, presumably repulsed by semaphorins from the diencephalic alar plates (Funato et al., 2000; Sahay et al., 2003; Kantor et al., 2004) and then attracted by a *netrin 1-deleted in colorectal cancer (Ntn1-Dcc)* interaction from the ventral region (Funato et al., 2000). Once they arrive at the thalamic tegmentum, they are repulsed by the floor plate through a *Robo1-Slit2* interaction (Moreno-Bravo et al., 2016). The axons turn caudalward toward the IP, at r1, following a long pathway through the mesodiencephalic basal plates. The mechanism involved in this last trajectory is unknown and constitutes the main objective of this work. The selective innervation of the IP subnuclei has been related to *neuropilin 1* and *semaphorins* (Kuan et al., 2007).

Different axonal projections travel long distances to reach their final targets using highly stereotyped patterns. In some axonal tracts, such as the thalamocortical projections, the

pioneer axons use intermediate targets for their correct guidance (Chédotal and Richards, 2010; Kolodkin and Tessier-Lavigne, 2011; Garel and López-Bendito, 2014; Squarzoni et al., 2015; de Ramon Francàs et al., 2017). These intermediate targets are strategically placed along the pathway and produce signals required for the correct navigation of growing axons. Thus, a complex trajectory is divided in simpler and shorter ones, in which the axons navigate from one intermediate target to another. We postulated, as the principal hypothesis of our work, that the mesodiencephalic neuronal populations (SNc and VTA; Smits et al., 2006) play a role as an intermediate target for the mHb axons, directing them caudally toward their final destination.

Once we demonstrated its role, we identified *Ntn1* as the main attractive molecule. This secreted molecule is expressed in the SNc and VTA (Livesey and Hunt, 1997; Li et al., 2014; Brignani et al., 2020). In our work, we have demonstrated that *Ntn1* is responsible for the correct guidance of the mHb axons toward their final target and that SNc and VTA are intermediate targets in their navigation.

## MATERIALS AND METHODS

### Mouse Strains

The day when the vaginal plug was detected was considered as embryonic day 0.5 (E0.5). All mouse manipulation and experimental procedures were performed according to the directives of the Spanish and European Union governments, and the protocols were approved by the Universidad Miguel Hernández OIR Committee (2016/VSC/PEA/00190).

### *Dcc*, *Ntn1*, and *Gli2* Mutant Mice

The *Gli2*<sup>-/-</sup> ( $n = 20$ ), *DCC*<sup>-/-</sup> ( $n = 18$ ), and *Ntn1*<sup>-/-</sup> ( $n = 10$ ) mouse strains were genotyped as previously described (Fazeli et al., 1997; Mo et al., 1997; Dominici et al., 2017).

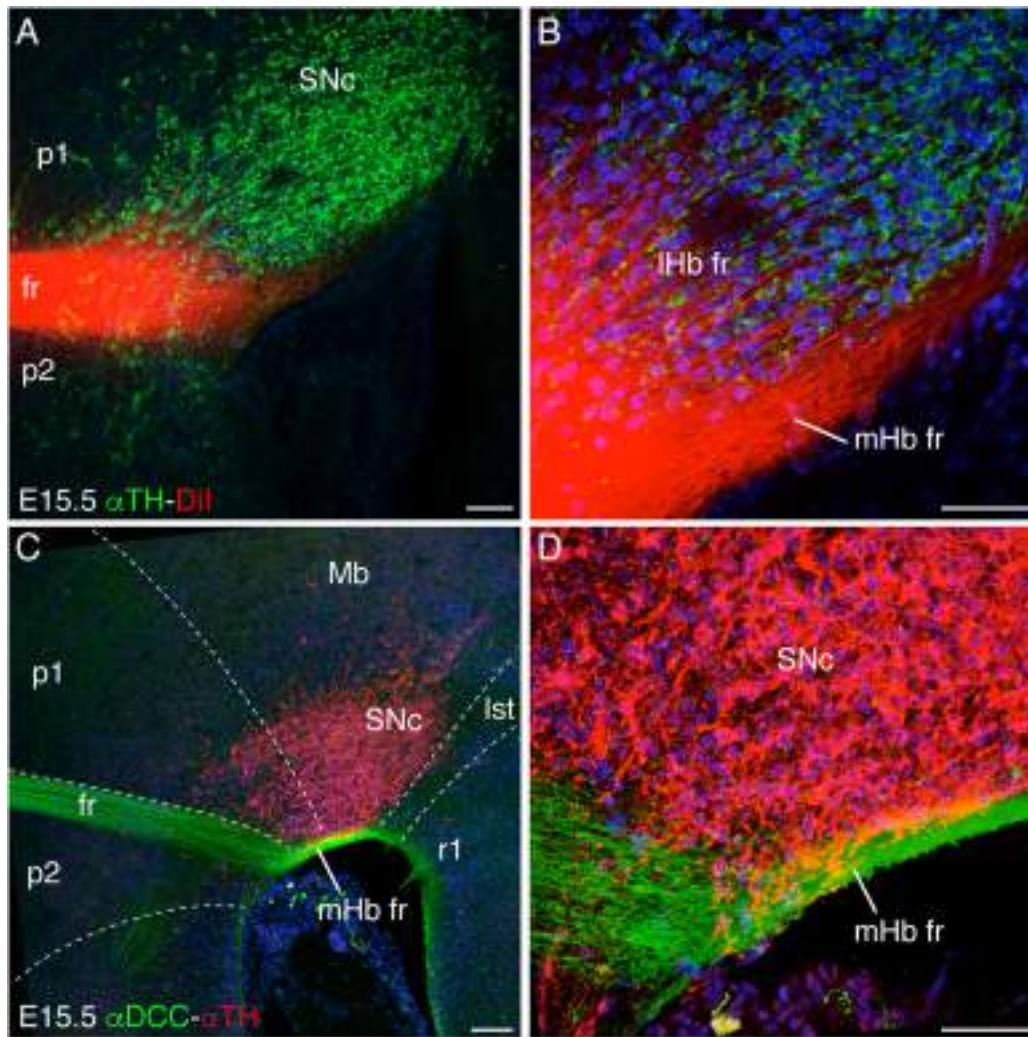
### *In situ* Hybridization and Immunohistochemistry

For *In situ* Hybridization (ISH), mouse embryo brains were fixed overnight in 4% paraformaldehyde (PFA) in phosphate-buffered saline (PBS). Paraffin sections were hybridized with the following digoxigenin-labeled probes: *Ntn1* (O. Reiner). Paraffin or vibratome sections were used for  $\alpha$ DCC Immunohistochemistry (IHC) (1:100; Santa Cruz #sc-6535),  $\alpha$ -tyrosine hydroxylase ( $\alpha$ TH; 1:1,000; Institute Jacques Boy cat. no. 268020234),  $\alpha$ NTN1 (1:500; RD Systems MAB1109), and  $\alpha$ ROBO3 (kindly provided by Dr. Fujio Murakami, Osaka University, and 1:300; AF3076/R&D Systems). In both cases, the protocols were performed as previously described (Moreno-Bravo et al., 2014).

### Open Neural Tube Explant Technique

The Open Neural Tubes (ONTs) were performed as described previously by Moreno-Bravo et al. (2014). Briefly, neural tubes of E12.5 or E13.5 embryos were dissected and opened along the dorsal midline, and the telencephalic vesicles and hypothalamus





**FIGURE 1** | Longitudinal navigation of habenular axons through the SNc and VTA. **(A,B)** Dil fr labeling and TH immunochrometry in E15.5 brain sagittal section. We differentiated the defasciculated IHb crossing the SNc and the compacted mHb axons in contact with the pial surface underneath the SNc to reach their target in r1. **B** is a higher magnification of **A**. **(C,D)** E15.5 brain sagittal section labeled against DCC and TH. DCC specifically labeled the mHb axons, which navigate underneath the SNc. **D** is a higher magnification of **C**. The white dotted lines define the boundaries between different neuromeres (p2, p1, Mb, Ist, and r1). Abbreviations: Ist, isthmus; IHb fr, lateral habenular axons of the fasciculus retroflexus; Mb, midbrain; mHb fr, medial habenular axons of the fasciculus retroflexus; p1, prosomere 1 (pretectum); p2, prosomere 2 (thalamus); SNc, substantia nigra pars compacta; r1, rhombomere 1; fr, fasciculus retroflexus. Scale bar: 100  $\mu\text{m}$  in **A** and **C** and 50  $\mu\text{m}$  in **B** and **D**.

regions were removed. The fr developing area was kept intact. Finally, the dissected explants were cultured like an open book with the ventricular surface looking upwards on a polycarbonate membrane (Millicell PICMORG50).

## Ectopic Implantation of SNc in ONT Experiments

Parasagittal vibratome slices (250  $\mu\text{m}$ ) of E14.5 green fluorescent protein (GFP) mouse brains were used as donors. We removed the piece of tissue corresponding with the SNc for the experimental side and a piece of the prosomere 1 (p1) alar plate for controls; this control region was selected due to its non-attractive effect for Hb axons (Funato et al., 2000). We

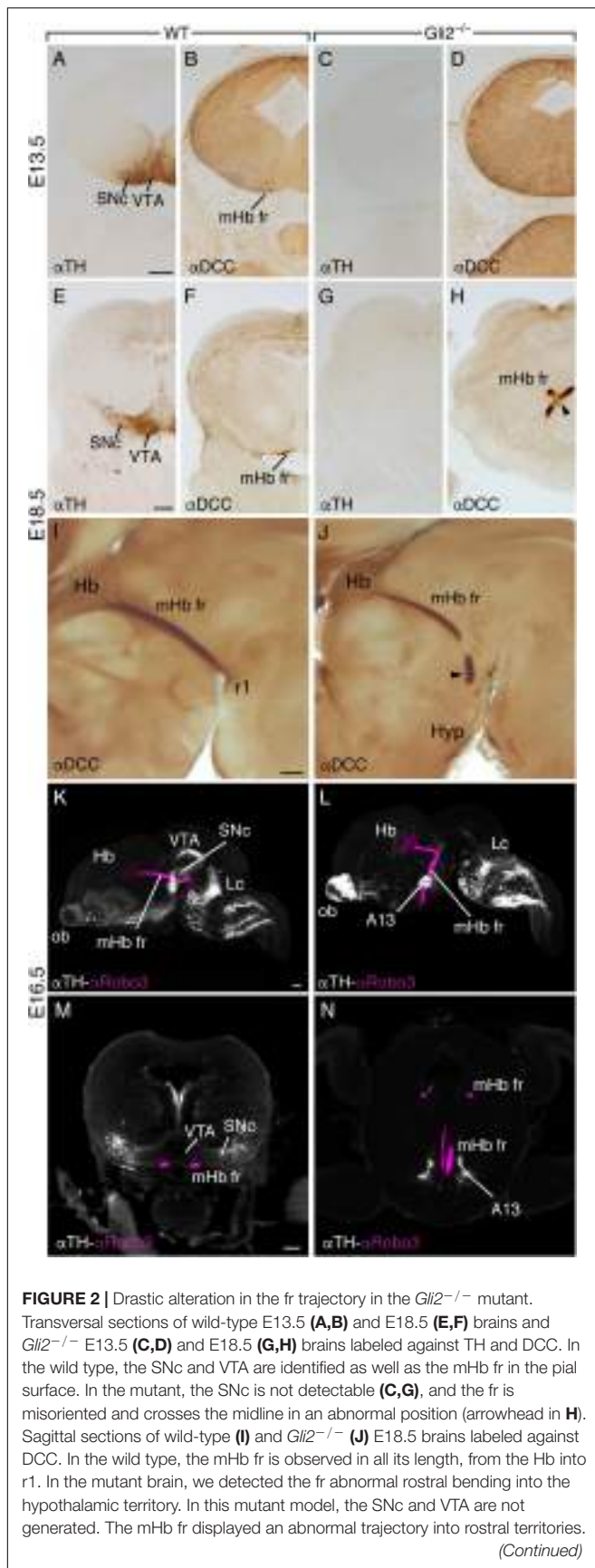
inserted the tissue graft in the basal plate of the p2 in the ONTs. These ONTs were cultured by contacting a polycarbonate membrane (Millicell PICMORG50) for 48 h.

For blocking assays, we used  $\alpha\text{DCC}$  (AF5 clone/Ab16793/Abcam), 3  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , or a control mouse IgG was added to the culture media.

## Overexpression of *Ntn1* in ONT Experiments

COS7 cells were transfected by lipofection (Lipofectamine 2000 reagent, Invitrogen) *Ntn1* or control GFP-expressing vector (PCX-GFP) and cultured for 48 h. Aggregates of COS7 transfected cells were prepared by embedding transfected cells in





**FIGURE 2 |** Drastic alteration in the fr trajectory in the *Gli2*<sup>-/-</sup> mutant. Transversal sections of wild-type E13.5 (A,B) and E18.5 (E,F) brains and *Gli2*<sup>-/-</sup> E13.5 (C,D) and E18.5 (G,H) brains labeled against TH and DCC. In the wild type, the SNc and VTA are identified as well as the mHb fr in the pial surface. In the mutant, the SNc is not detectable (C,G), and the fr is misoriented and crosses the midline in an abnormal position (arrowhead in H). Sagittal sections of wild-type (I) and *Gli2*<sup>-/-</sup> (J) E18.5 brains labeled against DCC. In the wild type, the mHb fr is observed in all its length, from the Hb into r1. In the mutant brain, we detected the fr abnormal rostral bending into the hypothalamic territory. In this mutant model, the SNc and VTA are not generated. The mHb fr displayed an abnormal trajectory into rostral territories. (Continued)

## FIGURE 2 | Continued

3D lateral view of E16.5 wild-type brain (K) and *Gli2*<sup>-/-</sup> mutant (L) labeled for TH and ROBO3 with the iDISCO protocol. This 3D view allowed us to follow the trajectory of the mHb fr tract by the specific ROBO3 labeling and its relation with the dopaminergic populations by TH. In the wild type (K), the mHb fr reached its target; meanwhile, in the mutant (L), we clearly observed the tract misrouting into the hypothalamic territory and the absence of the dopaminergic populations in the mesodiencephalic territory. A frontal section to the midbrain in the wild type obtained from the reconstructed sample; the relation of the mHb fr with the dopaminergic populations is displayed (M). In the mutant embryo, a section of a similar section plane but in a more anterior position displays the mHb fr in its initial location and how it finally enters into the hypothalamic territory (N). Abbreviations: A13, A13 dopaminergic population; Hb, habenula; Hyp, hypothalamus; Lc, locus coeruleus; mHb fr, medial habenular axons of the fasciculus retroflexus; ob, olfactory bulb; r1; rhombomere 1; SNc, substantia nigra pars compacta; VTA, ventral tegmental area. Scale bar: 200 μm.

Matrigel (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, United States). Cell aggregates were cut to an appropriate size and added in p2.

## Axonal Tracing

For axonal tracing, the embryonic brains and ONTs were fixed for 1 h in 4% PFA. Small DiI crystals (1,1'-diocetadecyl 3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate; Molecular Probes) were inserted into the Hb nuclei. The labeled brains and ONTs were incubated at 37°C in 4% PFA until the tracers had diffused sufficiently.

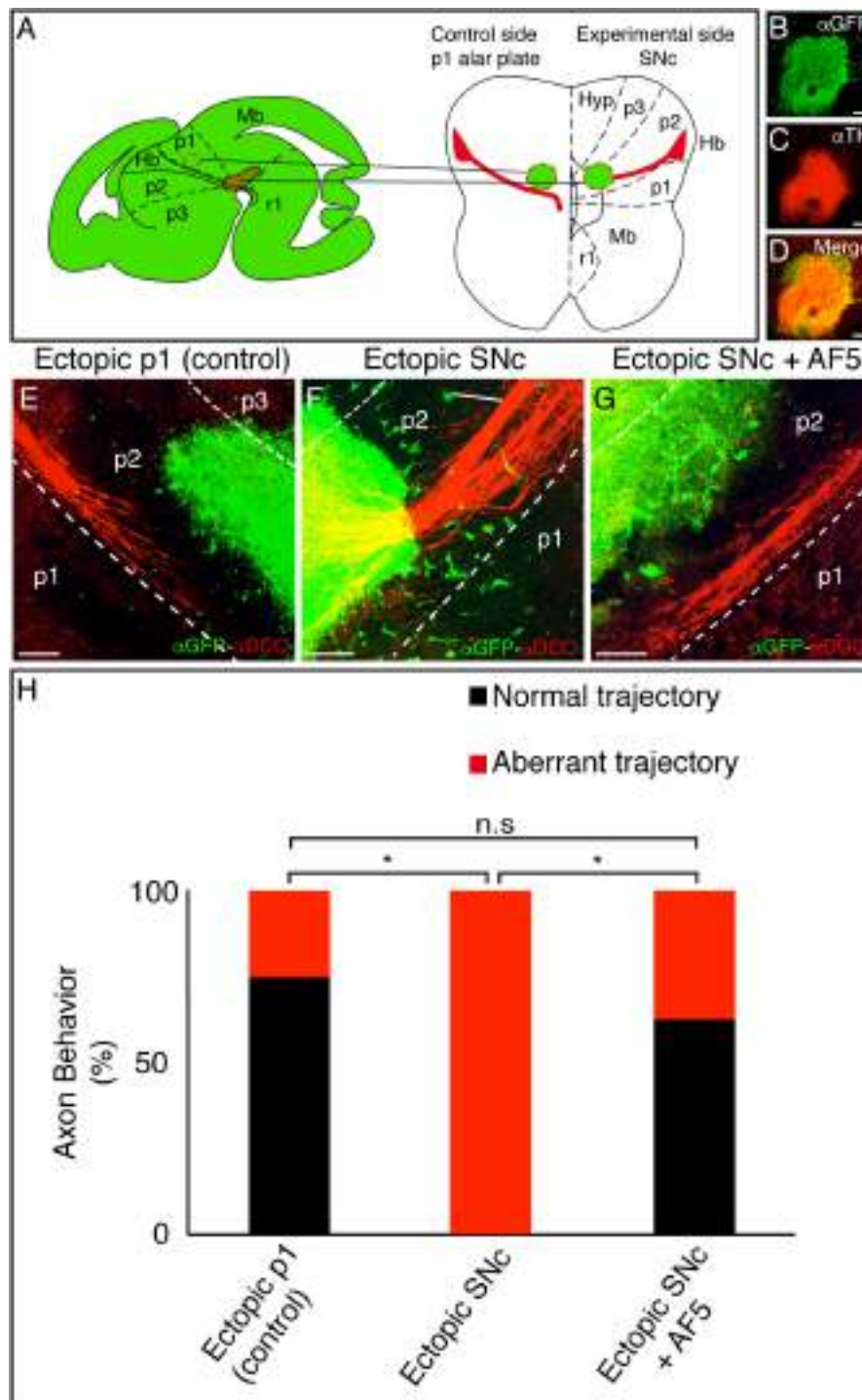
## ONT Immunocytochemistry

After the culture, the ONTs were fixed in 4% PFA for 3 h. Next, they were washed for several hours in PBS containing 1% Triton-X (PBS-T). Then the tissue was blocked for at least 2 h with PBS-T and albumin bovine serum (BSA, #A2153-50G Sigma) at 0.1% and 10% lysine 1 M. Next, it was incubated for 2–3 days at 4°C temperature in PBS-T and BSA (0.1%) and sodium azide (0.01%) with different primary antibodies: αDCC IHC (1:100; Santa Cruz #sc-6535), αGFP (1:1,000; Aves Labs GFP-1020), and αTH (1:1,000; Institute Jacques Boy cat. no. 268020234). After overnight washing in PBS-T, the secondary fluorescent antibodies were also incubated in PBS-T overnight, and it was followed by overnight washes in PBS-T. ONTs were counterstained with DAPI diluted in PBS at 0.001% and incubated for 10 min at room temperature and visualized on a Leica confocal microscope DM5500-Q.

For quantification of axon behavior in the ONT ectopic tissue and cell aggregate assays, the cultures were classified as having a “normal trajectory” when less than six axons were reoriented toward the ectopic source. The cases where more than six axons were reoriented were considered as a “modified trajectory.” For these experiments, statistical analysis was performed with the chi-square test using the GraphPad Prism software.

## Whole-Mount Immunostaining and Clearing Procedure (iDISCO)

Whole-mount brains were immunostained and cleared following the protocol described (Belle et al., 2017). Briefly, after



**FIGURE 3 |** Ectopic SNc guides the mHb axons to rostral regions. **(A)** Schematic representation of the ectopic tissue implantation experiment in E12.5 ONTs. The stage was selected to affect the descending fibers toward the diencephalic basal plate. The ectopic tissue is obtained from an E14.5 GFP donor. The control (p1 alar plate) and the experimental tissues (SNc) were implanted in the basal plate of the p2. Basal and floor plates are delimited by continuous lines. The floor plate is on the left and caudal to the bottom. **(B–D)** Characterization of the experimental ectopic tissue, labeled against GFP **(B)** and TH **(C)** to check the correct SNc isolation. **D** is the merged image of **B** and **C**. **(E–G)** Control side **(E)** and experimental **(F)** side. The ONTs with the ectopic tissue were cultured for 48 h and subjected to IHC for GFP and DCC. Placing the ectopic SNc in the ventral region of p2 reoriented the mHb axons of the fr. This effect is not observed in the control and when we implanted SNc and added the blocking DCC antibody (AF5). **(H)** Quantification indicating the percentage of experiments with a normal or modified trajectory mHb fr. \* $p < 0.01$ . Abbreviations: Hb, habenula; Hyp, hypothalamus; Mb, midbrain; p1, prosomere 1 (pretectum); p2, prosomere 2 (thalamus); p3, prosomere 3 (prethalamus); SNc, substantia nigra pars compacta; r1, rhombomere 1; fr, fasciculus retroflexus. Scale bar: 100  $\mu$ m.

dehydration in methanol, the samples were bleached using 6% hydrogen peroxide solution in 100% methanol O/N at 4°C. Samples were blocked using PBS-GT, i.e., PBS containing 0.2% gelatin (Prolabo) and 0.5% Triton X-100 (Sigma-Aldrich) O/N at RT, and then incubated in agitation for 7 days at 37°C with  $\alpha$ ROBO3 (1:300, R&D Systems AF3076),  $\alpha$ TH antibody (1:1000, Abcam AB152), and  $\alpha$ NTN1 (1:500, R&D Systems MAB1109). This was followed by six washes for 30 min in PBS-GT at RT and incubation with the secondary antibody O/N at 37°C. The clearing was achieved through methanol, dichloromethane (Sigma-Aldrich #270997), and dibenzyl ether (Sigma-Aldrich #108014) as described by Belle et al. (2017).

## Image Processing

3D imaging was performed with a light-sheet fluorescence microscope (Ultramicroscope II, LaVision BioTec) using the ImSpector Pro software (LaVision BioTec). The image stacks were processed using the Imaris x64 software (Bitplane) to generate surface contour using a “normal shading” function based on Robo3 staining to visualize the fr organization in 3D, and static 3D pictures for Robo3, tyrosine hydroxylase (TH), and Ntn1 were generated using the “snapshot” tool.

## RESULTS

### The fr Trajectory Through the SNc and VTA

As described above, once the mHb axons contact the p2 floor plate, they avoid it, bend, and navigate caudalward through the basal plate. In order to study the longitudinal trajectory of the fr, we labeled with a DiI crystal the Hb nuclei (mHb and lHb) in the embryonic stage (E)15.5 brain, the developmental stage when the tracts are already bended caudally. With the aim to describe the fr close contact with the SNc and VTA, we performed sagittal sections of the DiI-labeled embryo and revealed the presence of the mesodiencephalic dopaminergic populations with a specific antibody against TH (Figures 1A,B). We observed a dense fasciculated tract approaching the floor plate just rostral to the SNc and VTA (Figure 1A). As the fibers started to bend caudally, they behaved in two different ways. On the one hand, a group of fibers defasciculated from the main tract and navigated into the SNc; these should correspond to lHb axons. On the other hand, the rest of the tract kept tightly fasciculated and navigated caudally adjacent to the pial surface; these should coincide with mHb axons (Figure 1B).

To confirm the origin of the fasciculated fibers, we analyzed the distribution of the DCC receptor, specifically expressed by the mHb (Braisted et al., 2000; Schmidt et al., 2014). The double staining showed that the mHb axons bended caudally and navigated by fasciculating in close contact with the SNc and VTA and the pial surface (Figures 1C,D). Thus, the DiI-positive and DCC-negative axons must correspond to lHb fr (compare Figures 1B,D).

Our observation about the mHb axon distribution in relation to the SNc and VTA suggests that these populations could play a pivotal role in mHb axon guidance. These neurons should expose

axonal cues to attract mHb axons and cause the bending of the axons toward caudal regions.

### The mHb Axons Are Disoriented in SNc and VTA Absence

In order to test our hypothesis, we decided to study the effect generated by the absence of the SNc and VTA in the development of the fr. For this purpose, we selected the *Gli2*-knockout transgenic model, which lacks the function of one of the secondary messengers of the Shh pathway (Mo et al., 1997). The result of this genetic alteration is the disruption in the differentiation program of basal plate neuronal fates. One of the most affected neuronal populations are the mesodiencephalic dopaminergic neurons (Matise et al., 1998). Nevertheless, all the ventral neuronal structures are affected. At E13.5, in midbrain coronal sections, the SNc and VTA were identified by the immunohistochemistry labeling of TH (Figure 2A), and the mHb fr axons are located adjacent to the pial surface, beneath the SNc (Figure 2B). In the *Gli2*<sup>-/-</sup>, no TH-positive neurons were observed, and the mHb fr axons were also non-detectable as a compact superficial tract (Figures 2C,D). Later in development, at E18.5, the SNc and the VTA are further developed and displayed their full extension (Figure 2E), and the mHb fr axons are located superficially to both dopaminergic populations (Figure 2F). In the mutant embryo, no dopaminergic neurons were identified in the mesodiencephalon (Figure 2G), and the mHb fr axons displayed an abnormal behavior, with a midline cross of the left tract over the right side, far away from the superficial side of the midbrain (Figure 2H). In sagittal sections, we were able to observe the complete trajectory of the mHb fr tract, from the mHb, located in the diencephalic p2, into the IP nucleus in r1 (Figure 2I). In the mutant, the mHb tract displayed an aberrant trajectory, and the axons turned rostrally and penetrated into the hypothalamic territory (Figure 2J).

To illustrate this dramatic phenotype, we performed an iDISCO protocol on wild-type and *Gli2*<sup>-/-</sup> E16.5 brains. We labeled the dopaminergic populations and the fr mHb axons (Figures 2K–N). The resulting 3D view allowed us to display the relation between the fr and the SNc and VTA in the wild type (Figure 2K and Supplementary Video 1); the fr spatial relation with the dopaminergic neurons was revealed by the distribution of the ROBO3 protein (a specific marker of mHb axons; Belle et al., 2014; Figure 2M). In *Gli2*<sup>-/-</sup>, the 3D view illustrated the TH distribution alterations; in the mesodiencephalic domain, the absence of dopaminergic neurons is almost complete (Figure 2L and Supplementary Video 2). This view also allowed us to show the mHb fr striking misdirection toward rostral domains; no single axon was detected toward their caudal target (Figure 2N and Supplementary Video 2). The misrouted tract seems related to an enlarged A13 dopaminergic population located in the prethalamic territory.

### The SNc and VTA Attract Hb Axons

We next focused on demonstrating the possible attractive role of SNc and VTA on mHb axons. We developed an *in vitro* assay where SNc explants from a *GFP*<sup>+/-</sup> mouse brain were ectopically



placed in an organotypic neural tube culture (ONTs, Moreno-Bravo et al., 2014). As control, we used p1 alar plate explants (Figure 3A). The GFP-positive tissue was located in the basal plate of p2, adjacent and rostral to the point where the fr bends caudalward (Figure 3A). We confirmed that our experimental tissue corresponded mainly to the SNc (being the donor tissue extracted from a parasagittal section, the VTA's presence must be residual) by immunostaining it against TH and GFP (Figures 3B–D). In order to affect the descending fr axons, the experiments were performed in ONTs at E12.5.

Whereas the control tissue did not affect the Hb axon trajectory (Figure 3E), the ectopic SNc reoriented the mHb axons, modifying their direction toward rostral regions (Figure 3F). In order to quantify the misorientation of the tract, we considered as aberrant behavior the misrouting of more than six axons. This aberrant behavior was observed in 25% of control experiments and in 100% of ectopic SNc experiments ( $n = 8$  for control and ectopic SNc;  $p < 0.01$ ; Figure 3H). Thus, the SNc neurons are able to display an attractive role to the mHb and lHb fr axons.

The fact that the mHb axons strongly express the DCC receptor prompted us to test the possible role of this molecule in the phenomenon observed. We blocked DCC receptor activity through the blocking antibody AF5 (Bennett et al., 1997). The mHb axons on ONTs with the blocking treatment did not respond to the effect of the ectopic SNc; the aberrant behavior was observed in 37.5% of the experiments ( $n = 9$  for SNc + AF5 and  $n = 8$  for ectopic SNc;  $p < 0.01$ ; Figures 3G,H).

## The SNc and VTA Express *Ntn1* and Locally Secrete Its Protein

The DCC receptor-specific location in the mHb axons and the effect produced by the blocking antibody AF5 experiments prompted us to carefully analyze the expression of the DCC ligand (Keino-Masu et al., 1996) *Ntn1* in the SNc and VTA.

We followed the distribution of SNc and VTA neurons and *Ntn1* expression pattern in the mesodiencephalic basal plate during development. At E12.5, when the fr tract is developing, we found that *Ntn1* was expressed not only in the floor and basal plate ventricular layer but also in the basal plate mantle layer in coincidence with the dopaminergic neuron location (Figure 4A). These dopaminergic neurons of the future SNc and the VTA are already detectable (Figure 4B). At E15.5, the *Ntn1* distribution in the mantle layer (Figure 4C) largely coincides with the well-developed SNc and VTA locations (Figure 4D). Recent publications demonstrated that the NTN1 protein has been located in axonal projections and not in the area surrounding the soma of the *Ntn1*-expressing neurons (Dominici et al., 2017; Varadarajan et al., 2017; Moreno-Bravo et al., 2019; Brignani et al., 2020). We studied the distribution of the NTN1 protein in relation to the TH-positive cells of the SNc and VTA, at the time point when the fr is bending (Figures 4E–G). Both proteins colocalize; thus, in this particular area, our data suggest that the protein is secreted in the surrounding area where it is produced. The axons from the tectospinal tract and the fr also appeared positive (Figure 4F).

## *Ntn1* Plays a Role in fr Guidance

We compared in E13.5 the mRNA and protein distribution in the wild type and *Gli2*<sup>-/-</sup> mutant, in order to check if the phenotype observed could be due to an alteration in the *Ntn1* expression pattern or in the NTN1 protein distribution. In a E13.5 frontal section to the midbrain, as previously shown, the distribution of the *Ntn1* mRNA observed in the wild type corresponds with the SNc and VTA locations (Figure 5A). This mRNA distribution was compared with NTN1 and TH protein distributions processed by the iDISCO protocol (Figure 5B). This technique was applied to improve our detection range due to the low NTN1 protein level in the mutant embryo. The *Ntn1* expression is severely affected in the mutant, with a complete absence of *Ntn1* in the mantle layer, and a small ventricular expression is maintained (arrow in Figure 5C). A faint labeling of the NTN1 protein was also detected in the floor plate ventricular layer (arrow in Figure 5D). Therefore, the phenotype observed in the *Gli2*<sup>-/-</sup> mutant could be due to the alteration in the *Ntn1* expression. The rostral misroute of the fr in the *Gli2*<sup>-/-</sup>, as mentioned above, appears related to an enlarged A13 dopaminergic nucleus. This population contains the NTN1 protein localized with TH (Figures 5E,F), which could explain the direction of the tract in this mutant.

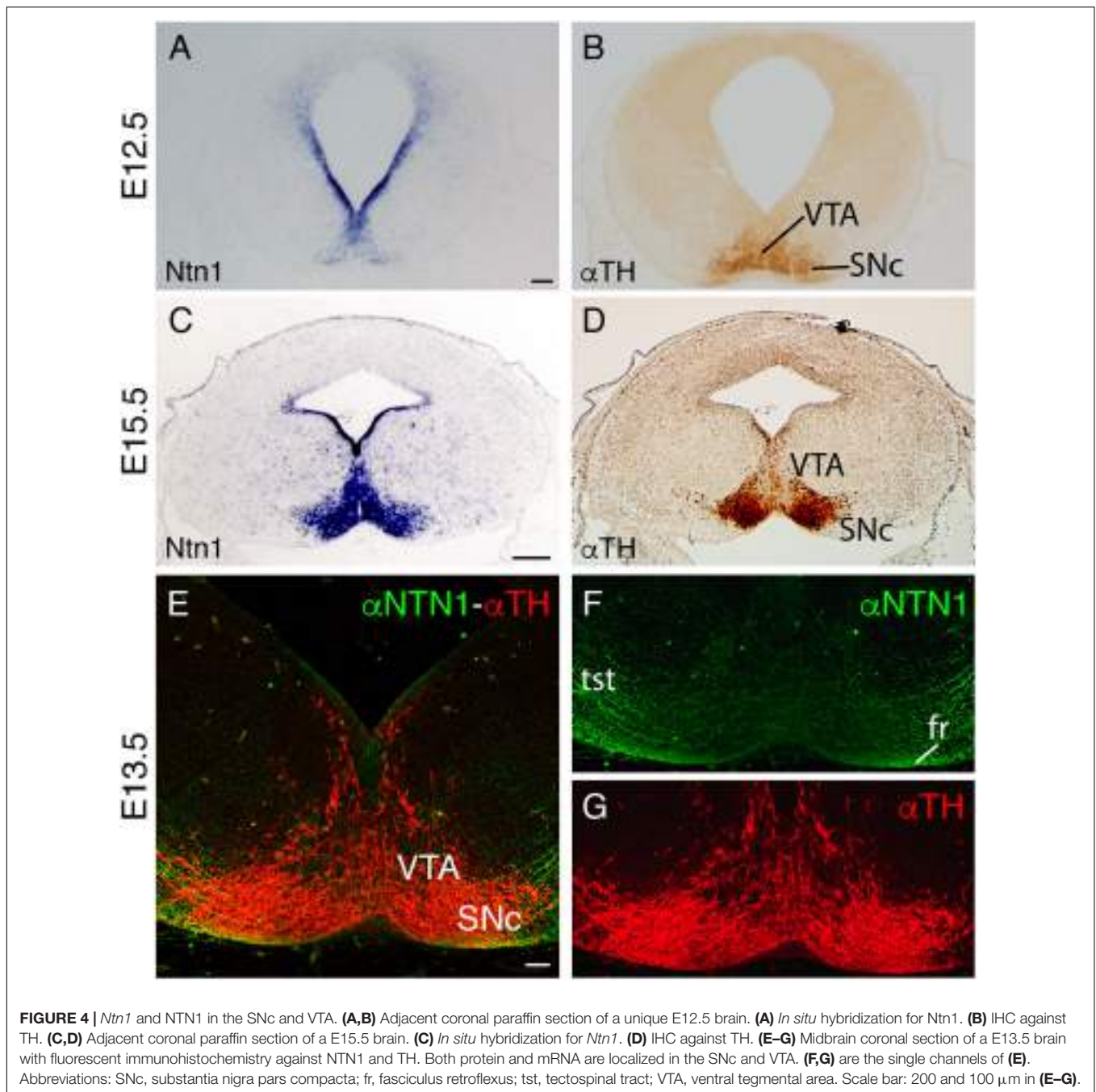
To test the possible direct role of *Ntn1* in the rtf caudal bending, we placed *Ntn1*-expressing cells in ONTs, similar to the experiments described above, and GFP-expressing control cells (Figure 6A). The control cells did not affect the mHb axon trajectory (Figure 6B); the *Ntn1*-expressing cells reoriented the fr tract, modifying their direction toward the rostral region where the cells were located (Figure 6C). In order to quantify the misorientation of the tract, we considered as aberrant behavior the misrouting of more than six axons. This aberrant behavior was observed in 11.11% of control experiments and in 80% of *Ntn1*-expressing cell experiments ( $n = 9$  for control and 10 for *Ntn1*-expressing cells;  $p < 0.01$ ; Figure 6D).

Therefore, *Ntn1* expression is sufficient to direct the fr caudal bending. Alterations in this expression produced aberrant trajectories of the tract.

## The fr Phenotype in *Ntn1* and DCC Mutant Mice

The compelling evidence obtained in our *in vitro* assays induced us to analyze *in vivo* the *Ntn1*–DCC system's role in fr development. We studied the mHb axon behavior in the *Ntn1* mutant mice (Dominici et al., 2017).

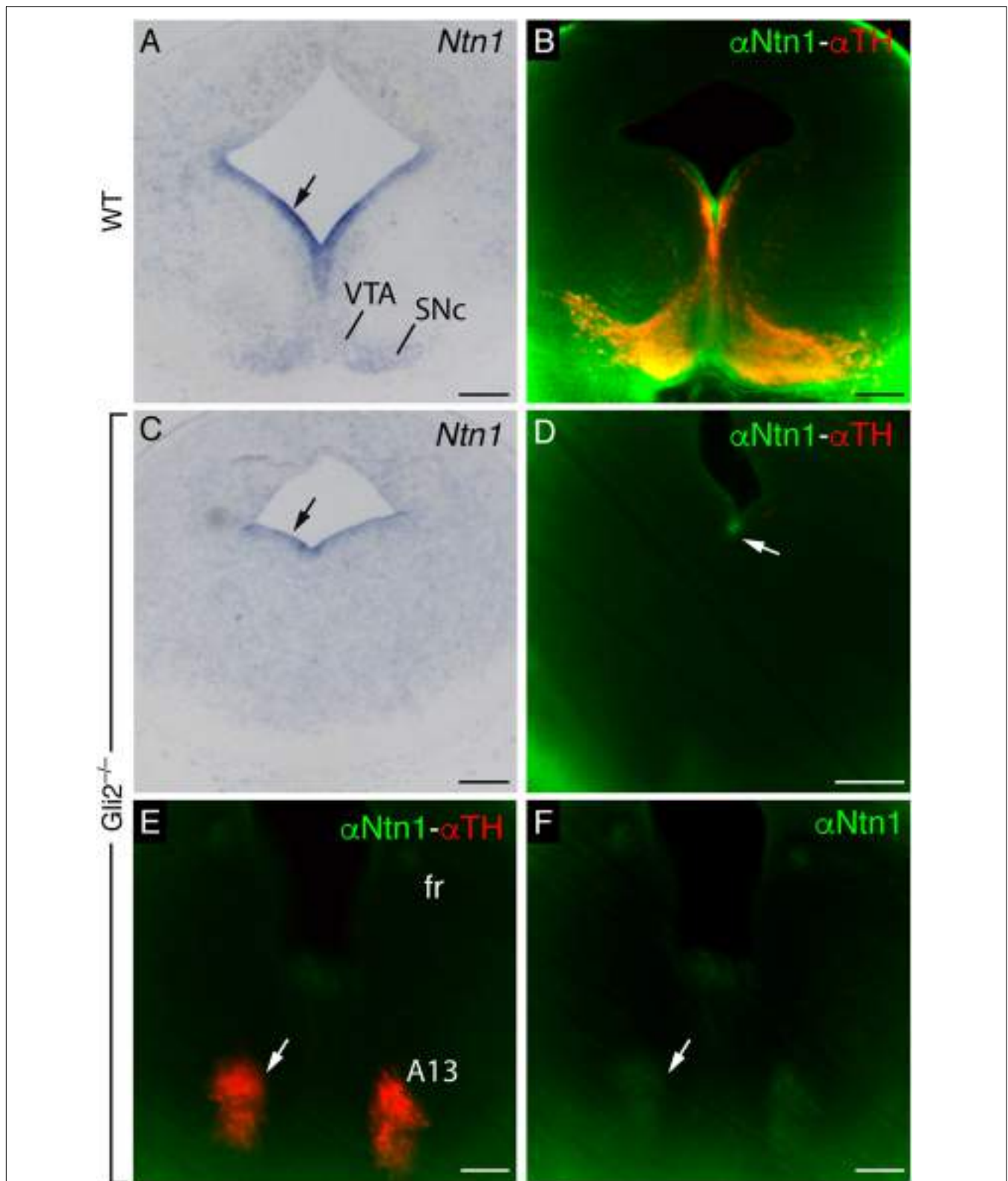
With the aim to elucidate the mHb axonal behavior observed, we analyzed sagittal and frontal sections of E16.5 *Ntn1*<sup>-/-</sup> embryos labeled against DCC for the mHb fr and TH for the SNc and VTA. In sagittal sections, comparing the wild-type (Figure 7A) and the *Ntn1*<sup>-/-</sup> (Figure 7B) E16.5 brains, we detected an abnormal bending of the mHb axons toward caudal positions. They invaded the basal plate of the pretectal prosomere, demonstrating their non-attraction to the *Ntn1*-depleted SNc and VTA. Some axons displayed abnormal bending toward different directions including the roof plate (as described in Belle et al., 2014). To illustrate the spatial relation between



these structures, we analyzed frontal sections contrasting wild types and mutants. In the wild type (**Figures 7C,D**), the mHb components of the fr tract approximate to the SNc and VTA pial locations before bending caudally; meanwhile, in the mutant brains (**Figures 7E,F**), the SNc and VTA displayed an abnormal neuronal distribution (described in Brignani et al., 2020), and the mHb fr appeared partially defasciculated and unable to reach the pial surface underneath the SNc and VTA.

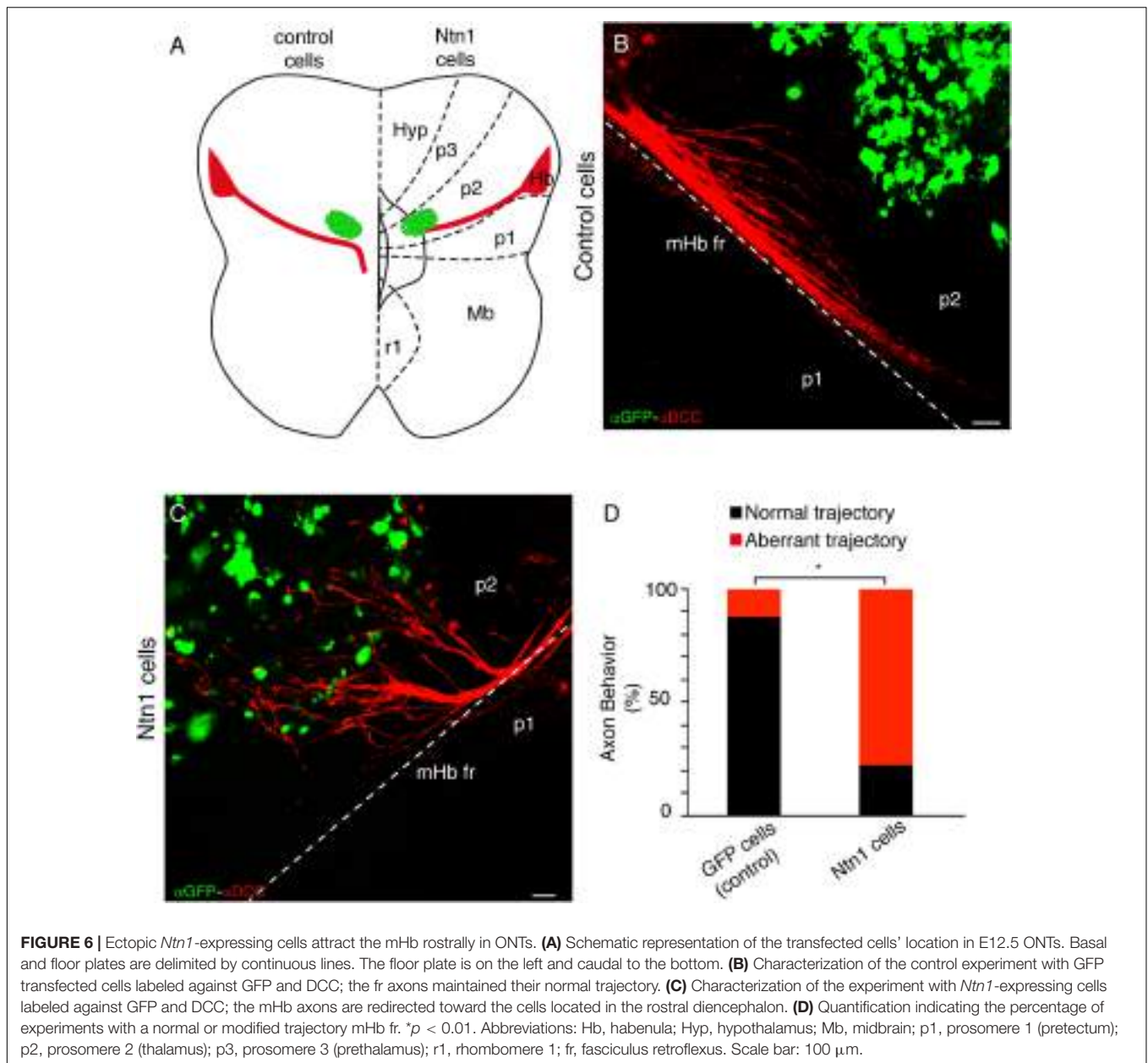
Once we analyzed the role of the signaling molecule, we decided to check the phenotype of its receptor loss of function. We labeled the Hb with DiI of E13.5 *DCC*<sup>+/-</sup> and *DCC*<sup>-/-</sup>

ONTs. In contrast with the heterozygous ones (**Figure 8A**), the vast majority of mutant mHb axons were stalled in the p2 basal plate, unable to bend caudally. Some of them, together with the lHb, bended in an abnormal distance of the floor plate (**Figure 8B**). This result coincides with the variable phenotype shown by Belle et al. (2014). At E15.5, we confirmed, by ROBO3 staining, that the mHb dorsoventral axonal navigation reached the p2 tegmentum (arrow in **Figures 8C,E**). In caudal sections, we were unable to detect the mHb fr (**Figure 8D**), despite Belle et al. (2014) showing its presence, where the mesodiencephalic dopaminergic neurons were present (**Figure 8F**). In the absence



**FIGURE 5** | *Ntn1* mRNA and NTN1 protein distribution in E13.5 wild type and *Gli2*<sup>-/-</sup> mutant. **(A,B)** Midbrain coronal sections of E13.5 wild-type brains labeled with *Ntn1* *in situ* hybridization **(A)** and light-sheet fluorescence microscopy images with NTN1 and TH *in toto* IHC **(B)**. **(C–F)** Coronal sections of E13.5 *Gli2*<sup>-/-</sup> brains labeled with *Ntn1* *in situ* hybridization **(C)** and with NTN1 and TH IHC by the iDISCO protocol **(D–F)**. Midbrain level in **(C,D)** and diencephalic level in **(E,F)**. Abbreviations: A13, A13 dopaminergic population; SNc, substantia nigra pars compacta; VTA, ventral tegmental area. Scale bar: 200  $\mu$ m.





of DCC, the *Ntn1* secreted by the SNc and VTA did not properly attract the mHb axons.

In summary, the phenotype observed in both mutants was similar and confirmed the data obtained in the *in vitro* approaches.

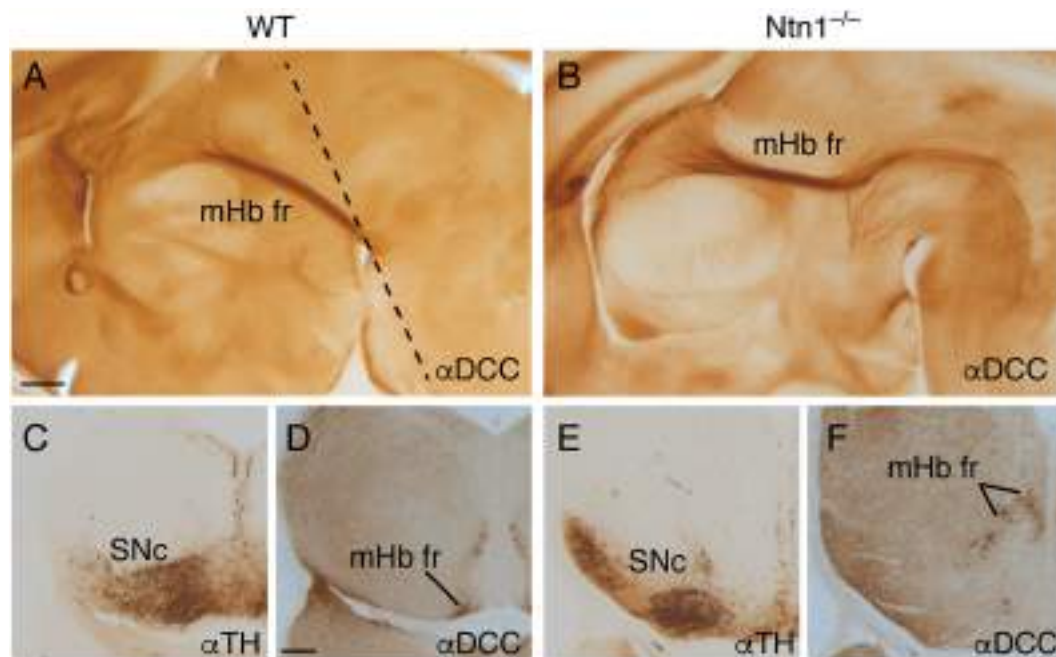
## DISCUSSION

The fr pathfinding mechanisms have been largely neglected until the last years. The reinterpretation of the fr trajectory under the prosomeric model has opened the possibility of properly understanding the behavior of this tract (Moreno-Bravo et al., 2016). Among the different key decision points adopted by the

Hb axons during their trajectory, one of the most elusive has been the caudal bending in the basal p2. To address this question, we planned to identify the signal and the source involved in this particular fr navigation event. Considering the neuronal populations that surround the tract, we identified the SNc and VTA as potential candidates. Our *in vitro* and *in vivo* approaches have allowed us to prove the role of the SNc and VTA as the source of the attractive signal and *Ntn1* as the attractive molecule for the mHb axons through the DCC receptor.

## Relations of the Hb Axons and the SNc and VTA

Axonal projections extend throughout extensive regions following a stereotyped pattern to reach their final target. To



**FIGURE 7 |** The fr phenotype in *Ntn1*<sup>-/-</sup>. Sagittal section of E16.5 wild-type (A) and *Ntn1*<sup>-/-</sup> (B) brains stained with  $\alpha$ DCC. The mHb fr in the mutant displayed an abnormal trajectory; a bunch of these fibers followed the normal path until the basal plate. At that point, they bended caudally toward caudal positions. The dotted line in A indicates the section plane in C–F. Coronal sections of a E16.5 wild type (C,D) and *Ntn1*<sup>-/-</sup> (E,F) labeled for TH and DCC. In the mutant, the SNc presented an abnormal distribution, and the mHb fr was defasciculated and occupied a dorsal position. Abbreviations: mHb fr, medial habenular axons of the fasciculus retroflexus; SNc, substantia nigra pars compacta. Scale bar: 200  $\mu$ m.

simplify these complex trajectories, the axons may use different intermediate targets to reach their destination. Then, a long and complex trajectory is the result of shorter and simpler individual steps (Bielle and Garel, 2013).

The navigating axons find specific cues located at decision points where the direction of growth is determined. The correct distribution, in time and space, of these guidance cues is essential for the correct wiring of the axonal systems. In the case of the fr, we reinterpreted its trajectory in the context of the prosomeric model paradigm. This interpretation allowed us to describe a key decision point: the arrival to the p2 basal plate where the axons bend caudally by navigating longitudinally until its final targets (Moreno-Bravo et al., 2016). Following this interpretation, we selected the SNc and VTA as candidate territories to control this decision point.

The fr is highly related with the SNc. In fact, the SNc is a direct target of the IHb axons. The mHb axons navigate longitudinally in contact with the pial surface underneath this neuronal population. It is known that this relation is reciprocal; the IHb axons are necessary for the correct navigation of the dopaminergic mesohabenular projection, a SNc axonal tract to the IHb (Schmidt et al., 2014).

## SNc and VTA Direct the mHb Axons

An important datum that supported our selection is the birth timing of the SNc and VTA, from E11.5 onward (Abeliovich and

Hammond, 2007). This event occurs simultaneously with the fr caudal bending (Moreno-Bravo et al., 2016).

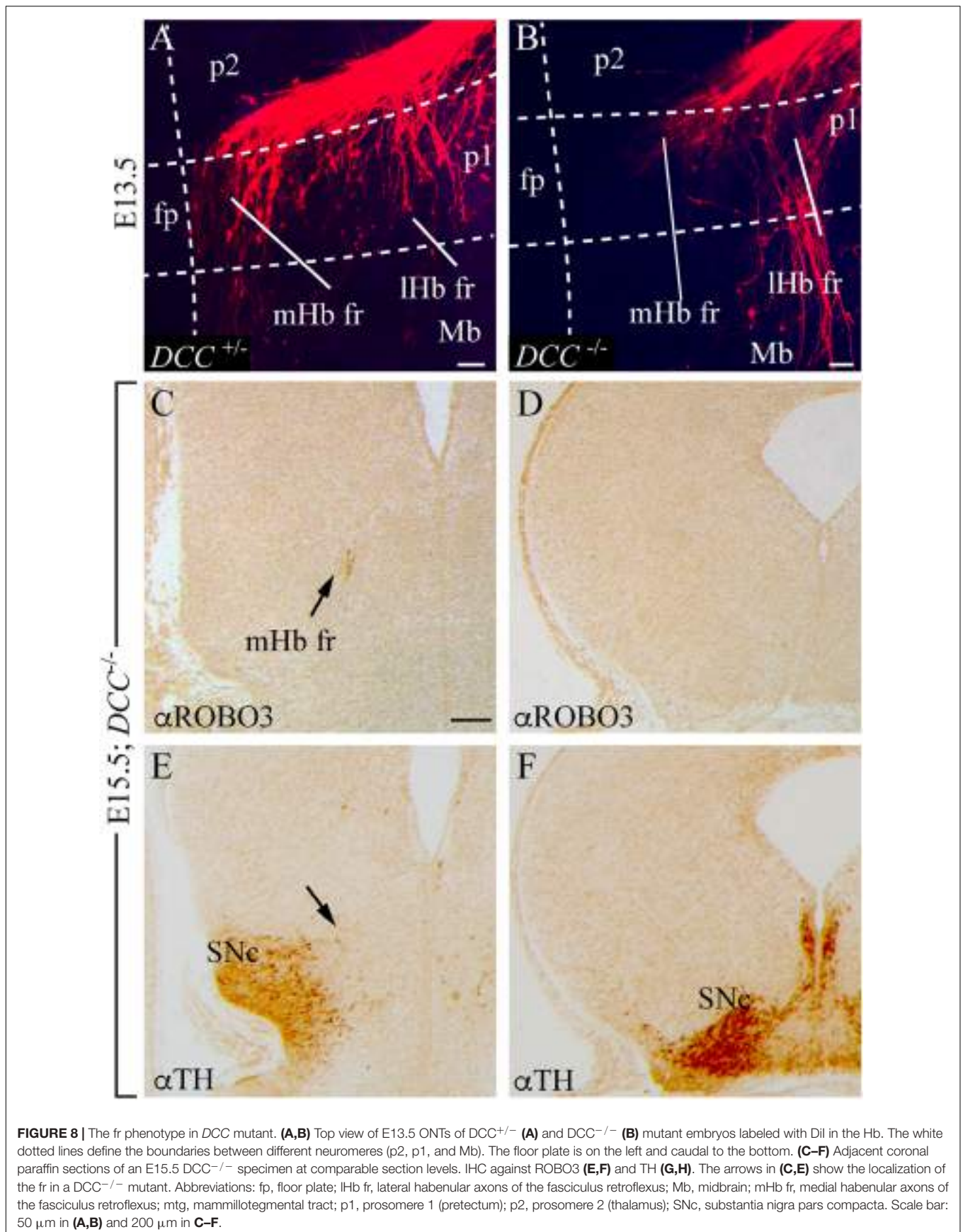
First of all, we demonstrated *in vitro* the role of SNc and VTA in directing the mHb axons. Ectopic SNc explants placed in ONTs were able to redirect the tract and force the rostral bending of the mHb axons.

The mHb axons specifically express the DCC receptor (Quina et al., 2009; Schmidt et al., 2014); it has been proposed that this receptor is involved in the initial dorsoventral trajectory of the fr tract (Funato et al., 2000). Thus, we decided to test if this receptor was also involved in the SNc and VTA signaling in our *in vitro* system; the blockage of the receptor with the AF5 antibody prevented the redirection of the mHb axons by the ectopic SNc. This preliminary result prompted us to check the role of *Ntn1*, the specific attractive ligand of DCC (Keino-Masu et al., 1996).

## *Ntn1*–DCC Mechanism Has a Complex Role in the Guidance of mHb

The *Ntn1* expression pattern analysis shows a precise and interesting presence along the territories crossed by the tract. *Ntn1* is distributed homogeneously in the ventricular layer of the floor plate all along the neural tube. We also detected a strong expression in the mantle layer of the diencephalon and mesencephalon coincident with the SNc and VTA location. The presence of this *Ntn1*-positive population generates a strong caudal source of attractive signal for the mHb axons. Furthermore, this *Ntn1* expression in the SNc and VTA and the





normal distribution of dopaminergic neurons generate a more abundant presence in the caudal part of this population. The summation of these two effects must be responsible for the caudal bending of the tract.

Netrin 1 is an extracellular matrix protein involved in cell adhesion, and its role as a diffusible cue is in doubt (Dominici et al., 2017; Varadarajan et al., 2017). In the hindbrain, NTN1 in the floor plate is not sufficient to attract commissural axons; the presence of NTN1 in the basal ventricular layer is necessary for their correct axonal guidance (Moreno-Bravo et al., 2019). We could extrapolate that the NTN1 presence in postmitotic dopaminergic neurons of the SNc and VTA in the mesodiencephalon is necessary, as an intermediate target, for the fr. Once it reaches the diencephalic floor plate, the NTN1 source from the SNc and VTA attracts the mHb axons caudally.

Recently, it has been indicated (Dominici et al., 2017; Varadarajan et al., 2017; Moreno-Bravo et al., 2019; Brignani et al., 2020) that the NTN1 protein can be located in axonal projections or concentrated in the pial surface and not in the area of the soma of the *Ntn1*-expressing neurons. The NTN1 presence in the mesodiencephalic dopaminergic neurons has been recently demonstrated in adult brains, and we have proved it during development (Dominici et al., 2017; Jasmin et al., 2020). Nevertheless, other authors have also described the NTN1 production by dopaminergic neurons of the developing SNc and VTA (Livesey and Hunt, 1997; Li et al., 2014; Brignani et al., 2020). Furthermore, in the Netrin1bGal hypomorph (Serafini et al., 1996), the mutant allele generates a fusion protein between NTN1 and BGAL. This fusion protein is trapped in endosomes, and it is not secreted (Serafini et al., 1996; Dominici et al., 2017). Ventricular and floor plate cells that express *Ntn1* are positive for the fused protein (Figures 1D,E in Dominici et al., 2017).

Netrin 1 produced by the floor plate participates in chemotaxis actions, attracting axons. Meanwhile, NTN1 produced by the ventricular layer is involved in haptotaxis processes, directing axons by close-contact interactions (Dominici et al., 2017; Varadarajan et al., 2017; Moreno-Bravo et al., 2019; Wu et al., 2019). The fact that SNc and VTA are floor plate derivatives (Joksimovic et al., 2009) postulates their NTN1 as a chemotactic effector as we demonstrated in our ectopic transplants in ONTs. The mHb fr axons were strongly derailed by the presence of the ectopic source.

The location of ectopic SNc in our *in vitro* experiments must have remodeled the existing *Ntn1* location and produced the redirection observed. To prove the direct role of *Ntn1*, we placed *Ntn1*-expressing cells in the ONTs. They were able to mimic the phenomenon observed, and therefore, *Ntn1* is necessary and sufficient to direct the mHb axons along the longitudinal axis.

Once we proved *in vitro* the *Ntn1*-DCC interaction in the mHb axons, we decided to confirm *in vivo* the results obtained. We analyzed *Ntn1* and DCC loss-of-function mice strains. First of all, we were puzzled by the fact that we found some mHb axons navigating ventrally from the Hb into the p2 basal plate, a phenomenon also observed by Schmidt et al. (2014). This behavior could be due to the fact that the thalamic and pretectal

alar plates are impermissible to the Hb axon entrance by the interactions of Nrp2, Sema3F, and Sema5a, among others (Funato et al., 2000; Sahay et al., 2003; Kantor et al., 2004). Therefore, the ventral growth of the Hb axons is not only toward the repulsive direction. Nevertheless, it was postulated by Funato et al. (2000) that *Ntn1*-DCC is the attractive mechanism responsible for the initial dorsoventral trajectory of the mHb axons, but this mechanism is not common for all mHb axons.

In the *Ntn1* mutant, a small number of axons are directed in bizarre directions, even parallel to the pretectal roof plate (as observed by Belle et al., 2014). The main tract is able to move ventrally, but it turns caudally as soon as the axons enter in the diencephalic basal plate far away from the floor plate. In the DCC mutant, the phenotype is even stronger; the vast majority of fr axons remain stalled as soon as they enter the thalamic basal plate. Only a few axons are able to turn caudally in an ectopic position (Belle et al., 2014).

It is interesting to discuss that the DCC-positive mHb axons are attracted by the *Ntn1*-positive SNc and VTA but are not able to penetrate in its territory. Meanwhile, DCC-negative lHb axons are able to innervate the SNc neurons. This fact must be due to the presence of close-contact inhibitory signals for the mHb axons that do not affect the lHb fibers. We cannot discard the presence of additional attractive signals for the lHb axons.

To summarize, the role of SNc and VTA as intermediate targets is to orchestrate the accurate *Ntn1* location. This distribution, in the correct temporospatial moment, generates the necessary signal for the caudal bending of the DCC-expressing fr mHb axons. Future experiments will be needed to unveil the mechanisms involved in the mHb axon arrival to the r1 and their characteristic crisscross of the floor plate as they innervate the IP nucleus. It is important to underline that the understanding of the developing processes needed for the correct wiring of the limbic system will allow us to detect possible alterations in human brains. Small alterations in this connectivity could account for the symptoms observed in mental diseases associated with the Hb complex.

## DATA AVAILABILITY STATEMENT

The raw data supporting the conclusions of this article will be made available by the authors, without undue reservation.

## ETHICS STATEMENT

The animal study was reviewed and approved by the Universidad Miguel Hernández OIR Committee (2016/VSC/PEA/00190).

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

All authors had full access to all the data in the study and take responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data analysis. JM-B, SM, DE, and EP conceived and designed the experiments. VC, JM-B, AA-C, MM, BA, and FA-G performed

the experiments. JM-B, DE, and EP analyzed the data. JM-B and EP wrote the article. SM, EP, DE, GL-B, and AC obtained funding.

## FUNDING

This work was supported by MINECO/AEI/FEDER (BFU2013-48230) to EP and DE; MINECO/AEI/FEDER (SAF2017-83702-R), GVA (PROMETEO/2018/041), ISCIII (“RD16/001/0010”), co-funded by ERDF/ESF, “Investing in your future,” and FTPGB (FTPGB18/SM) to SM; MECD (FPU16/03853) to VC; Spanish Ministry of Science, Innovation and Universities (RYC2018-023868-I) to JM-B; and Spanish Ministry of Science, Innovation and Universities PGC2018/096631-B-I00 to GL-B. The Institute of Neurosciences is a “Centre of Excellence Severo Ochoa.”

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank O. Reiner for providing the *Ntn1* probe, M. Tessier-Lavigne for providing the *Ntn1* functional construct, and A. Nieto

for the PCX-GFP-expressing vector. We are also grateful to E. Domiguez for statistical advice.

## SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcell.2021.682067/full#supplementary-material>

**Supplementary Video 1** | Video generated by Imaris of a E16.5 wild-type brain with fluorescent IHC for TH (white) and Robo3 (magenta) by the iDISCO protocol. The arrow indicates the caudal bending of the fr trajectory. Abbreviations: Hb, habenula; Lc, locus coeruleus; mHb fr, medial habenula fasciculus retroflexus; ob, olfactory bulb; SNC, substantia nigra pars compacta; VTA, ventral tegmental area.

**Supplementary Video 2** | Video generated by Imaris of a E16.5 *Glil2<sup>-/-</sup>* brain with fluorescent IHC for TH (white) and Robo3 (magenta) by the iDISCO protocol. The arrow indicates the rostral abnormal bending of the fr trajectory in this mutant. Abbreviations: Hb, habenula; Lc, locus coeruleus; mHb fr, medial habenula fasciculus retroflexus; ob, olfactory bulb.

## REFERENCES

- Abeliovich, A., and Hammond, R. (2007). Midbrain dopamine neuron differentiation: factors and fates. *Dev. Biol.* 304, 447–454. doi: 10.1016/j.ydbio.2007.01.032
- Agetsuma, M., Aizawa, H., Aoki, T., Nakayama, R., Takahoko, M., Goto, M., et al. (2010). The habenula is crucial for experience-dependent modification of fear responses in zebrafish. *Nat. Neurosci.* 13, 1354–1356. doi: 10.1038/nn.2654
- Amo, R., Fredes, F., Kinoshita, M., Aoki, R., Aizawa, H., Agetsuma, M., et al. (2014). The habenulo-raphé serotonergic circuit encodes an aversive expectation value essential for adaptive active avoidance of danger. *Neuron* 84, 1034–1048. doi: 10.1016/j.neuron.2014.10.035
- Andres, K. H., von Düring, M., and Veh, R. W. (1999). Subnuclear organization of the rat habenular complexes. *J. Comp. Neurol.* 407, 130–150. doi: 10.1002/(sici)1096-9861(19990428)407:1<130::aid-cne10>3.0.co;2-8
- Araki, M., McGeer, P. L., and Kimura, H. (1988). The efferent projections of the rat lateral habenular nucleus revealed by the PHA-L anterograde tracing method. *Brain Res.* 441, 319–330. doi: 10.1016/0006-8993(88)91410-2
- Batalla, A., Homberg, J. R., Lipina, T. V., Sescousse, G., Luijten, M., Ivanova, S. A., et al. (2017). The role of the habenula in the transition from reward to misery in substance use and mood disorders. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 80, 276–285. doi: 10.1016/j.neubiorev.2017.03.019
- Belle, M., Godefroy, D., Couly, G., Malone, S. A., Collier, F., Giacobini, P., et al. (2017). Tridimensional visualization and analysis of early human development. *Cell* 169, 161–173.e12. doi: 10.1016/j.cell.2017.03.008
- Belle, M., Godefroy, D., Dominić, C., Heitz-Marchaland, C., Zelina, P., Hellal, F., et al. (2014). A simple method for 3D analysis of immunolabeled axonal tracts in a transparent nervous system. *Cell Rep.* 9, 1191–1201. doi: 10.1016/j.celrep.2014.10.037
- Benarroch, E. E. (2015). Habenula: recently recognized functions and potential clinical relevance. *Neurology* 85, 992–1000. doi: 10.1212/WNL.0000000000001937
- Bennett, K. L., Bradshaw, J., Youngman, T., Rodgers, J., Greenfield, B., Aruffo, A., et al. (1997). Deleted in colorectal carcinoma (DCC) binds heparin via its fifth fibronectin type III domain. *J. Biol. Chem.* 272, 26940–26946. doi: 10.1074/jbc.272.43.26940
- Bianco, I. H., and Wilson, S. W. (2009). The habenular nuclei: a conserved asymmetric relay station in the vertebrate brain. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 364, 1005–1020. doi: 10.1098/rstb.2008.0213
- Bielle, F., and Garel, S. (2013). “Neuronal migration of guide post cells,” in *The Comprehensive Developmental Neuroscience: Cellular Migration and Formation of Neuronal Connections*, eds J. L. Rubenstein and P. Rakic (San Diego, CA: Academic Press), 457–478. doi: 10.1016/b978-0-12-397266-8.00037-5
- Braisted, J. E., Catalano, S. M., Stimac, R., Kennedy, T. E., Tessier-Lavigne, M., Shatz, C. J., et al. (2000). Netrin-1 promotes thalamic axon growth and is required for proper development of the thalamocortical projection. *J. Neurosci.* 20, 5792–5801. doi: 10.1523/jneurosci.20-15-05792.2000
- Brignani, S., Raj, D., Schmidt, E., Dündükcü, Ö., Adolfs, Y., De Ruiter, A. A., et al. (2020). Remotely produced and axon-derived netrin-1 instructs GABAergic neuron migration and dopaminergic substantia nigra development. *Neuron* 107, 684–702.e9. doi: 10.1016/j.neuron.2020.05.037
- Brinshawitz, K., Dittgen, A., Madai, V. I., Lommel, R., Geisler, S., and Veh, R. W. (2010). Glutamatergic axons from the lateral habenula mainly terminate on GABAergic neurons of the ventral midbrain. *Neuroscience* 168, 463–476. doi: 10.1016/j.neuroscience.2010.03.050
- Chédotal, A., and Richards, L. J. (2010). Wiring the brain: the biology of neuronal guidance. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2:a001917. doi: 10.1101/cshperspect.a001917
- Cherng, B. W., Islam, T., Torigoe, M., Tsuboi, T., and Okamoto, H. (2020). The dorsal lateral habenula-interpeduncular nucleus pathway is essential for left-right-dependent decision making in Zebrafish. *Cell Rep.* 32:108143. doi: 10.1016/j.celrep.2020.108143
- Contestabile, A., and Flumerfelt, B. A. (1981). Afferent connections of the interpeduncular nucleus and the topographic organization of the habenulo-interpeduncular pathway: an HRP study in the rat. *J. Comp. Neurol.* 196, 253–270. doi: 10.1002/cne.901960206
- de Ramon Francàs, G., Zuñiga, N. R., and Stoekli, E. T. (2017). The spinal cord shows the way - How axons navigate intermediate targets. *Dev. Biol.* 432, 43–52. doi: 10.1016/j.ydbio.2016.12.002
- Dominić, C., Moreno-Bravo, J. A., Puiggros, S. R., Rappeneau, Q., Rama, N., Vieugue, P., et al. (2017). Floor-plate-derived netrin-1 is dispensable for commissural axon guidance. *Nature* 545, 350–354. doi: 10.1038/nature22331
- Fakhoury, M. (2017). The habenula in psychiatric disorders: more than three decades of translational investigation. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 83, 721–735. doi: 10.1016/j.neubiorev.2017.02.010
- Fakhoury, M. (2018). The dorsal diencephalic conduction system in reward processing: spotlight on the anatomy and functions of the habenular complex. *Behav. Brain Res.* 348, 115–126. doi: 10.1016/j.bbr.2018.04.018
- Fakhoury, M., Rompré, P. P., and Boye, S. M. (2016). Role of the dorsal diencephalic conduction system in the brain reward circuitry. *Behav. Brain Res.* 296, 431–441. doi: 10.1016/j.bbr.2015.10.038



- Fazeli, A., Dickinson, S. L., Hermiston, M. L., Tighe, R. V., Steen, R. G., Small, C. G., et al. (1997). Phenotype of mice lacking functional Deleted in colorectal cancer (Dcc) gene. *Nature* 386, 796–804. doi: 10.1038/386796a0
- Funato, H., Saito-Nakazato, Y., and Takahashi, H. (2000). Axonal growth from the habenular nucleus along the neuromere boundary region of the diencephalon is regulated by semaphorin 3F and netrin-1. *Mol. Cell. Neurosci.* 16, 206–220. doi: 10.1006/mcne.2000.0870
- Garel, S., and López-Bendito, G. (2014). Inputs from the thalamocortical system on axon pathfinding mechanisms. *Curr. Opin. Neurobiol.* 27, 143–150. doi: 10.1016/j.conb.2014.03.013
- Gifuni, A. J., Jozaghi, S., Gauthier-Lamer, A. C., and Boye, S. M. (2012). Lesions of the lateral habenula dissociate the reward-enhancing and locomotor-stimulant effects of amphetamine. *Neuropharmacology* 63, 945–957. doi: 10.1016/j.neuropharm.2012.07.032
- Guglielmi, L., Bühler, A., Moro, E., Argenton, F., Poggi, L., and Carl, M. (2020). Temporal control of Wnt signaling is required for habenular neuron diversity and brain asymmetry. *Development (Cambridge, England)* 147:dev182865. doi: 10.1242/dev.182865
- Herkenham, M., and Nauta, W. J. (1979). Efferent connections of the habenular nuclei in the rat. *J. Comp. Neurol.* 187, 19–47. doi: 10.1002/cne.90187010
- Hikosaka, O. (2010). The habenula: from stress evasion to value-based decision-making. *Nat. Rev. Neurosci.* 11, 503–513. doi: 10.1038/nrn2866
- Hikosaka, O., Sesack, S. R., Lecourtier, L., and Shepard, P. D. (2008). Habenula: crossroad between the basal ganglia and the limbic system. *J. Neurosci.* 28, 11825–11829. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3463-08.2008
- Hong, S., and Hikosaka, O. (2008). The globus pallidus sends reward-related signals to the lateral habenula. *Neuron* 60, 720–729. doi: 10.1016/j.neuron.2008.09.035
- Ichijo, H., and Toyama, T. (2015). Axons from the medial habenular nucleus are topographically sorted in the fasciculus retroflexus. *Anat. Sci. Int.* 90, 229–234. doi: 10.1007/s12565-014-0252-z
- Jasmin, M., Ahn, E. H., Voutilainen, M. H., Fombonne, J., Guix, C., Viljakainen, T., et al. (2020). Netrin-1 and its receptor DCC modulate survival and death of dopamine neurons and Parkinson's disease features. *EMBO J.* 40:e105537. doi: 10.15252/embj.2020105537
- Jesuthasan, S. (2012). Fear, anxiety, and control in the zebrafish. *Dev. Neurobiol.* 72, 395–403. doi: 10.1002/dneu.20873
- Joksimovic, M., Anderregg, A., Roy, A., Campochiaro, L., Yun, B., Kittappa, R., et al. (2009). Spatiotemporally separable Shh domains in the midbrain define distinct dopaminergic progenitor pools. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 19185–19190. doi: 10.1073/pnas.0904285106
- Kantor, D. B., Chivatakarn, O., Peer, K. L., Oster, S. F., Inatani, M., Hansen, M. J., et al. (2004). Semaphorin 5A is a bifunctional axon guidance cue regulated by heparan and chondroitin sulfate proteoglycans. *Neuron* 44, 961–975. doi: 10.1016/j.neuron.2004.12.002
- Keino-Masu, K., Masu, M., Hinck, L., Leonardo, E. D., Chan, S. S., Culotti, J. G., et al. (1996). Deleted in colorectal cancer (DCC) encodes a netrin receptor. *Cell* 87, 175–185. doi: 10.1016/s0092-8674(00)81336-7
- Klemm, W. R. (2004). Habenular and interpeduncular nuclei: shared components in multiple-function networks. *Med. Sci. Monit.* 10, RA261–RA273.
- Kolodkin, A. L., and Tessier-Lavigne, M. (2011). Mechanisms and molecules of neuronal wiring: a primer. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 3:a001727. doi: 10.1101/cshperspect.a001727
- Koppensteiner, P., Galvin, C., and Ninan, I. (2016). Development- and experience-dependent plasticity in the dorsomedial habenula. *Mol. Cell. Neurosci.* 77, 105–112. doi: 10.1016/j.mcn.2016.10.006
- Kuan, Y. S., Yu, H. H., Moens, C. B., and Halpern, M. E. (2007). Neuropilin asymmetry mediates a left-right difference in habenular connectivity. *Development (Cambridge, England)* 134, 857–865. doi: 10.1242/dev.02791
- Lecourtier, L., and Kelly, P. H. (2005). Bilateral lesions of the habenula induce attentional disturbances in rats. *Neuropsychopharmacology* 30, 484–496. doi: 10.1038/sj.npp.1300595
- Lecourtier, L., and Kelly, P. H. (2007). A conductor hidden in the orchestra? Role of the habenular complex in monoamine transmission and cognition. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 31, 658–672. doi: 10.1016/j.neubiorev.2007.01.004
- Lee, A., Mathuru, A. S., Teh, C., Kibat, C., Korzh, V., Penney, T. B., et al. (2010). The habenula prevents helpless behavior in larval zebrafish. *Curr. Biol. CB* 20, 2211–2216. doi: 10.1016/j.cub.2010.11.025
- Li, J., Duarte, T., Kocabas, A., Works, M., McConnell, S. K., and Hynes, M. A. (2014). Evidence for topographic guidance of dopaminergic axons by differential Netrin-1 expression in the striatum. *Mol. Cell. Neurosci.* 61, 85–96. doi: 10.1016/j.mcn.2014.05.003
- Li, J., Fan, R., Liu, X., Shen, X., Liu, X., and Zhao, H. (2021). The convergence of aversion and reward signals in individual neurons of the mice lateral habenula. *Exp. Neurol.* 339:113637. doi: 10.1016/j.expneurol.2021.113637
- Livesey, F. J., and Hunt, S. P. (1997). Netrin and netrin receptor expression in the embryonic mammalian nervous system suggests roles in retinal, striatal, nigral, and cerebellar development. *Mol. Cell. Neurosci.* 8, 417–429. doi: 10.1006/mcne.1997.0598
- Mathuru, A. S., and Jesuthasan, S. (2013). The medial habenula as a regulator of anxiety in adult zebrafish. *Front. Neural Circ.* 7:99. doi: 10.3389/fncir.2013.00099
- Matise, M. P., Epstein, D. J., Park, H. L., Platt, K. A., and Joyner, A. L. (1998). Gli2 is required for induction of floor plate and adjacent cells, but not most ventral neurons in the mouse central nervous system. *Development* 125, 2759–2770. doi: 10.1242/dev.125.15.2759
- Matsumoto, M., and Hikosaka, O. (2007). Lateral habenula as a source of negative reward signals in dopamine neurons. *Nature* 447:1111. doi: 10.1038/nature05860
- Matsumoto, M., and Hikosaka, O. (2009). Representation of negative motivational value in the primate lateral habenula. *Nat. Neurosci.* 12:77. doi: 10.1038/nn.2233
- Mo, R., Freer, A. M., Zinyk, D. L., Crackower, M. A., Michaud, J., Heng, H. H., et al. (1997). Specific and redundant functions of Gli2 and Gli3 zinc finger genes in skeletal patterning and development. *Development (Cambridge, England)* 124, 113–123. doi: 10.1242/dev.124.1.113
- Moreno-Bravo, J. A., Martinez-Lopez, J. E., Madrigal, M. P., Kim, M., Mastick, G. S., Lopez-Bendito, G., et al. (2016). Developmental guidance of the retroflex tract at its bending point involves Robo1-Slit2-mediated floor plate repulsion. *Brain Struct. Funct.* 221, 665–678. doi: 10.1007/s00429-014-0932-4
- Moreno-Bravo, J. A., Perez-Balaguer, A., Martinez-Lopez, J. E., Aroca, P., Puelles, L., Martinez, S., et al. (2014). Role of Shh in the development of molecularly characterized tegmental nuclei in mouse rhombomere 1. *Brain Struct. Funct.* 219, 777–792. doi: 10.1007/s00429-013-0534-6
- Moreno-Bravo, J. A., Roig Puiggros, S., Mehlen, P., and Chédotal, A. (2019). Synergistic activity of floor-plate- and ventricular-zone-derived netrin-1 in spinal cord commissural axon guidance. *Neuron* 101, 625–634.e3. doi: 10.1016/j.neuron.2018.12.024
- Morisette, M. C., and Boye, S. M. (2008). Electrolytic lesions of the habenula attenuate brain stimulation reward. *Behav. Brain Res.* 187, 17–26. doi: 10.1016/j.bbr.2007.08.021
- Nakajo, H., Tsuboi, T., and Okamoto, H. (2020). The behavioral paradigm to induce repeated social defeats in zebrafish. *Neurosci. Res.* 161, 24–32. doi: 10.1016/j.neures.2019.11.004
- Okamoto, H., Agetsuma, M., and Aizawa, H. (2012). Genetic dissection of the zebrafish habenula, a possible switching board for selection of behavioral strategy to cope with fear and anxiety. *Dev. Neurobiol.* 72, 386–394. doi: 10.1002/dneu.20913
- Okamoto, H., Cherng, B. W., Nakajo, H., Chou, M. Y., and Kinoshita, M. (2021). Habenula as the experience-dependent controlling switchboard of behavior and attention in social conflict and learning. *Curr. Opin. Neurobiol.* 68, 36–43. Advance online publication. doi: 10.1016/j.conb.2020.12.005
- Otsu, Y., Lecca, S., Pietrajtis, K., Rousseau, C. V., Marcaggi, P., Dugué, G. P., et al. (2018). Functional principles of posterior septal inputs to the medial habenula. *Cell Rep.* 22, 693–705. doi: 10.1016/j.celrep.2017.12.064
- Quina, L. A., Wang, S., Ng, L., and Turner, E. E. (2009). Brn3a and Nurr1 mediate a gene regulatory pathway for habenula development. *J. Neurosci.* 29, 14309–14322. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2837-05.2005
- Sahay, A., Molliver, M. E., Ginty, D. D., and Kolodkin, A. L. (2003). Semaphorin 3F is critical for development of limbic system circuitry and is required in neurons for selective CNS axon guidance events. *J. Neurosci.* 23, 6671–6680.

- Salas, R., Baldwin, P., de Biasi, M., and Montague, P. R. (2010). BOLD responses to negative reward prediction errors in human habenula. *Front. Hum. Neurosci.* 4:36. doi: 10.3389/fnhum.2010.00036
- Schmidt, E. R. E., Brignani, S., Adolfs, Y., Lemstra, S., Demmers, J., Vidaki, M., et al. (2014). Subdomain-mediated axon-axon signaling and chemoattraction cooperate to regulate afferent innervation of the lateral habenula. *Neuron* 83, 372–387. doi: 10.1016/j.neuron.2014.05.036
- Serafini, T., Colamarino, S. A., Leonardo, E. D., Wang, H., Beddington, R., Skarnes, W. C., et al. (1996). Netrin-1 is required for commissural axon guidance in the developing vertebrate nervous system. *Cell* 87, 1001–1014. doi: 10.1016/s0092-8674(00)81795-x
- Shibata, H., and Suzuki, T. (1984). Efferent projections of the interpeduncular complex in the rat, with special reference to its subnuclei: a retrograde horseradish peroxidase study. *Brain Res.* 296, 345–349. doi: 10.1016/0006-8993(84)90071-4
- Smits, S. M., Burbach, J. P., and Smidt, M. P. (2006). Developmental origin and fate of meso-diencephalic dopamine neurons. *Progress Neurobiol.* 78, 1–16. doi: 10.1016/j.pneurobio.2005.12.003
- Squarzoni, P., Thion, M. S., and Garel, S. (2015). Neuronal and microglial regulators of cortical wiring: usual and novel guideposts. *Front. Neurosci.* 9:248. doi: 10.3389/fnins.2015.00248
- Varadarajan, S. G., Kong, J. H., Phan, K. D., Kao, T. J., Panaitof, S. C., Cardin, J., et al. (2017). Netrin1 produced by neural progenitors, not floor plate cells, is required for axon guidance in the spinal cord. *Neuron* 94, P790–P799. doi: 10.1016/j.neuron.2017.03.007
- Vickstrom, C. R., Liu, X., Liu, S., Hu, M.-M., Mu, L., Hu, Y., et al. (2020). Role of endocannabinoid signaling in a septohabenular pathway in the regulation of anxiety- and depressive-like behavior. *Mol. Psychiatry* doi: 10.1038/s41380-020-00905-1
- Wagner, F., French, L., and Veh, R. W. (2016). Transcriptomic-anatomic analysis of the mouse habenula uncovers a high molecular heterogeneity among neurons in the lateral complex, while gene expression in the medial complex largely obeys subnuclear boundaries. *Brain Struct. Funct.* 221, 39–58. doi: 10.1007/s00429-014-0891-9
- Wang, D., Li, Y., Feng, Q., Guo, Q., Zhou, J., and Luo, M. (2017). Learning shapes the aversion and reward responses of lateral habenula neurons. *ELife* 6:e23045. doi: 10.7554/eLife.23045
- Wang, R. Y., and Aghajanian, G. K. (1977). Physiological evidence for habenula as major link between forebrain and midbrain raphe. *Science* 197, 89–91. doi: 10.1126/science.194312
- Wu, Z., Makihara, S., Yam, P. T., Teo, S., Renier, N., Balekoglu, N., et al. (2019). Long-Range guidance of spinal commissural axons by Netrin1 and sonic hedgehog from midline floor plate cells. *Neuron* 101, 635–647.e4. doi: 10.1016/j.neuron.2018.12.025

**Conflict of Interest:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2021 Company, Andreu-Cervera, Madrigal, Andrés, Almagro-García, Chédotal, López-Bendito, Martínez, Echevarría, Moreno-Bravo and Puelles. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

## **Anexo 1B:**

### **Rol de Wnt1 en el desarrollo de la Habénula y el fascículo retroflejo.**

### **Wnt1 role in the development of the Habenula and the fasciculus retroflexus.**

Verónica Company\*, Ana Moreno-Cerdá\*, Abraham Andreu-Cervera, Raquel Murcia-Ramón, Francisca Almagro-García, Diego Echevarría, Salvador Martínez, Eduardo Puelles.

Instituto de Neurociencias de Alicante, Universidad Miguel Hernández-CSIC, Alicante, Spain.

\* These authors have contributed equally to this work.

Front. Cell Dev. Biol. 2021. 9:755729. doi: 10.3389/fcell.2021.755729

The article presented here contain supplementary movies that are available online in this link:

<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcell.2021.755729/full#supplementary-material>







# *Wnt1* Role in the Development of the Habenula and the Fasciculus Retroflexus

Verónica Company<sup>†</sup>, Ana Moreno-Cerdá<sup>†</sup>, Abraham Andreu-Cervera,  
Raquel Murcia-Ramón, Francisca Almagro-García, Diego Echevarría, Salvador Martínez  
and Eduardo Puelles\*

Instituto de Neurociencias de Alicante, Universidad Miguel Hernández-CSIC, Sant Joan d'Alacant, Spain

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Dorothea Schulte,  
University Hospital Frankfurt,  
Germany

### Reviewed by:

Andrea Wizenmann,  
University of Tübingen, Germany  
Claude Brodski,  
Ben-Gurion University of the Negev,  
Israel

### \*Correspondence:

Eduardo Puelles  
epuelles@umh.es  
orcid.org/0000-0002-0560-9240

<sup>†</sup>These authors have contributed  
equally to this work

### Specialty section:

This article was submitted to  
Morphogenesis and Patterning,  
a section of the journal  
Frontiers in Cell and Developmental  
Biology

**Received:** 09 August 2021

**Accepted:** 21 September 2021

**Published:** 14 October 2021

### Citation:

Company V, Moreno-Cerdá A,  
Andreu-Cervera A, Murcia-Ramón R,  
Almagro-García F, Echevarría D,  
Martínez S and Puelles E (2021) *Wnt1*  
Role in the Development of the  
Habenula and the Fasciculus  
Retroflexus.  
*Front. Cell Dev. Biol.* 9:755729.  
doi: 10.3389/fcell.2021.755729

*Wnt1* is one of the morphogenes that controls the specification and differentiation of neuronal populations in the developing central nervous system. The habenula is a diencephalic neuronal complex located in the most dorsal aspect of the thalamic prosomere. This diencephalic neuronal population is involved in the limbic system and its malfunction is related with several psychiatric disorders. Our aim is to elucidate the *Wnt1* role in the habenula and its main efferent tract, the fasciculus retroflexus, development. In order to achieve these objectives, we analyzed these structures development in a *Wnt1* lack of function mouse model. The habenula was generated in our model, but it presented an enlarged volume. This alteration was due to an increment in habenular neuroblasts proliferation rate. The fasciculus retroflexus also presented a wider and disorganized distribution and a disturbed final trajectory toward its target. The mid-hindbrain territories that the tract must cross were miss-differentiated in our model. The specification of the habenula is *Wnt1* independent. Nevertheless, it controls its precursors proliferation rate. *Wnt1* expressed in the isthmic organizer is vital to induce the midbrain and rostral hindbrain territories. The alteration of these areas is responsible for the fasciculus retroflexus axons misroute.

**Keywords:** *Wnt1*, habenula, fasciculus retroflexus, proliferation, differentiation

## INTRODUCTION

The habenula (Hb) is a phylogenetically conserved bilateral nucleus (Aizawa et al., 2011; Schmidt and Pasterkamp, 2017; Zahm and Root, 2017). This structure is at the most dorsal part of the diencephalic thalamic prosomere (p2; Puelles, 2019), and together with the pineal gland and the stria medullaris (sm) comprises the epithalamus (Hikosaka, 2010; Schmidt and Pasterkamp, 2017; Zahm and Root, 2017). The Hb is divided into the medial habenula (mHb) and the lateral habenula (lHb) that differ among them in their connectivity, neurochemical characteristics, and related functions (Andres et al., 1999; Schmidt and Pasterkamp, 2017; Zahm and Root, 2017; Roman et al., 2020). The lHb is the larger one in surface but the lower in neuronal density (Hashikawa et al., 2020; Wallace et al., 2020). This original subdivision has been further subdivided into different subpopulations defined by transcriptomics. Thus, the lHb is divided into nine differential subpopulations and the mHb into six subpopulations plus an intermediate subpopulation named

HbX (Wagner et al., 2016). These subdivisions have been simplified but corroborated by single cell RNAseq experiments (Pandey et al., 2018; Hashikawa et al., 2020; Wallace et al., 2020).

The vertebrate Hb is one of the components of the dorsal diencephalic conduction system, a highly conserved limbic pathway that links the forebrain with the monoaminergic system (Sutherland, 1982; Zahm and Root, 2017; Fakhoury, 2018; Roman et al., 2020). This system originates in the forebrain, projects through the sm to the Hb complex that projects to the interpeduncular nucleus (Ip) in the hindbrain and monoaminergic nuclei in the midbrain, mainly through the fasciculus retroflexus (fr), the main Hb efference (Zahm and Root, 2017). This tract develops following a complex trajectory (Moreno-Bravo et al., 2016). Due to its projections toward these mesencephalic monoaminergic nuclei, the Hb has a role in their functional regulation (Schmidt and Pasterkamp, 2017; Zahm and Root, 2017). This fact implies the Hb in behaviors such as learning, social behavior, value-based decision making or avoidance of negative stimuli (Okamoto et al., 2012, 2021; Amo et al., 2014; Koppensteiner et al., 2016; Schmidt and Pasterkamp, 2017; Loonen and Ivanova, 2019; Cherng et al., 2020; Hu et al., 2020; Nakajo et al., 2020). It is also involved in mechanisms related to pain modulation, fear and anxiety, helpless behavior, mood disorder and drug addiction (Agetsuma et al., 2010; Lee et al., 2010; Jesuthasan, 2012; Okamoto et al., 2012; Mathuru and Jesuthasan, 2013; Batalla et al., 2017; Mathuru, 2018; Roman et al., 2020). Finally, it is also implicated in some psychiatric disorders including major depression or schizophrenia, as well as some neurological disorders like Parkinson's disease (Hikosaka, 2010; Nakajima et al., 2013; Benarroch, 2015; Schmidt and Pasterkamp, 2017; Hu et al., 2020).

The Hb receives inputs from limbic forebrain areas as the septum, basal ganglia and hypothalamus among others through the sm. Once these inputs are integrated in the Hb, efferent fibers project through the fr. This tract consists of two regions, a core of mHb axons and a shell of fibers from the lHb (Roman et al., 2020). The core innervates the Ip nucleus after crossing the floor plate several times (Ramón y Cajal, 1909; Contestabile and Flumerfelt, 1981; Klemm, 2004). Finally, lHb axons innervate monoaminergic areas, the rostromedial tegmental nucleus, the substantia nigra pars compacta (SNc), and the ventral tegmental area (VTA) in the midbrain involved in the release of dopamine (Jhou et al., 2009). Meanwhile, axons from the Ip nucleus project to the median and dorsal raphe nuclei, involved in the release of serotonin. This tract also has ascending projections from SNc toward the lHb (Hikosaka, 2010; Schmidt et al., 2014; Fakhoury, 2018). These data demonstrate that the Hb is an information relay station between the forebrain and the midbrain and hindbrain (Bianco and Wilson, 2009; Schmidt and Pasterkamp, 2017; Fore et al., 2018; Grillner et al., 2018; Loonen and Ivanova, 2019) and it is involved in the modulation of catecholaminergic system (Hikosaka et al., 2008; Hikosaka, 2010).

Complex molecular programs control the morphogenesis and the wiring of the developing Hb (Schmidt and Pasterkamp, 2017). The Hb anlage derives in vertebrates from the alar plate of p2 (Martinez-Ferre and Martinez, 2012; Beretta et al., 2013), a domain defined by the expression of specific

transcription factors. Three families of morphogenes confluence in this Hb primordium for its specification, differentiation and proliferation: Fibroblast growth factors (Fgfs), bone morphogenetic proteins (Bmps), and wingless-int factors (Wnts; Masai et al., 1997; Barth et al., 1999; Kazanskaya et al., 2000; Regan et al., 2009).

*Wnt* family is a group of genes that are involved in embryonic development, especially in controlling the embryonic pattern (Ciani and Salinas, 2005; Bengoa-Vergniory and Kypta, 2015; Brafman and Willert, 2017). This family is also involved in cell differentiation, polarization, migration during development and programmed cell death (Ciani and Salinas, 2005; Brafman and Willert, 2017; Taciak et al., 2018).

*Wnt* signaling acts together with other signal molecules. It is required for the induction of the midbrain-hindbrain boundary, which is an important organizing center (Ciani and Salinas, 2005; Brafman and Willert, 2017). In this case, it acts together with *Fgf8* in a regulatory network (Brafman and Willert, 2017). *Wnt1* is expressed in the dorsal part, and it is necessary for the maintenance of *Fgf8* expression. This molecule is essential for the induction of the midbrain and the cerebellum (Ciani and Salinas, 2005). Its direct role in the differentiation program of the mid-diencephalic dopaminergic neurons has been demonstrated (Prakash et al., 2006). Besides, it has been observed that *Wnt1* is responsible for the regionalization of the diencephalon being also expressed along this region until the p2/p3 boundary. In fact, in the absence of *Wnt1*, an altered diencephalic structure is observed because it is needed for a proper DV patterning (Navarro-Garberí et al., 2016). Recent studies report evidence for the requirement of the *Wnt* pathway in the development of the habenular complex (Schmidt and Pasterkamp, 2017; Roman et al., 2020). In Zebrafish, it has been demonstrated that *Wnt1* function is required for the correct specification of the dorsal Hb medial (equivalent to a subnucleus of the murine mHb; Beretta et al., 2013; Hüsken and Carl, 2013; Guglielmi et al., 2020). Moreover, the alteration of *wls*, a gene that codifies a protein necessary for WNT secretion, results in a dHb reduction and the absence of vHb (Kuan et al., 2015).

All this information prompted us to hypothesize that *Wnt1* plays a key role in the specification and differentiation of the habenular complex as well as in the formation of the fr, its main efference. In order to demonstrate this hypothesis, we studied the role of *Wnt1* in the habenular and fasciculus retroflexus embryonic development using a mouse model null for *Wnt1* compared to a wild type (wt).

## MATERIALS AND METHODS

### Mouse Strains

For staging, the day when the vaginal plug was detected was considered as embryonic day 0.5 (E0.5). All mouse manipulation and experimental procedures were performed according to the directives of the Spanish and European Union governments and the protocols were approved by the Universidad Miguel Hernández OIR Committee (2016/VSC/PEA/00190). The

*Wnt1*<sup>-/-</sup> transgenic mouse line generation and genotype were previously described in McMahon et al. (1992).

## Bromodeoxyuridine Injections

Pregnant mice were intraperitoneally injected 5  $\mu$ l/gr of body weight with Bromodeoxyuridine (BrdU; 5 mg/ml) at the desired gestational stage (E11.5-E13.5) and sacrificed 2 h later. Embryos were fixed overnight in 4% Paraformaldehyde (PFA) and washed in Phosphate Buffered Saline (PBS).

## Axonal Tracing

Brains were fixed 1 h in 4% PFA and embedded in 4% agarose in PBS. Afterward, brains were sectioned in coronal plane with a vibratome until reaching the habenular nucleus. At this point, the fluorescent crystals were placed in both habenulae: DiI (1,1'-dioctadecyl 3,3,3',3'-tetra-metilindocarbocyanine perchlorate; Molecular Probes) on one side and DiD (1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindodicarbocyanine, 4-chlorobenzenesulfonate salt; Molecular Probes) on the contralateral side. Samples were left at 37°C in 4% PFA until crystal had diffused along the retroflexus tract. Labeled brains were sectioned in the vibratome and IHC processed without detergent to avoid the signal loss.

## Immunohistochemistry and *In situ* Hybridization

Mouse embryo brains were fixed overnight in PFA in PBS. Samples were agarose-embedded and sectioned at 100  $\mu$ m in coronal or sagittal planes by vibratome or wax embedded and sectioned at 10  $\mu$ m by microtome.

For IHC, it was performed as previously described (Murcia-Ramón et al., 2020). The primary antibodies used were:  $\alpha$ TH (1:1,000; 208020234/Inst. J. BOY),  $\alpha$ NTN-1 (1:500; MAB1109/RD Systems),  $\alpha$ DCC (1:100; sc-6535/Santa Cruz),  $\alpha$ CNTN2 (1:500; AF4439/RD Systems),  $\alpha$ NFEM (1:500; AB1987/Chemicon),  $\alpha$ BrdU (1:200; M0744/Dako),  $\alpha$ CALB (1:1,000; CB-38/Swint),  $\alpha$ ROBO3 (1:300; AF3076/RD systems),  $\alpha$ SOX2 (1:500; ab97959/Abcam) and NFEM (1:1,000; Ab7794/Abcam).

For ISH, embryonic brains were washed three times for 20 min with detergent mix (1% IGEPAL, 1% SDS, 0.5% Deoxycholate, 50 mM Tris pH 8, 1 mM EDTA, 150 mM NaCl). Afterward, brains were post fixed in 4% PFA and rinsed in PBS. The next step was the pre-hybridization with hybridization buffer (50% Deionized Formamide, 5x Salt sodium citrate (SSC) pH 5.3, 50 mg/ml Heparin, 0.1% Tween 20). Hybridization chamber was prepared with the pre-hybridization mix (50% formamide, 5x SSC, 50  $\mu$ g/ml heparin, 50  $\mu$ g/ml tRNA, 50  $\mu$ g/ml ssDNA, 0.1% Tween-20) for 1 h at 65°C. Then, the Digoxigenin-labeled RNA probe (*Fgf8*, Addgene plasmid #22090) was denaturalized at 80°C and the tissue was incubated in hybridization buffer with the probe overnight at 65°C. Samples were washed 4 times for 30 min at 65°C with 2x SSC pH 5.3, 50% formamide, 1% SDS. Three additional washes of 5 min and one of 30 min were carried out with 1x MABT (MAB solution (500 mM Maleic acid, 750 mM NaCl, 0.95M NaOH pH 7.5) and 0.1% Tween-20). Next step was to incubate embryos with 2% RBR

(Roche Blocking Reagent) and MABT for 1 h. Then, brains were blocked with 2% RBR, and 20% Sheep Serum in MABT for 1 h. Then, samples were incubated in a wet chamber overnight at 4°C with an alkaline phosphatase-coupled anti-digoxigenin antibody (11207733910/Roche) prepared in the blocking solution at 1:2,000. The following day, samples were extensively washed with MABT. Then, before the color reaction, samples were washed with NTMT (100 mM NaCl, 100 mM Tris-HCl pH 9.5, 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 1% Tween20). The NBT/BCIP (Boehringer, Mannheim) was used as a chromogenic substrate to detect the probes. The alkaline phosphatase reacts with this substrate producing a solid precipitate.

## iDISCO

E18.5 fixed brains were boiled in 0.01M sodium citrate at 80°C for 8 min and dehydrated with 90 min methanol washes at increasing concentration (20, 40, 60, 80, 100%). Brains were left overnight in 100% methanol at room temperature (RT). Next day, brains were incubated overnight at 4°C in a solution consisting of 1/3 100% methanol and 2/3 DCM (dichloromethane). The following day, brains were washed twice with methanol 100% for 1 h. At this point, brains were incubated in a solution of 5% hydrogen peroxide prepared in 100% methanol overnight at 4°C. The next day, brains were rehydrated in descending methanol concentrations. After that, brains were washed twice for 1 h at RT with PTx2 (10x PBS, 2% TritonX-100) and were incubated overnight at 37°C with permeabilization solution (0.3 M glycine, 20% DMSO in PTx.2). After this time, brains were incubated overnight with blocking solution (6% donkey serum, 10% DMSO in PTx.2) at 37°C. Then, samples were incubated for 10 days at 37°C with the primary antibody solution:  $\alpha$ TH (1:1,000; N° 268020234/Institute Jacques Boy Cat),  $\alpha$ ROBO3 (1:300; AF3076/RD systems). Brains were extensively washed with PTwH (0.2% Tween 20, 0.01% heparin in 1x PBS). Afterward, samples were incubated overnight at 37°C with the secondary antibody solution prepared at 1:500 (5% DMSO and 3% Donkey serum in PTwH). This solution was previously filtered with a 0.2  $\mu$ m filter. The following day they were washed with PTwH and dehydrated with methanol. Once dehydrated, brains were incubated with a solution of 2/3 DCM and 1/3 100% methanol. Then, samples were immersed in DCM twice for 30 min and were stored in BDE (Benzyl ether) until being processed. In all the steps, the brains are kept in movement to improve the processes.

## Cresyl Violet Staining

Sections were immersed in Cresyl Violet for 3–4 min and were submerged twice in distilled water for 2–3 min. Then, samples were washed with ethanol at increasing concentration (70, 96, 100, and 100%). Finally, samples were immersed in xylol twice and covered with Eukitt Clasic Mounting Medium.

## Image Acquisition, Image Processing, and Data Analysis

Fluorescent images were acquired with confocal microscope Leica SPE II whereas bright field images were acquired with



a camera (Leica DFC500) associated with a stereomicroscope (Leica MZ16FA). 3D imaging was performed with a light-sheet fluorescence microscope (Ultramicroscope II, LaVision BioTec) and processed with Imaris software X64 9.3.0. Figures were composed with Adobe System software (CS6).

The proliferation assay was quantified by the area occupied by the red fluorophore using the measure tool of the Fiji software (ImageJ 1.53C). To do this, the image was binarized and the percentage of area occupied by white points was measured. The habenular volumes were measured with the surface tool of the Imaris software.

Statistical analysis was performed with unpaired *t*-test using GraphPad Prism 8.4.3 software.

## RESULTS

### *Wnt1*<sup>-/-</sup> Habenular General Phenotype

In order to have a first overview of the possible phenotype displayed by our mouse transgenic model, we analyzed E18.5 *Wnt1*<sup>-/-</sup> and wt brains in sagittal sections. In the wt, by cresyl violet staining, we observed the general histology of the brain. The Hb was located in the most dorsal aspect of the thalamic prosomere (Figure 1A). From its ventral tip, we detected the fr extending toward the diencephalic tegmentum before bending caudally toward its main hindbrain target, the Ip nuclei (Figure 1A; see Figure 1 in Moreno-Bravo et al., 2016).

With the aim to discern between the mHb and lHb axons, we studied the distribution of specific markers for each axonal projection. CNTN2 protein is specifically located in mHb axons (Figure 1B) and NFEM protein in lHb axons (Figure 1C). Note that NFEM distribution is slightly wider than CNTN2, this is due to the fact that mHb axons occupied the core of the fascicle meanwhile the lHb axons are located in the shell (compare Figures 1B,C). In *Wnt1*<sup>-/-</sup> brain, the Hb territory appeared wider in its anteroposterior axis and the thalamic territory displayed a clear size reduction (Figure 1D). The fr showed a slightly abnormal appearance (Figure 1D). Core and shell fr specific markers allowed us to distinguish a wider distribution of the mHb axons (arrow in Figure 1E) as well as in the case of the lHb axons (arrow in Figure 1F). Other diencephalic tracts such as the posterior commissure and the mammillothalamic and mammillotegmental tracts did not display any apparent alteration (Figures 1E,F).

### Habenular Volumes and Subnuclei Organization Analysis in *Wnt1*<sup>-/-</sup>

To confirm our first results, we analyzed ROBO3 distribution (mHb marker) by iDISCO in E18.5 brains with the aim to calculate the mHb volume in mutants compared to wt embryos. In a lateral view of the scanned brain, we were able to observe the full extension of the mHb as well as the initial fr portion (Figure 2A). In the mutant brain, the mHb displayed an abnormal and enlarged shape (Figure 2B). Also, the initial fr portion displayed a wider appearance (Figure 2B). The iDISCO scanned brains allowed us to quantitatively measure the volume

occupied by both mHb. The *Wnt1*<sup>-/-</sup> Hb volume was larger than the wt, being the difference among them statistically significant (Figure 2C; Unpaired *t*-test, *p* < 0.0001).

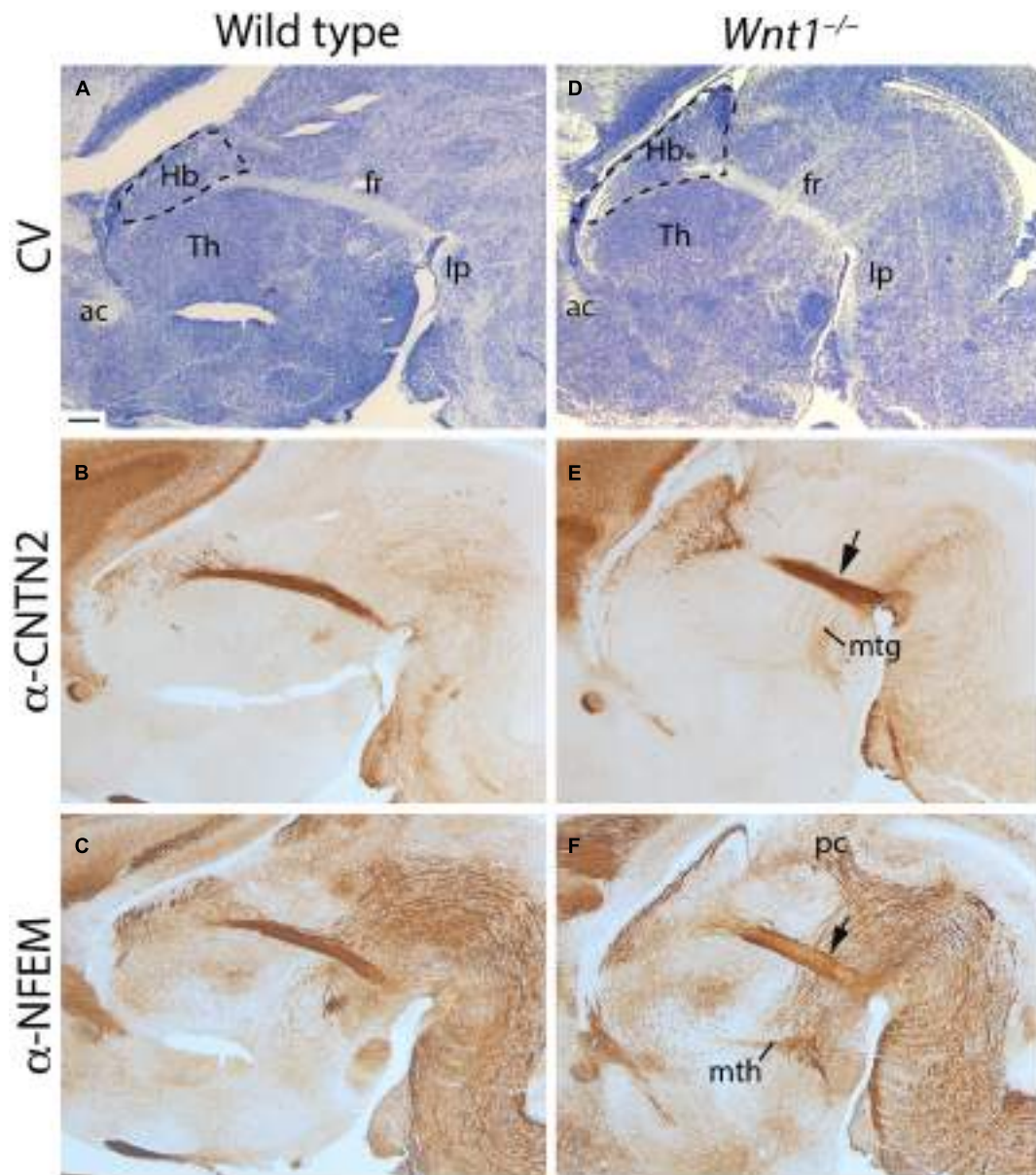
Once we demonstrated the enlargement of the habenular territory, we aimed to analyze the main subdivisions distribution in the *Wnt1*<sup>-/-</sup> Hb compared to the wt. We grouped the different subnuclei in four divisions of the habenular complex. The mHb was formed by a medial division (mHbm) and a lateral division (mHbl) and the lHb was subdivided as well in a medial division (lHbm) and a lateral division (lHbl). Then, we analyzed several markers for the different territories. The NFEM protein distribution strongly labeled the sm in both samples (Figures 3A,B). It was absent from the mHb divisions meanwhile in the lHb divisions was weakly present, no obvious difference was found between the mutant and the wt (Figures 3A,B). CALB presented a complex pattern, it was strongly located in the medial aspect of the lHbm. Meanwhile in the mHbl presented a gradient distribution pattern from dorsal to ventral. Again, we did not find any obvious alterations between mutant and wt (Figures 3C,D). DCC, marker of the mHb, was homogeneously found in the mHb divisions and a weaker distribution in the lHb divisions. Again, no differences were found between samples (Figures 3E,F). CNTN2 protein, a mHb marker, strongly labeled the mHbm but also presented a scattered distribution in the mHbl. In the lHb divisions we observed some mHb axons fasciculating the initial fr. Once again, no significant difference was observed (Figures 3G,H). Finally, we analyzed SOX2 distribution pattern which specifically labeled the periventricular layer of the mHbm, and it specifically labeled in the ventrolateral subnuclei in the mHbl division. Once again, this labeling was observed in both samples (Figures 3I,J).

Summarizing, no defects were observed in the cellular organization of both mHb and lHb. Nevertheless, it must be pointed out that the mutant Hb displayed a general abnormal flattened shape when compared with the wt Hb.

### Proliferation Analysis of the Habenular Complex

With the aim to unveil the reason for the abnormal growth of the habenular territory, we did proliferation assays analysis. From E11.5 to E13.5 (time window for the habenula differentiation; Funato et al., 2000; Belle et al., 2014), we collected embryos 2 h after a BrdU pulse was injected intraperitoneally to the pregnant females on the given day. Thereafter, we compared the proliferation between wt and mutant embryos.

At E11.5, when we compared the wt (Figures 4A,B) with the *Wnt1*<sup>-/-</sup> (Figures 4C,D), the proliferation was slightly higher in the mutant (Figure 4E). However, at E12.5, the proliferation in the wt (Figures 4F,G) in contrast to the *Wnt1*<sup>-/-</sup> (Figures 4H,I) displayed the strongest difference (Figure 4J). Finally, at E13.5 the correlation between the control (Figures 4K,L) and the mutant (Figures 4M,N) also showed a significant variation (Figure 4O). Summarizing, the *Wnt1*<sup>-/-</sup> mice displayed a higher proliferation rate in the habenular territory in all the analyzed periods showing the highest difference at E12.5.

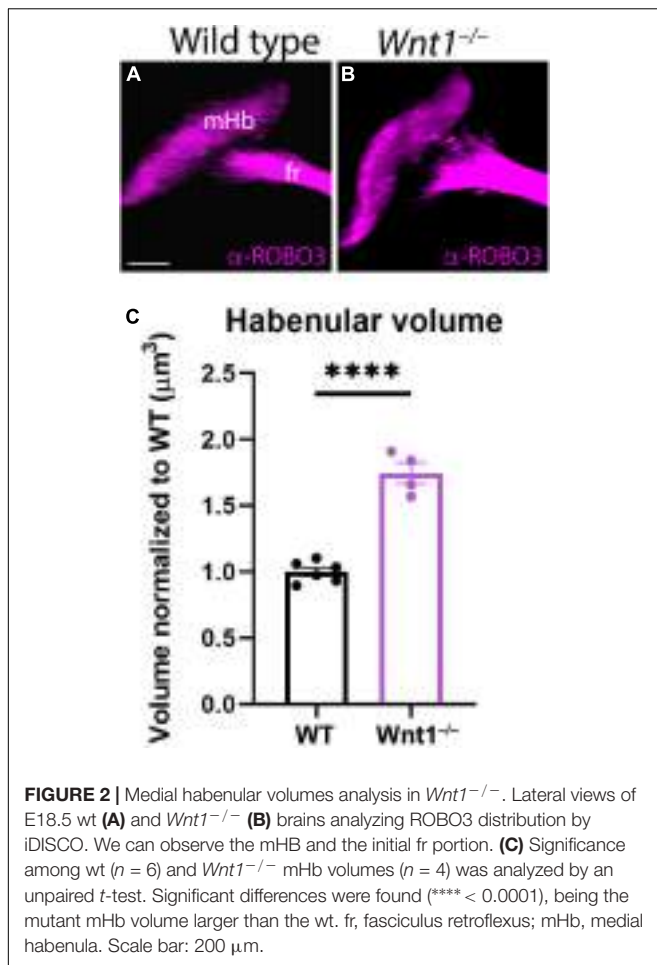


**FIGURE 1 |** *Wnt1*<sup>-/-</sup> habenular general phenotype. E18.5 wt (A–C) and E18.5 *Wnt1*<sup>-/-</sup> brain sagittal sections (D–F). (A,D) Are stained with cresyl violet, (B,E) are labeled for CNTN2 (as mHb marker), and (C,F) for NFEM (as lHb marker). The tract was thicker (arrows in E,F), and the Hb was larger in the mutant embryo. Five samples of each genotype have been analyzed. fr, fasciculus retroflexus; Hb, habenula; mtg, mamillotegmental tract; mth, mamillothalamic tract; Th, thalamus; ac, anterior commissure; lp, interpeduncular nucleus; pc, posterior commissure; CV, cresyl violet. Scale bar: 200 μm.

### Altered fr Trajectory in *Wnt1*<sup>-/-</sup>

Having described the Hb phenotype, and the affected mechanism that underlined it, we focus our attention on the fr trajectory, main efferent tract of the Hb complex. First, we compared in sagittal sections the mHb fr trajectory (by CNTN2 labeling) with the SNc localization (by TH labeling) at E15.5. In the wt, the mHb reached the basal thalamic territory in close contact with the SNc (Figure 5A). However, in the *Wnt1*<sup>-/-</sup>, the SNc was strongly reduced and a thicker mHb fr mainly followed the normal trajectory (Figure 5B). Nevertheless, a bunch of fibers

adopted abnormal directions (arrows in Figure 5B). In order to study the fasciculation and final trajectory of the full tract (mHb and lHb), we placed lipophilic dyes on E15.5 normal and mutant Hbs (DiI on the right Hb and DiD on the left Hb). In a diencephalic frontal section, we observed in the wt two compact fr, each one labeled with the specific dye (Figure 5C). In the *Wnt1*<sup>-/-</sup>, the fascicles occupied a broader domain and a slight defasciculation was detected (arrow in Figure 5D). It is known that in the last caudal portion of the fr, the fibers crossed the mes-rhombencephalic boundary and the mHb axons criss-crossed



the floor plate to innervate its target, the IP nucleus. Thus, in the wt, once the fibers crossed the dopaminergic territory, we nicely observed the characteristic eight shaped pattern of the mHb axons innervating the Ip nucleus (Figure 5E). Meanwhile, we confirmed in the *Wnt1*<sup>-/-</sup> mice that the dopaminergic neurons showed a dramatic reduction and an abnormal trajectory of the Hb fibers (Figure 5F). The Hb axons were able to go through the mid-hindbrain boundary, but once located in the rhombencephalon not all of them were able to cross the midline but only just one time (arrow in Figure 5F). Finally, we studied the distribution of mHb (labeled by CNTN2) and lHb axons (labeled by NFEM) in the fr. In the wt, the mHb axons occupied the core of the fascicle, whereas the lHb are distributed in the sheath (Figure 5G). In the *Wnt1*<sup>-/-</sup>, the mHb axons were still located in the core of the fascicle but the lHb axons presented a less compacted distribution and we found some intermingled fibers (Figure 5H).

Taking the technical advantage of observing the specimen in a 3D way we analyzed the full trajectory of the fr with iDISCO protocol. We processed E18.5 mutant and wt brains for whole mount immunohistochemistry with ROBO3 for mHb and its projections and TH for the dopaminergic populations. In the wt, in a lateral 3D vision we observed the complete trajectory,

first in its dorso-ventral path and in its final rostro-caudal portion and how it is strongly related with the mes-diencephalic dopaminergic neurons (Figures 6A,B and Supplementary Video 1). In a frontal view, we were able to show how the fibers reached the pial surface at both sides of the floor plate before they bend caudally and criss-cross the floor plate (Figures 6C,D and Supplementary Video 1). In the *Wnt1*<sup>-/-</sup> mutant embryo, in a lateral view we confirmed the reduction in dopaminergic neurons and the thicker mHb fr that displayed an abnormal final trajectory (Figures 6E,F and Supplementary Video 2). Consequently, in a frontal view, we clearly detected the aberrant trajectory that the axons followed once they reached the isthmus territory and the abnormal floor plate cross of the fibers (Figures 6G,H and Supplementary Video 2).

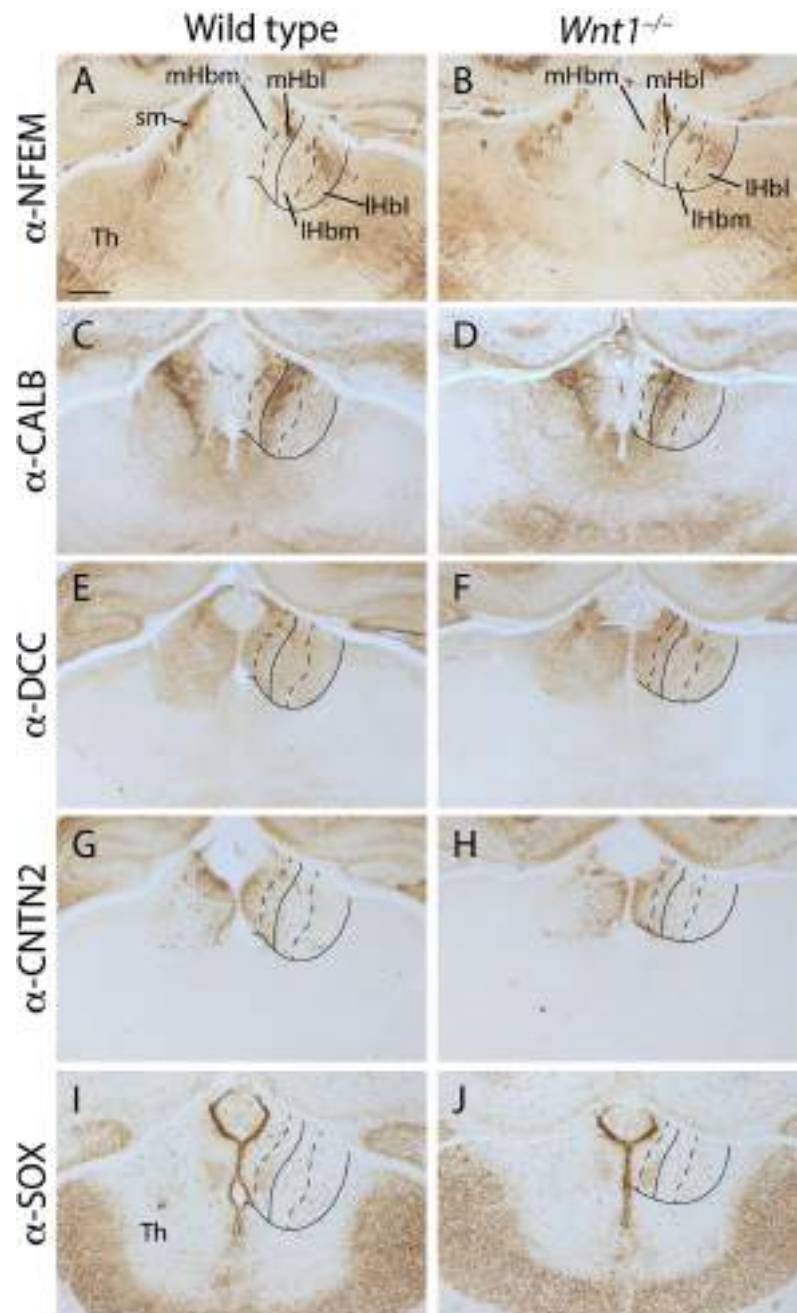
### Altered Territories in the *Wnt1*<sup>-/-</sup> fr Pathway

The specification of the mesencephalic and rostral rhombencephalon is controlled by the isthmus organizer (IsO). This secondary organizer expresses a combination of morphogens that include *Wnt1* and *Fgf8*, among others. The alteration of any of these genes produces a strong malfunction of this vital organizer. The fr misdirection in the *Wnt1*<sup>-/-</sup> could be due to alterations in the specification of the territories that it must navigate. In order to prove this, we first studied the *Fgf8* expression pattern. In the wt at E10.5, *Fgf8* was expressed in the isthmus constriction and in the anterior neural ridge (Figure 7A). In the *Wnt1*<sup>-/-</sup> mutant, the *Fgf8* expression is strongly reduced but it was not absent (arrow in Figure 7B). Rostrally, the IsO induces the specification of the dopaminergic populations. As recently demonstrated (Company et al., 2021), the *Ntn1* expression by these populations are necessary for the correct fr trajectory. In the wt, in a midbrain frontal section we observed the correlation between the dopaminergic populations and the NTN1 distribution (Figure 7C). In the *Wnt1*<sup>-/-</sup> mutant, we confirmed the dramatic reduction of dopaminergic neurons and how this alteration produced a NTN1 deprivation in the territory (arrow in Figure 7D). Finally, we studied the Ip nucleus, final target of the mHb axons. We detected the Ip location by cresyl violet staining (arrow in Figure 7E) and the mHb axons terminals labeled by CNTN2 allowed us to confirm the Ip identification (arrow in Figure 7F). In the *Wnt1*<sup>-/-</sup> mutant embryo, the Ip area did not show any apparent alteration (arrow in Figure 7G). However, the CNTN2 labeling confirmed us the Ip localization (arrow in Figure 7H). The Ip nucleus was indeed specified but its neuronal distribution was slightly abnormal.

## DISCUSSION

The Hb localization in the most dorsal aspect of the thalamic prosomere (Martinez-Ferre and Martinez, 2012) leads us to hypothesize that this important neuronal population must be under the control of the well-known dorsalizing morphogen activity produced by roof plate. *Wnt1*, among others, is one of these morphogens (Navarro-Garberi et al., 2016; Brafman and Willert, 2017). Therefore, our aim in this work was to





**FIGURE 3** | Analysis of the habenular subnuclei organization. E18.5 wt (**A,C,E,G,I**) and E18.5 *Wnt1*<sup>-/-</sup> (**B,D,F,H,J**) brain coronal sections. (**A,B**) labeled by immunohistochemistry against NFEM as IHb marker. (**C,D**) labeled against CALB, (**E,F**) DCC, (**G,H**) CNTN2 and (**I,J**) SOX1 as mHb markers. Four samples of each genotype have been analyzed. Th, thalamus; sm, stria medullaris; mHbm, medial division of the medial habenula; mHbl, lateral division of the medial habenula; IHbm, medial division of the lateral habenula; IHbl, lateral division of the lateral habenula. Scale bar: 200  $\mu$ m.

analyze the role of *Wnt1* in the development of the habenula and its efferent tract.

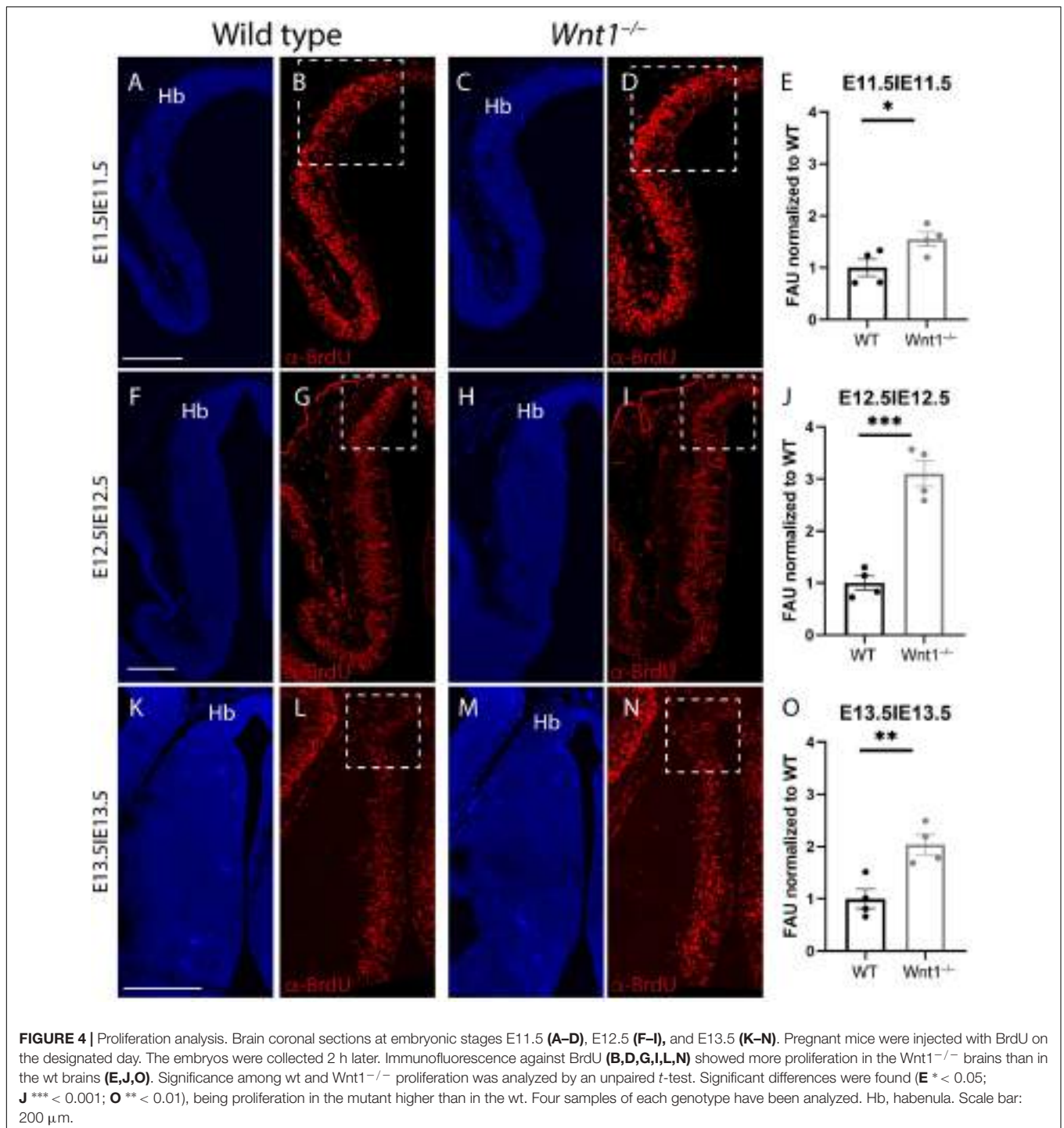
### **Wnt1 Effect in Habenular Development**

Morphogenes are crucial for the proper development of neuronal populations at least in two aspects. On one hand, they specify the genetic cascades that direct the specific differentiation

programs of the neuronal populations (Brafman and Willert, 2017). On the other hand, they regulate the proliferation rate of the neuroblast that will give rise to the different neurons (Cayuso and Martí, 2005).

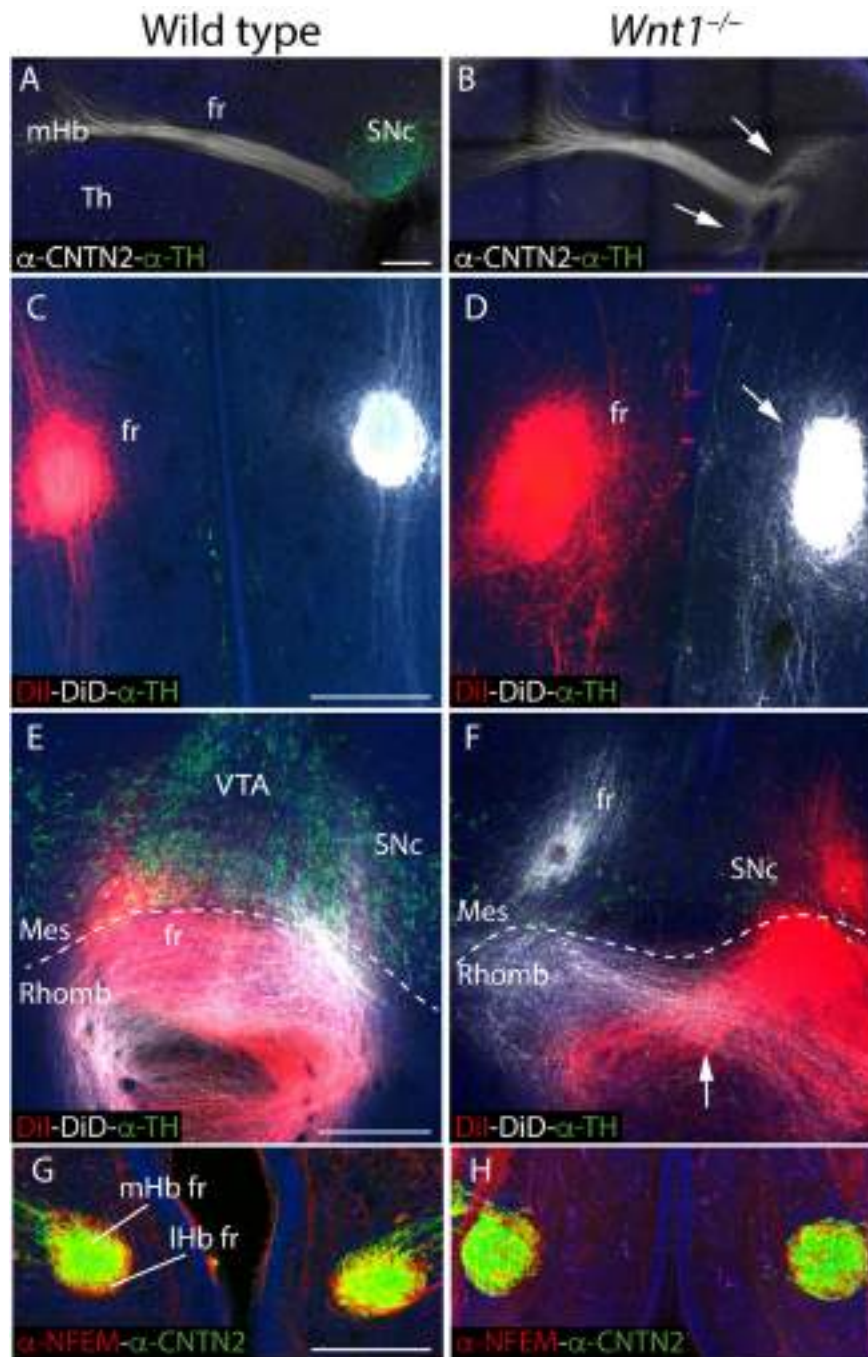
Our results indicate that *Wnt1* is not directly related with the specification of the habenular neurons as we were able to identify all the different subnuclei that compose this complex.





This result is in contrast to the differentiation changes observed in the dorsal Hb (equivalent to mammal mHb) of Zebrafish in the lack of *Wnt1* or the absence of ventral Hb (equivalent to mammal lHb) and mis-specification of the dorsal Hb in the complete blockage of the *Wnt* signaling in the *wls* mutant (Beretta et al., 2013; Hüsken and Carl, 2013; Kuan et al., 2015; Guglielmi et al., 2020). The strong differences in habenular organization and also the strong asymmetry found in Zebrafish

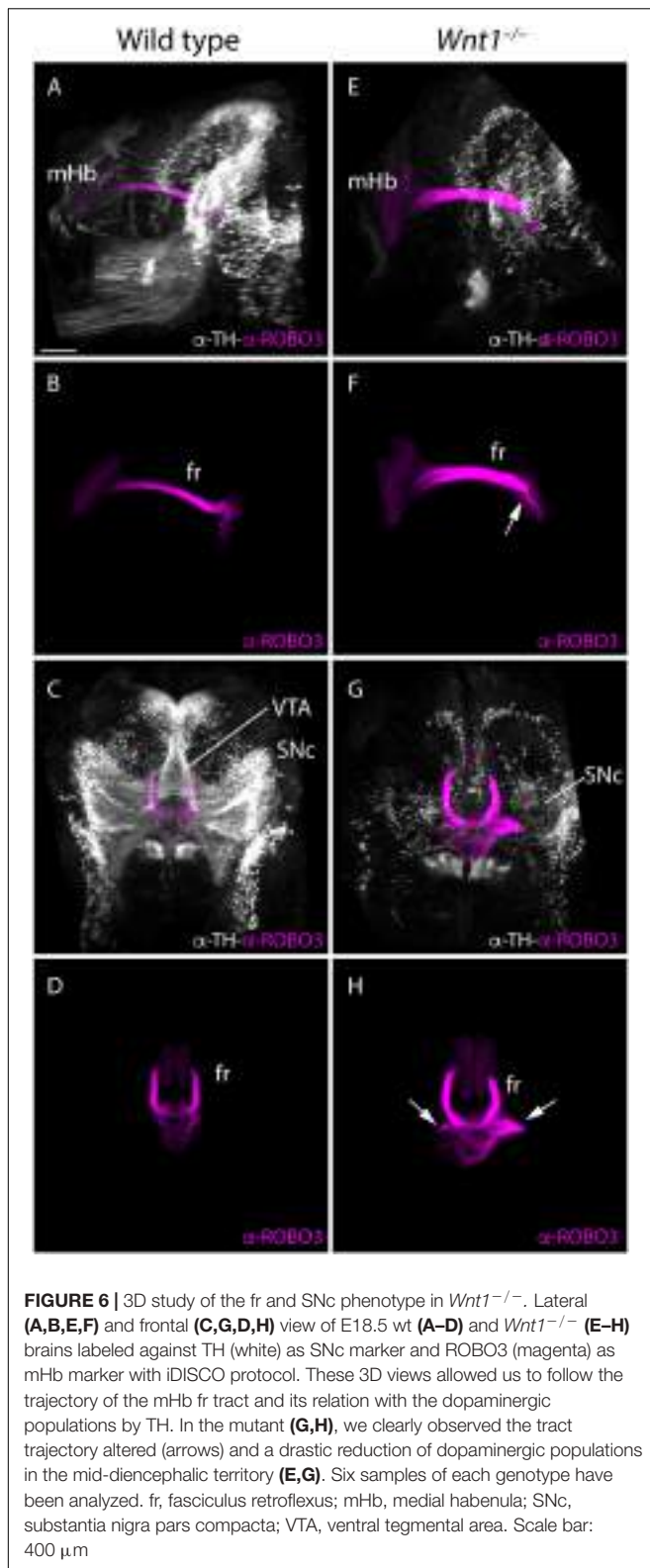
may explain the phenotype variances found between these two vertebrate models. The alterations observed in the zebrafish *wls* mutant suggest that other *Wnt* members must be involved in the specification of the habenular territory. Nevertheless, the increased habenular volume in the mutant indicated that *Wnt1* is involved in the control of the number of habenular neurons. The phenotype observed can be due to two different phenomena. The *Wnt1* lack of function can induce a change



**FIGURE 5 |** Study of the fr phenotype in *Wnt1*<sup>-/-</sup> mutant. E15.5 wt (A) and *Wnt1*<sup>-/-</sup> brain sagittal sections (B) stained against CNTN2 (mHb marker; white) and TH (green). Dil (right fr; red) and DiI (left fr; white) labeling and TH immunofluorescence (green) in coronal sections of an E15.5 wt (C,E) and *Wnt1*<sup>-/-</sup> mutant brain (D,F) at two different levels. Coronal sections of an E15.5 wt (G) and *Wnt1*<sup>-/-</sup> mutant brain (H), stained with NFEM (as I/Hb marker; red) and CNTN2 (as mHb marker; green). The arrow in (B) indicates the aberrant axonal navigation. The arrow in (D) indicates the abnormal fr shape. The arrow in (F) indicates the abnormal cross of the floor plate. The dashed line labels the mid-hindbrain boundary. fr, fasciculus retroflexus; I/Hb fr, lateral habenular axons of the fasciculus retroflexus; Mes, mesencephalon; mHb, medial habenula; mHb fr, medial habenular axons of the fasciculus retroflexus; Rhomb, rhombencephalon; SNc, substantia nigra pars compacta Th, thalamus; VTA, Ventral tegmental area. Scale bar: 200  $\mu$ m.

in the differentiation program of the thalamic neuroblast and modify their destiny into habenular neurons (Martinez-Ferre et al., 2013). Another possibility is that this absence can

modify the proliferation rate of the habenular progenitors and give rise by increment to a larger habenular complex (Cayuso and Martí, 2005).



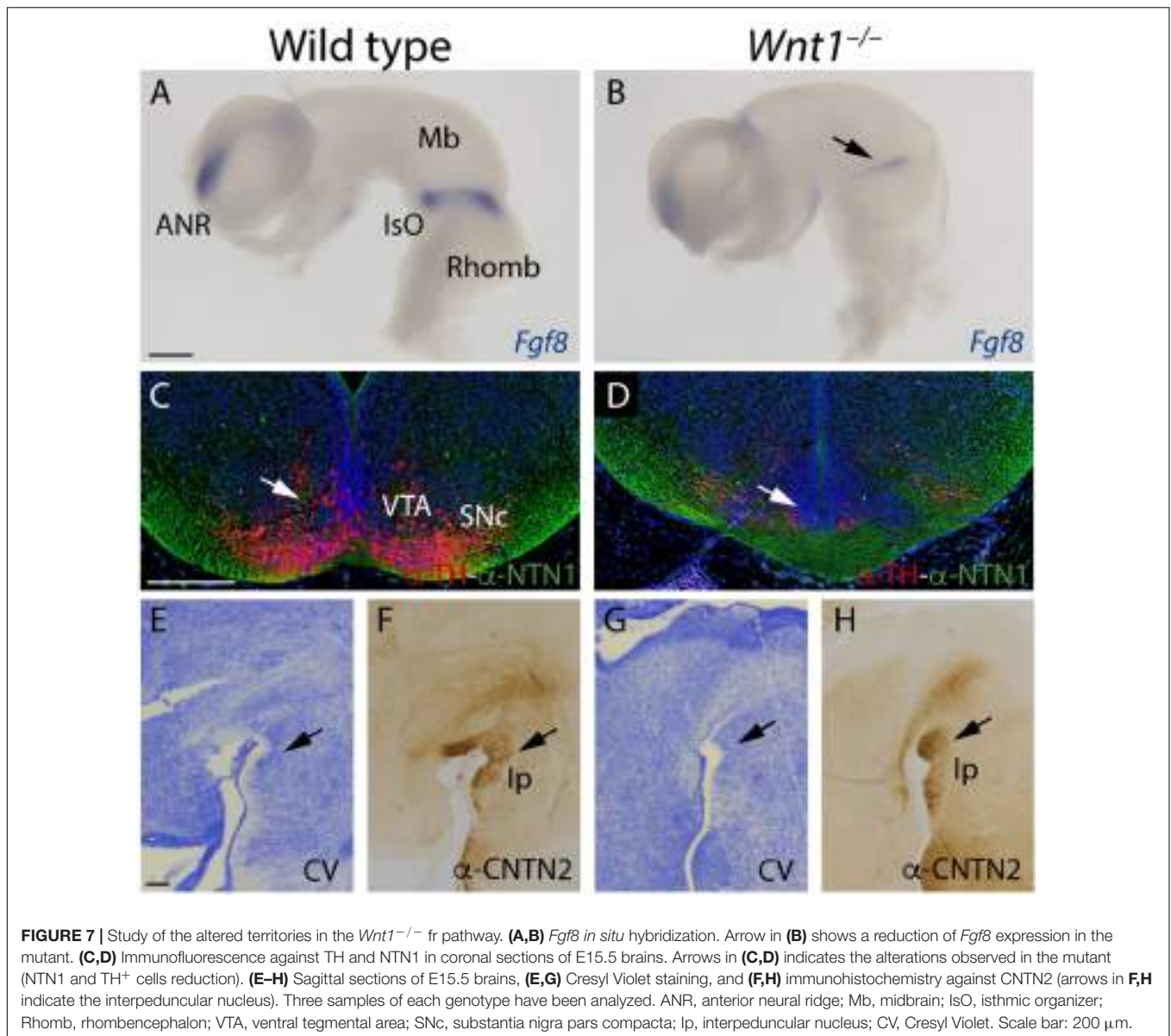
Nevertheless, the fact that the mHb subpopulations did not change their size proportions among them prompted us to discard this first hypothesis. However, the strong increment

in the proliferation rate of the habenular neuroblasts that we have shown supports the second hypothesis. The decrease in the thalamic territory could also be explained by a reduction in its proliferation rather than a change in their identity. Therefore, *Wnt1* is needed to determine the proliferation rate of the habenular precursors. It must be highlighted that the strongest effect was found in the mHb. The fact that the highest proliferation increase in the mutant was found at E12.5, time window when the mHb is generated (Funato et al., 2000; Belle et al., 2014). It is also striking that “single cell” RNAseq experiments demonstrated that the mHb neurons express several *Lef/Tcf* downstream genes while only *Tcf7l1*, a repressor of *Wnt1* target genes (Mao and Byers, 2011), is expressed in both mHb and lHb. Therefore, it is not surprising that the *Wnt1* absence has a deeper effect in the mHb compared with the lHb (Hashikawa et al., 2020; Wallace et al., 2020).

### *Wnt1* Effect on the fr

The defects found in the fr trajectory in the *Wnt1*<sup>-/-</sup> mouse display two different aspects. First, we detected a clear increment in the size of the tract and a slight disorganization of the fibers inside the fascicle. Obviously, the increment in size is due to the increased number of habenular neurons in the mutant. The lack of *Wnt1* did not produce changes in the differentiation of the habenular subnuclei but the increment in size and surface extension may account for the slight disorganization that we have observed in the sheath of the mutant fascicle. Second, we found a clear misdirection in the final fr trajectory. This phenotype can also be due to alterations in the surface molecules of the fr axons that alter their response to the surrounding navigation signals or to alterations in the specification of the territories that the axons must cross and therefore of the navigating signals (Company et al., 2021). The fact that all the different Hb subnuclei are specified suggest that the Hb axons contain the correct combination of receptors. However, it is well known that *Wnt1* lack of function produces severe alterations in the specification of the IsO (McMahon et al., 1992). As we have shown, the mutant IsO displayed a strong reduction of *Fgf8* expression, its main morphogen. Increasing reductions of FGF8 amount in the IsO resulted in escalating severe phenotypes at both sides of the organizer (Garda et al., 2001; Chi et al., 2003; Basson et al., 2008). Thus, a malfunction of this organizer produces strong differentiation impairments in the midbrain and rostral hindbrain. The effect on the surrounding territory is not symmetrical, the midbrain is more sensible than the hindbrain (Basson et al., 2008). In fact, the SNc and the VTA are strongly reduced in our non-functional IsO, due to the *Fgf8* reduction and *Wnt1* loss (Prakash et al., 2006; Smidt and Burbach, 2007; dos Santos and Smidt, 2011), meanwhile the Ip generated in rhombomere 1 is almost not affected (Basson et al., 2008). Recently, it has been proved that SNc and VTA are involved, via *Netrin1*, in the correct navigation of the fr axons through this territory (Company et al., 2021). The absence of a *Netrin1* correct signal must be responsible for the misdirection of a part of the fr axons. Some of them are still able to reach the Ip probably due to the fact that not all the dopaminergic neurons are lost (Wurst and Prakash, 2014).





Thus, the *Wnt1* lack of function altered the IsO functionality which produced a strong reduction in SNc and VTA neurons. The miss-specification of this intermediate target of the fr axons must be responsible for their disrupted trajectory in our mutant model.

In summary, we can conclude that *Wnt1* is not directly related in the specification of the habenular neurons but it is responsible for the proliferation rate regulation of the habenular neuroblasts. Other morphogenes expressed in the diencephalic roof plate (like *BMPs* or other *Wnt* family members, must account for the determination of this neuronal population. This is supported by the results obtained with the *wls* mutant (protein involved in the WNT secretion) in zebrafish. The *wls* habenular phenotype is dramatic compared with the *Wnt1* mutant indicating that other *Wnt* members must be involved in the Hb specification (Kuan et al., 2015). The *Wnt1* lack of function produced and

altered IsO, this alteration produced a miss differentiation of the territory crossed by the fr resulting in an erroneous direction of the fascicle.

## DATA AVAILABILITY STATEMENT

The original contributions presented in the study are included in the article/**Supplementary Material**, further inquiries can be directed to the corresponding author/s.

## ETHICS STATEMENT

The animal study was reviewed and approved by Universidad Miguel Hernández OIR Committee (2016/VSC/PEA/00190).

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

SM, DE, and EP conceived, obtained funding, and designed the experiments. VC, AM-C, AA-C, RM-R, and FA-G performed the experiments. DE and EP analyzed the data. EP wrote the article. All authors had full access to all the data in the study and take responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data analysis.

## FUNDING

This work was supported by the MINECO/AEI/FEDER (BFU2013-48230) to EP and DE; MINECO/AEI/FEDER (SAF2017-83702-R; PID2020-118171RB-I00), GVA (PROME TEO/2018/041), ISCIII (“RD16/001/0010”), co-funded by

## REFERENCES

- Agetsuma, M., Aizawa, H., Aoki, T., Nakayama, R., Takahoko, M., Goto, M., et al. (2010). The habenula is crucial for experience-dependent modification of fear responses in zebrafish. *Nat. Neurosci.* 13, 1354–1356. doi: 10.1038/nn.2654
- Aizawa, H., Amo, R., and Okamoto, H. (2011). Phylogeny and ontogeny of the habenular structure. *Front. Neurosci.* 5:138. doi: 10.3389/fnins.2011.00138
- Amo, R., Fredes, F., Kinoshita, M., Aoki, R., Aizawa, H., Agetsuma, M., et al. (2014). The habenulo-raphé serotonergic circuit encodes an aversive expectation value essential for adaptive active avoidance of danger. *Neuron* 84, 1034–1048. doi: 10.1016/j.neuron.2014.10.035
- Andres, K., Von Düring, M., and Veh, R. (1999). Subnuclear organization of the rathabenular complexes. *J. Comp. Neurol.* 407, 130–150. doi: 10.1002/(sici)1096-9861(19990428)407:1<130::aid-cne10<3.0.co;2-8
- Barth, K. A., Kishimoto, Y., Rohr, K. B., Seydler, C., Schulte-Merker, S., and Wilson, S. W. (1999). Bmp activity establishes a gradient of positional information throughout the entire neural plate. *Development* 126, 4977–4987.
- Basson, M. A., Echevarria, D., Ahn, C. P., Sudarov, A., Joyner, A. L., Mason, I. J., et al. (2008). Specific regions within the embryonic midbrain and cerebellum require different levels of FGF signaling during development. *Development* 135, 889–898. doi: 10.1242/dev.011569
- Batalla, A., Homberg, J. R., Lipina, T. V., Sescousse, G., Luijten, M., Ivanova, S. A., et al. (2017). The role of the habenula in the transition from reward to misery in substance use and mood disorders. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 80, 276–285. doi: 10.1016/j.neubiorev.2017.03.019
- Belle, M., Godefroy, D., Dominici, C., Heitz-Marchaland, C., Zelina, P., Hellal, F., et al. (2014). A simple method for 3D analysis of immunolabeled axonal tracts in a transparent nervous system. *Cell Rep.* 9, 1191–1201. doi: 10.1016/j.celrep.2014.10.037
- Benarroch, E. E. (2015). Habenula. *Neurology* 85, 992–1000. doi: 10.1212/WNL.0000000000001937
- Bengoa-Vergniory, N., and Kypta, R. M. (2015). Canonical and noncanonical Wnt signaling in neural stem/progenitor cells. *Cell. Mol. Life Sci.* 72, 4157–4172. doi: 10.1007/s00018-015-2028-6
- Beretta, C. A., Dross, N., Bankhead, P., and Carl, M. (2013). The ventral habenulae of zebrafish develop in prosomere 2 dependent on Tcf7l2 function. *Neural Dev.* 8:19. doi: 10.1186/1749-8104-8-19
- Bianco, I., and Wilson, S. (2009). The habenular nuclei: a conserved asymmetric relay station in the vertebrate brain. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 364, 1005–1020. doi: 10.1098/RSTB.2008.0213
- Brafman, D., and Willert, K. (2017). Wnt/ $\beta$ -catenin signaling during early vertebrate neural development. *Dev. Neurobiol.* 77, 1239–1259. doi: 10.1002/dneu.22517
- Cayuso, J., and Martí, E. (2005). Morphogens in motion: growth control of the neural tube. *J. Neurobiol.* 64, 376–387. doi: 10.1002/NEU.20169
- Cherng, B.-W., Islam, T., Torigoe, M., Tsuboi, T., and Okamoto, H. (2020). The dorsal lateral habenula-interpeduncular nucleus pathway is essential for left-right-dependent decision making in zebrafish. *Cell Rep.* 32:108143. doi: 10.1016/j.celrep.2020.108143

the ERDF/ESE, “Investing in your future,” and FTPGB (FTPGB18/SM) to SM; MECD (FPU16/03853) to VC. The Institute of Neurosciences is a “Centre of Excellence Severo Ochoa (SEV-2017-0723)”.

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank Oscar Elía Zudaire for statistical advice.

## SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcell.2021.755729/full#supplementary-material>

- Chi, C. L., Martínez, S., Wurst, W., and Martin, G. R. (2003). The isthmus organizer signal FGF8 is required for cell survival in the prospective midbrain and cerebellum. *Development* 130, 2633–2644. doi: 10.1242/dev.00487
- Ciani, L., and Salinas, P. C. (2005). WNTs in the vertebrate nervous system: from patterning to neuronal connectivity. *Nat. Rev. Neurosci.* 6, 351–362. doi: 10.1038/nrn1665
- Company, V., Andreu-Cervera, A., Madrigal, M. P., Andrés, B., Almagro-García, F., Chédotal, A., et al. (2021). Netrin 1-mediated role of the substantia nigra pars compacta and ventral tegmental area in the guidance of the medial habenular axons. *Front. Cell Dev. Biol.* 9:1183. doi: 10.3389/fcell.2021.682067
- Contestabile, R. A., and Flumerfelt, B. A. (1981). Afferent connections of the interpeduncular nucleus and the topographic organization of the habenulo-interpeduncular pathway: an HRP study in the rat. *J. Comp. Neurol.* 196, 253–270. doi: 10.1002/cne.901960206
- dos Santos, M. T. A., and Smidt, M. P. (2011). En1 and Wnt signaling in midbrain dopaminergic neuronal development. *Neural Dev.* 6:21. doi: 10.1186/1749-8104-6-23
- Fakhoury, M. (2018). The dorsal diencephalic conduction system in reward processing: spotlight on the anatomy and functions of the habenular complex. *Behav. Brain Res.* 348, 115–126. doi: 10.1016/j.bbr.2018.04.018
- Fore, S., Palumbo, F., Pelgrims, R., and Yaksi, E. (2018). Information processing in the vertebrate habenula. *Semin. Cell Dev. Biol.* 78, 130–139. doi: 10.1016/j.semcdb.2017.08.019
- Funato, H., Saito-Nakazato, Y., and Takahashi, H. (2000). Axonal growth from the habenular nucleus along the neuromere boundary region of the diencephalon is regulated semaphorin 3F and netrin-1. *Mol. Cell. Neurosci.* 16, 206–220. doi: 10.1006/mcne.2000.0870
- Garda, A. L., Echevarria, D., and Martínez, S. (2001). Neuroepithelial co-expression of Gbx2 and Otx2 precedes Fgf8 expression in the isthmus organizer. *Mech. Dev.* 101, 111–118. doi: 10.1016/S0925-4773(00)00567-0
- Grillner, S., von Twickel, A., and Robertson, B. (2018). The blueprint of the vertebrate forebrain – with special reference to the habenulae. *Semin. Cell Dev. Biol.* 78, 103–106. doi: 10.1016/j.semcdb.2017.10.023
- Guglielmi, L., Bühler, A., Moro, E., Argenton, F., Poggi, L., and Carl, M. (2020). Temporal control of Wnt signaling is required for habenular neuron diversity and brain asymmetry. *Development* 147:dev182865. doi: 10.1242/dev.182865
- Hashikawa, Y., Hashikawa, K., Rossi, M. A., Basiri, M. L., Liu, Y., Johnston, N. L., et al. (2020). Transcriptional and spatial resolution of cell types in the mammalian habenula. *Neuron* 106, 743–758.e5. doi: 10.1016/j.neuron.2020.03.011
- Hikosaka, O. (2010). The habenula: from stress evasion to value-based decision-making. *Nat. Rev. Neurosci.* 11, 503–513. doi: 10.1038/nrn2866
- Hikosaka, O., Sesack, S. R., Lecourtier, L., and Shepard, P. D. (2008). Habenula: crossroad between the basal ganglia and the limbic system. *J. Neurosci.* 28, 11825–11829. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3463-08.2008
- Hu, H., Cui, Y., and Yang, Y. (2020). Circuits and functions of the lateral habenula in health and in disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 21, 277–295. doi: 10.1038/s41583-020-0292-4

- Hüsken, U., and Carl, M. (2013). The Wnt/beta-catenin signaling pathway establishes neuroanatomical asymmetries and their laterality. *Mech. Dev.* 130, 330–335. doi: 10.1016/j.mod.2012.09.002
- Jesuthasan, S. (2012). Fear, anxiety, and control in the zebrafish. *Dev. Neurobiol.* 72, 395–403. doi: 10.1002/DNEU.20873
- Jhou, T. C., Geisler, S., Marinelli, M., Degarmo, B. A., and Zahm, D. S. (2009). The mesopontine rostromedial tegmental nucleus: a structure targeted by the lateral habenula that projects to the ventral tegmental area of Tsai and substantia nigra compacta. *J. Comp. Neurol.* 513, 566–596. doi: 10.1002/cne.21891
- Kazanskaya, O., Glinka, A., and Niehrs, C. (2000). The role of Xenopus dickkopf1 in prechordal plate specification and neural patterning. *Development* 127, 4981–4992. doi: 10.1242/DEV.127.22.4981
- Klemm, W. R. (2004). Habenular and interpeduncular nuclei: shared components in multiple-function networks. *Med. Sci. Monit.* 10, 261–274.
- Koppensteiner, P., Galvin, C., and Ninan, I. (2016). Development- and experience-dependent plasticity in the dorsomedial habenula. *Mol. Cell. Neurosci.* 77, 105–112. doi: 10.1016/j.mcn.2016.10.006
- Kuan, Y. S., Roberson, S., Akitake, C. M., Fortuno, L., Gamse, J., Moens, C., et al. (2015). Distinct requirements for Wntless in habenular development. *Dev. Biol.* 406, 117–128. doi: 10.1016/j.ydbio.2015.06.006
- Lee, A., Mathuru, A. S., Teh, C., Kibat, C., Korzh, V., Penney, T. B., et al. (2010). The habenula prevents helpless behavior in larval zebrafish. *Curr. Biol.* 20, 2211–2216. doi: 10.1016/j.cub.2010.11.025
- Loonen, A. J. M., and Ivanova, S. A. (2019). Evolution of circuits regulating pleasure and happiness with the habenula in control. *CNS Spectr.* 24, 233–238. doi: 10.1017/S1092852917000748
- Mao, C. D., and Byers, S. W. (2011). Cell-context dependent TCF/LEF expression and function: alternative tales of repression, de-repression and activation potentials. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* 21:207.
- Martinez-Ferre, A., and Martinez, S. (2012). Molecular regionalization of the diencephalon. *Front. Neurosci.* 6:73. doi: 10.3389/fnins.2012.00073
- Martinez-Ferre, A., Navarro-Garberi, M., Bueno, C., and Martinez, S. (2013). Wnt signal specifies the intrathalamic limit and its organizer properties by regulating Shh induction in the alar plate. *J. Neurosci.* 33, 3967–3980. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0726-12.2013
- Masai, I., Heisenberg, C. P., Barth, K. A., Macdonald, R., Adamek, S., and Wilson, S. W. (1997). Floating head and masterblind regulate neuronal patterning in the roof of the forebrain. *Neuron* 18, 43–57. doi: 10.1016/S0896-6273(01)80045-3
- Mathuru, A. S. (2018). A little rein on addiction. *Semin. Cell Dev. Biol.* 78, 120–129. doi: 10.1016/j.semcdb.2017.09.030
- Mathuru, A. S., and Jesuthasan, S. (2013). The medial habenula as a regulator of anxiety in adult zebrafish. *Front. Neural Circuits* 7:99. doi: 10.3389/FNCIR.2013.00099
- McMahon, A. P., Joyner, A. L., Bradley, A., and McMahon, J. A. (1992). The midbrain-hindbrain phenotype of Wnt-1- Wnt-1- mice results from stepwise deletion of engrailed-expressing cells by 9.5 days postcoitum. *Cell* 69, 581–595. doi: 10.1016/0092-8674(92)90222-X
- Moreno-Bravo, J. A., Martinez-Lopez, J. E., Madrigal, M. P., Kim, M., Mastick, G. S., Lopez-Bendito, G., et al. (2016). Developmental guidance of the retroflex tract at its bending point involves Robo1-Slit2-mediated floor plate repulsion. *Brain Struct. Funct.* 221, 665–678. doi: 10.1007/s00429-014-0932-4
- Murcia-Ramón, R., Company, V., Juárez-Leal, I., Andreu-Cervera, A., Almagro-García, F., Martínez, S., et al. (2020). Neuronal tangential migration from *Nkx2.1*-positive hypothalamus. *Brain Struct. Funct.* 225, 2857–2869. doi: 10.1007/s00429-020-02163-x
- Nakajima, M., Mori, H., Nishikawa, C., Tsuruta, M., Okuyama, S., and Furukawa, Y. (2013). Psychiatric disorder-related abnormal behavior and habenulointerpeduncular pathway defects in Wnt1-cre and Wnt1-GAL4 double transgenic mice. *J. Neurochem.* 124, 241–249. doi: 10.1111/jnc.12085
- Nakajo, H., Tsuboi, T., and Okamoto, H. (2020). The behavioral paradigm to induce repeated social defeats in zebrafish. *Neurosci. Res.* 161, 24–32. doi: 10.1016/J.NEURES.2019.11.004
- Navarro-Garberi, M., Bueno, C., and Martinez, S. (2016). Wnt1 signal determines the patterning of the diencephalic dorso-ventral axis. *Brain Struct. Funct.* 221, 3693–3708. doi: 10.1007/s00429-015-1126-4
- Okamoto, H., Agetsuma, M., and Aizawa, H. (2012). Genetic dissection of the zebrafish habenula, a possible switching board for selection of behavioral strategy to cope with fear and anxiety. *Dev. Neurobiol.* 72, 386–394. doi: 10.1002/DNEU.20913
- Okamoto, H., Cherng, B. W., Nakajo, H., Chou, M. Y., and Kinoshita, M. (2021). Habenula as the experience-dependent controlling switchboard of behavior and attention in social conflict and learning. *Curr. Opin. Neurobiol.* 68, 36–43. doi: 10.1016/j.conb.2020.12.005
- Pandey, S., Shekhar, K., Regev, A., and Schier, A. F. (2018). Comprehensive identification and spatial mapping of habenular neuronal types using single-Cell RNA-Seq. *Curr. Biol.* 28, 1052–1065.e7. doi: 10.1016/j.cub.2018.02.040
- Prakash, N., Brodski, C., Naserke, T., Puelles, E., Gogoi, R., Hall, A., et al. (2006). A Wnt1-regulated genetic network controls the identity and fate of midbrain-dopaminergic progenitors in vivo. *Development* 133, 89–98. doi: 10.1242/dev.02181
- Puelles, L. (2019). Survey of midbrain, diencephalon, and hypothalamus neuroanatomic terms whose prosomeric definition conflicts with columnar tradition. *Front. Neuroanat.* 13:20. doi: 10.3389/FNANA.2019.00020
- Ramón y Cajal, S. (1909). *Histologie du Système Nerveux de l'homme & des Vertébrés*. Paris: Maloine. doi: 10.5962/bhl.title.48637.
- Regan, J. C., Concha, M. L., Roussigne, M., Russell, C., and Wilson, S. W. (2009). An Fgf8-dependent bistable cell migratory event establishes CNS asymmetry. *Neuron* 61, 27–34. doi: 10.1016/j.neuron.2008.11.030
- Roman, E., Weininger, J., Lim, B., Roman, M., Barry, D., Tierney, P., et al. (2020). Untangling the dorsal diencephalic conduction system: a review of structure and function of the stria medullaris, habenula and fasciculus retroflexus. *Brain Struct. Funct.* 225, 1437–1458. doi: 10.1007/s00429-020-02069-8
- Schmidt, E. R. E., and Pasterkamp, R. J. (2017). The molecular mechanisms controlling morphogenesis and wiring of the habenula. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 162, 29–37. doi: 10.1016/j.pbb.2017.08.008
- Schmidt, E. R. E., Brignani, S., Adolfs, Y., Lemstra, S., Demmers, J., Vidaki, M., et al. (2014). Subdomain-mediated axon-axon signaling and chemoattraction cooperate to regulate afferent innervation of the lateral habenula. *Neuron* 83, 372–387. doi: 10.1016/j.neuron.2014.05.036
- Smidt, M. P., and Burbach, J. P. H. (2007). How to make a mesodiencephalic dopaminergic neuron. *Nat. Rev. Neurosci.* 8, 21–32. doi: 10.1038/nrn2039
- Sutherland, R. J. (1982). The dorsal diencephalic conduction system: a review of the anatomy and functions of the habenular complex. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 6, 1–13. doi: 10.1016/0149-7634(82)90003-3
- Taciak, B., Pruszyńska, I., Kiraga, L., Bialasek, M., and Krol, M. (2018). Wnt signaling pathway in development and cancer. *J. Physiol. Pharmacol.* 69, 185–196. doi: 10.26402/jpp.2018.2.07
- Wagner, F., French, L., and Voh, R. W. (2016). Transcriptomic-anatomic analysis of the mouse habenula uncovers a high molecular heterogeneity among neurons in the lateral complex, while gene expression in the medial complex largely obeys subnuclear boundaries. *Brain Struct. Funct.* 221, 39–58. doi: 10.1007/s00429-014-0891-9
- Wallace, M. L., Huang, K. W., Hochbaum, D., Hyun, M., Radeljic, G., and Sabatini, B. L. (2020). Anatomical and single-cell transcriptional profiling of the murine habenular complex. *Elife* 9:e51271. doi: 10.7554/eLife.51271
- Wurst, W., and Prakash, N. (2014). Wnt1-regulated genetic networks in midbrain dopaminergic neuron development. *J. Mol. Cell Biol.* 6, 34–41. doi: 10.1093/JMCSBJ/MTJ046
- Zahm, D. S., and Root, D. H. (2017). Review of the cytology and connections of the lateral habenula, an avatar of adaptive behaving. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 162, 3–21. doi: 10.1016/j.pbb.2017.06.004

**Conflict of Interest:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

**Publisher's Note:** All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Copyright © 2021 Company, Moreno-Cerdá, Andreu-Cervera, Murcia-Ramón, Almagro-García, Echevarría, Martínez and Puelles. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.





## **Anexo 2:**

**La molécula de adhesión Amigo 2 está involucrada en el proceso de fasciculación del fascículo retroflejo**

**Adhesion molecule Amigo2 is involved in the fasciculation process of the fasciculus retroflexus.**

Los resultados que se describen a continuación forman parte de un artículo que se encuentra en evaluación.

Verónica Company, Raquel Murcia-Ramón, Abraham Andreu-Cervera, Francisca Almagro-García, Salvador Martínez, Diego Echevarría, Eduardo Puellas.

Instituto de Neurociencias de Alicante, Universidad Miguel Hernández-CSIC, Alicante, Spain.

## Abstract

In the habenular complex, the fasciculus retroflexus is the main efference. It is composed by a core, where the medial habenular axons are located, and a shell composed by lateral habenular axons. Both group of fibers share the same initial way and differ in the final segment of the fascicle. The different behavior of the axonal fascicles is regulated by surface molecules. *Amigo2*, adhesion molecule with immunoglobulin like domain 2, codify for a membrane protein selectively expressed in the medial habenula. We selected this molecule as a candidate to control the medial Habenula axons fasciculation behavior. First, we studied in an *Amigo2* lack of function mouse model the development of the habenular efference. The fasciculus retroflexus appeared defasciculated with a variable phenotype. Then, gain of function experiments allowed us to generate not only a more condensed tract but to recover the *Amigo2* knock-out phenotype. *Amigo2* alterations did not produce any modification in the habenular fibers guidance process. We have demonstrated that *Amigo2* plays a role in the fasciculation process of the fasciculus retroflexus.

## Keywords

*Amigo2*, fasciculus retroflexus, medial habenula, lateral habenula, fasciculation.

## Declarations

**Funding:** Work supported by MINECO/AEI/FEDER (BFU2013-48230) to E. Puelles and D. Echevarría; MINECO/AEI/FEDER (SAF2017-83702-R), GVA (PROMETEO/2018/041), ISCIII (“RD16/001/0010”), co-funded by ERDF/ESF, “Investing in your future”, and FTPGB (FTPGB18/SM) to S. Martinez; MECD (FPU16/03853) to V. Company. The Institute of Neurosciences is a “Centre of Excellence Severo Ochoa (SEV-2017-0723)”.

**Conflict of Interest:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

**Ethics Approval:** All mouse experiments were performed according to protocols approved by the Universidad Miguel Hernandez OEP committee (2016/VSC/PEA/00190)

**Consent to participate and for publication:** All authors consent to participate and publish the data included in this manuscript.

**Availability of data and material:** All material and data used are available upon request.

**Author Contributions:** All authors had full access to all the data in the study and take responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data analysis. Conceived and designed the experiments: Salvador Martinez, Diego Echevarría and Eduardo Puelles; Performed the experiments: Verónica Company, Raquel Murcia-Ramón, Abraham Andreu-Cervera, and Francisca Almagro-García; Analyzed the data: Diego Echevarría and Eduardo Puelles; Wrote the article: Eduardo Puelles; Obtained funding: Salvador Martinez, Eduardo Puelles, Diego Echevarría.

## **Introduction**

The human central nervous system integrates several functional systems. One of them, the limbic system plays a pivotal role and it is related to emotions, behavior, memory and olfaction. This complex system involves neuronal populations located in all cerebral segments: Amygdala, hippocampus, cingular cortex, septal and hypothalamic nuclei in the secondary prosencephalon; Thalamic and habenular nuclei in the diencephalon; Substantia nigra, ventral tegmental area, periaqueductal gray and reticular formation in the midbrain; Rafe complex, locus coeruleus and reticular formation in the hindbrain (Nieuwenhuys et al., 2008).

This vast group of different neuronal nuclei are connected by axonal tracts that display stereotyped trajectories in mammalian brains. Minor alterations in the neuronal subtypes specification or in their connectivity could account for multiple syndromes and pathologies related to the limbic system. These diseases include mental disorders such as schizophrenia, depression, substance abuse or developing alterations that include learning, motivation, reward, pain and memory disabilities (Aizawa et al., 2011; Fakhoury, 2017; Duman et al., 2019; Hu et al., 2020; Nikolenko et al., 2020; Bühler and Carl, 2021).

The habenular complex, located in the epithalamus (dorsal aspect of the thalamic prosomere), plays a pivotal role in the communication between prosencephalic components and mid-hindbrain neurotransmitters (dopamine, serotonin, etc.) producing neurons. It is composed by two subnuclei, the medial and the lateral Habenula (mHb and lHb). Its afferent and efferent fibers are integrated in the dorsal diencephalic conduction system (Fakhoury, 2018; Roman et al., 2020). Both neuronal structures project through the fasciculus retroflexus (fr; also known as habenulo interpeduncular tract). The mHb axons occupy the core and the lHb axons the shell of the tract (Herkenham and Nauta, 1979; Ichijo and Toyama, 2015). This organization is also accompanied by a different behavior during their trajectory. The lHb axons defasciculate as they reach the diencephalic basal plate and innervate the mes-diencephalic Substantia nigra. Meanwhile, the mHb axons reach the pial surface adjacent to the diencephalic floor plate and navigate caudally towards its target, the interpeduncular nucleus located in the hindbrain. The fr developing trajectory has been defined (Moreno-Bravo et al., 2016) and the guidance mechanisms that control its development have been partially unveiled (Funato et al., 2000; Sahay et al., 2003; Kantor et al., 2004; Moreno-Bravo et al., 2016; Company et al., 2021). These mechanisms require the interaction of the growing axons with long and short distance guiding molecules. These processes are accompanied by the own interaction between these axons that give rise to the fasciculation of the tracts. These interactions can be homotypic or heterotypic and play a crucial role in the correct generation of the different fascicles (Wang and Marquardt, 2013; Petrovic and Schmucker, 2015; Spead and Poulain, 2020).

This different fasciculation behavior must be due to the differential expression of receptors and membrane proteins between mHb and lHb populations. The combination of surface proteins will direct the growing axons response to the signaling molecules found in their trajectory. The mHb and lHb neurons express a differential combination of axon guidance and cell adhesion molecules as it was demonstrated by laser-capture microdissection and mass spectrometry (Schmidt et al., 2014). Between the molecules enriched in the mHb, Schmidt and collaborators described the presence of well-known proteins as the *Netrin1* receptor, *Deleted in colon carcinoma (Dcc)*. Also *Neuropilin2 (Nrp2)*, receptor of *Semaphorin3F*, responsible of the aversive response of mHb fr axons toward the pretectal alar territory (Funato et al., 2000; Giger et al., 2000; Sahay et al., 2003). Other molecules such as *Plexin-B2* (Worzfeld et al., 2004; Perälä et al., 2005) are not expressed in the Habenula in the correct time window when de fr is generated. Interestingly, it was detected a leucine-rich repeats and immunoglobulin like protein named *amphoterin induced gene and ORF 2 (Amigo2)*; Laeremans et al., 2013), at present known as adhesion molecule with immunoglobulin like domain 2 (Park et al., 2015). Its expression was detected in the central nervous system, especially in the hippocampus (Kuja-Panula et al., 2003; Ono et al., 2003; Laeremans et al., 2013). The *Amigo2* expression in the mHb was confirmed from Allen Institute data (Wagner et al., 2014). It belongs to a family of type I transmembrane proteins and mediates cell-cell interactions by homophilic (*Amigo2-Amigo2*) and heterophilic (*Amigo1-Amigo2-Amigo3*) interactions (Kuja-Panula et al., 2003). They have been already related to neural circuits development (Zhao et al., 2014) and neurites outgrowth and fasciculation (Kuja-Panula et al., 2003).

Different alterations of this gene have been described in humans. The psychomotor development delay detected in two patients with a proximal 12q deletion was related to *Amigo2* loss of function (Miyake et al., 2004). Moreover, the genomic analysis of a patient with intellectual disabilities among multiple congenital abnormalities, directly linked *Amigo2* sequence alterations to its mental condition (Gimelli et al., 2011) and in addition, it has been linked to patients with Occulo-Auriculo-Vertebral Spectrum (Rengasamy Venugopalan et al., 2019; Guida et al.,

2021). Finally, *Amigo2* overexpression has been related to an increment in the metastatic properties of hepatic, lung, gastric, ovarian or melanoma cancers (Fontanals-Cirera et al., 2017; Huo et al., 2017; Kanda et al., 2017; Sonzogni et al., 2018; Nakamura et al., 2020; Liu et al., 2021).

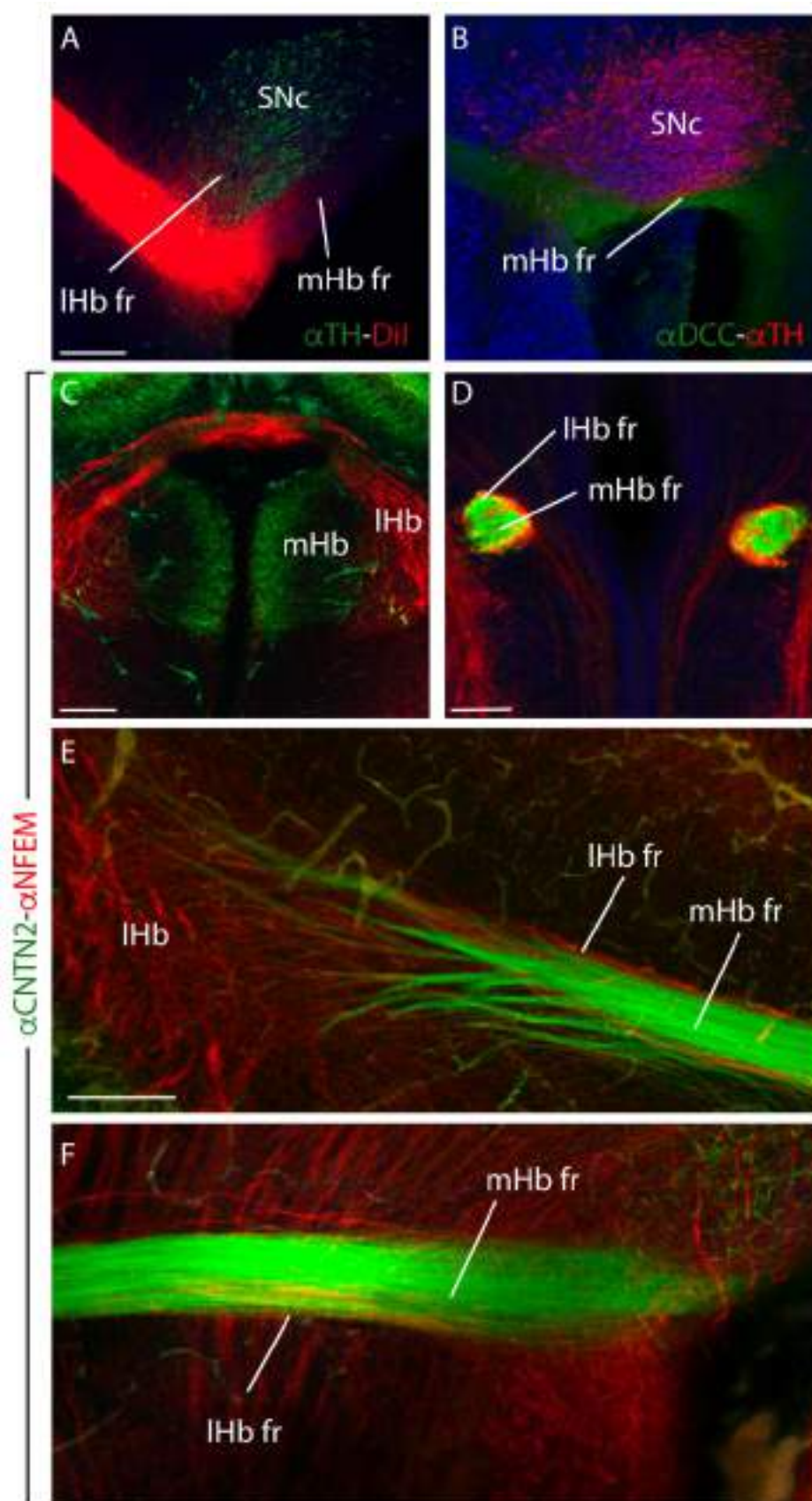
The mHb specific expression prompted us to select *Amigo2* as a candidate molecule to play a role in the differential behavior, trajectory and fasciculation, of the mHb rf axons. To prove this hypothesis, we decided to study the effect of *Amigo2* loss and gain of function in the murine fr development.

## Results

### *mHb and lHb axons distribution in the fr*

As a first step in our analysis, we studied the fr habenular axons distribution in E15.5 brains. We labeled the complete neuronal complex by the application of a DiI crystal. We observed in the vicinity of the Substantia nigra pars compacta (SNc; identified by the presence of Tyrosine hydroxylase) the mHb axons fasciculated close to the pial surface meanwhile the lHb axons defasciculated and innervate the SNc (Fig. 1A). The mHb axons trajectory was confirmed by the presence of DCC, receptor of *Netrin1*, and specific marker of the mHb neurons (Braisted et al., 2000; Schmidt et al., 2014). No DCC positive axons defasciculated inside the SNc (Fig. 1B). As previously demonstrated, this different behavior is also accompanied by a fr axonal segregation (Bianco and Wilson, 2009; Schmidt et al., 2014). The mHb axons labelled by *Contactin2* (CNTN2; Fig. 1C) and the lHb axons by *Neurofilament* (NFEM; Fig. 1C), allowed us to describe the axonal distribution (Fig. 1D-F) in the fr. In a sagittal section, we observed how the mHb axons, at the fr initial segment, began to tightly fasciculate in the core of the fascicle with the lHb axons surrounding them in the shell of the tract (Fig. 1E). This segregation was maintained as the fascicle reached the diencephalic basal plate (Fig. 1F). In a frontal section, the distribution of mHb axons in the core and lHb axons in the shell of the fr was nicely displayed (Fig. 1D).



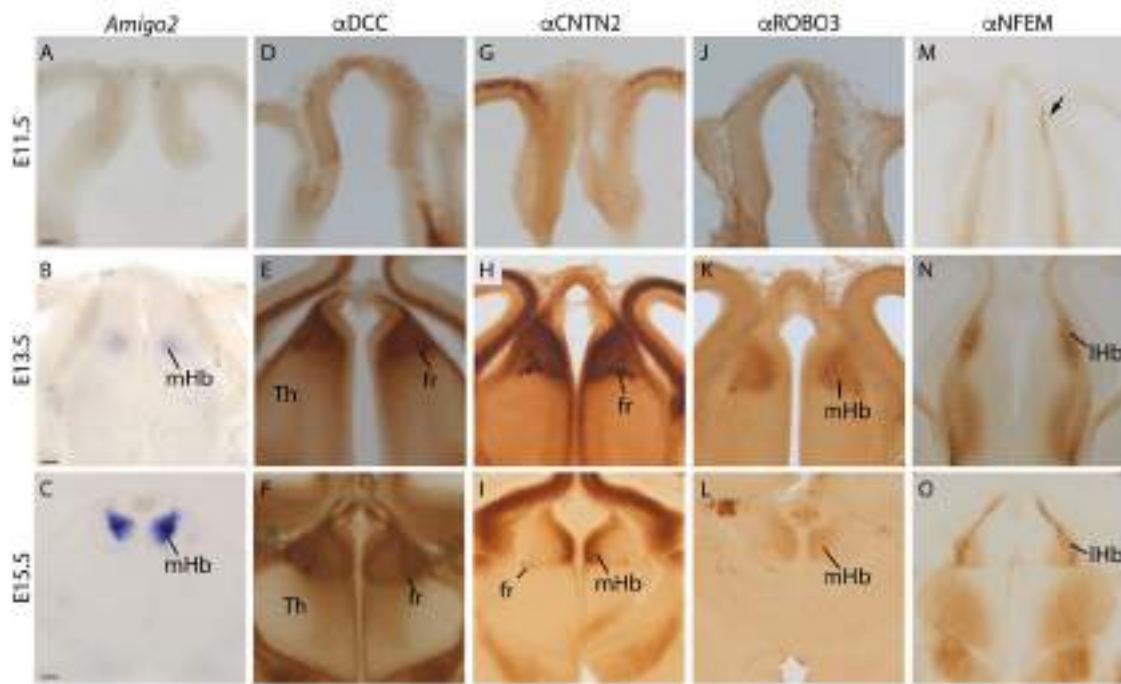


**Fig. 1: Differential behavior between mHb and IHb axons.** Sagittal sections (A, B, E, F) and coronal sections (C, D) of E15.5 mouse brains to describe the fr. (A) DiI labeling and

$\alpha$ TH immunohistochemistry. The LHb fr defasciculated and targeted the SNc meanwhile the mHb axons contacted the SNc pial surface to reach the IP in r1. (B)  $\alpha$ DCC and  $\alpha$ TH immunochemistry. DCC specifically labeled the mHb fr axons, which navigate superficially to the SNc. (C-F)  $\alpha$ -Cntn 2 as a mHb marker and  $\alpha$ -NF as a LHb marker immunochemistry. The distribution of the axons is different depending on their origin, mHb fr axons are placed in the core and LHb fr axons in the shell of the tract. Abbreviations: LHb, lateral habenula; LHb fr, lateral habenular axons of the fasciculus retroflexus, mHb, medial habenula; mHb fr, medial habenular axons of the fasciculus retroflexus; SNc, substantia nigra pars compacta. Scale bar: 100 $\mu$ m.

### ***Amigo2 expression in the developing habenula***

We studied *Amigo2* expression pattern, during embryonic development, in comparison to the distribution of well-known markers of the two habenular territories. These markers were used to describe the phenotype in our experimental approaches. At E11.5, *Amigo2* mRNA was not detected (Fig. 2A), meanwhile at E13.5 a faint expression was observed in the prospective mHb territory (Fig. 2B). Finally, at E15.5, we detected a strong expression in the mHb area (Fig. 2C). We compared this expression with the localization of three specific proteins of the mHb (DCC, CNTN2 and ROBO3) and one specific protein of the LHb (NFEM). DCC was also undetected at E11.5 (Fig. 2D), at E13.5 and E15.5 the mHb was strongly labelled (Fig. 2E, F). The labelling observed in the LHb is due to the arrival of the stria medullaris axons that are also positive to DCC (Shu et al., 1999). CNTN2 was not present at E11.5 (Fig. 2G). It also displayed a broad labelling of the mHb at E13.5 (Fig. 2H) and its expression concentrated in the periventricular area of the mHb at E15.5 (Fig. 2I). ROBO3 was also not found at E11.5 (Fig. 2J). It showed a broader expression at E13.5 (Fig. 2K) but at E15.5 displayed a wider expression domain in comparison to CNTN2 (Fig. 2L). Finally, the NFEM distribution in the LHb was already found at E11.5 (Fig. 2M), was incremented at E13.5 (Fig. 2N) and occupied all the LHb and the habenular commissure at E15.5 (Fig. 2O).

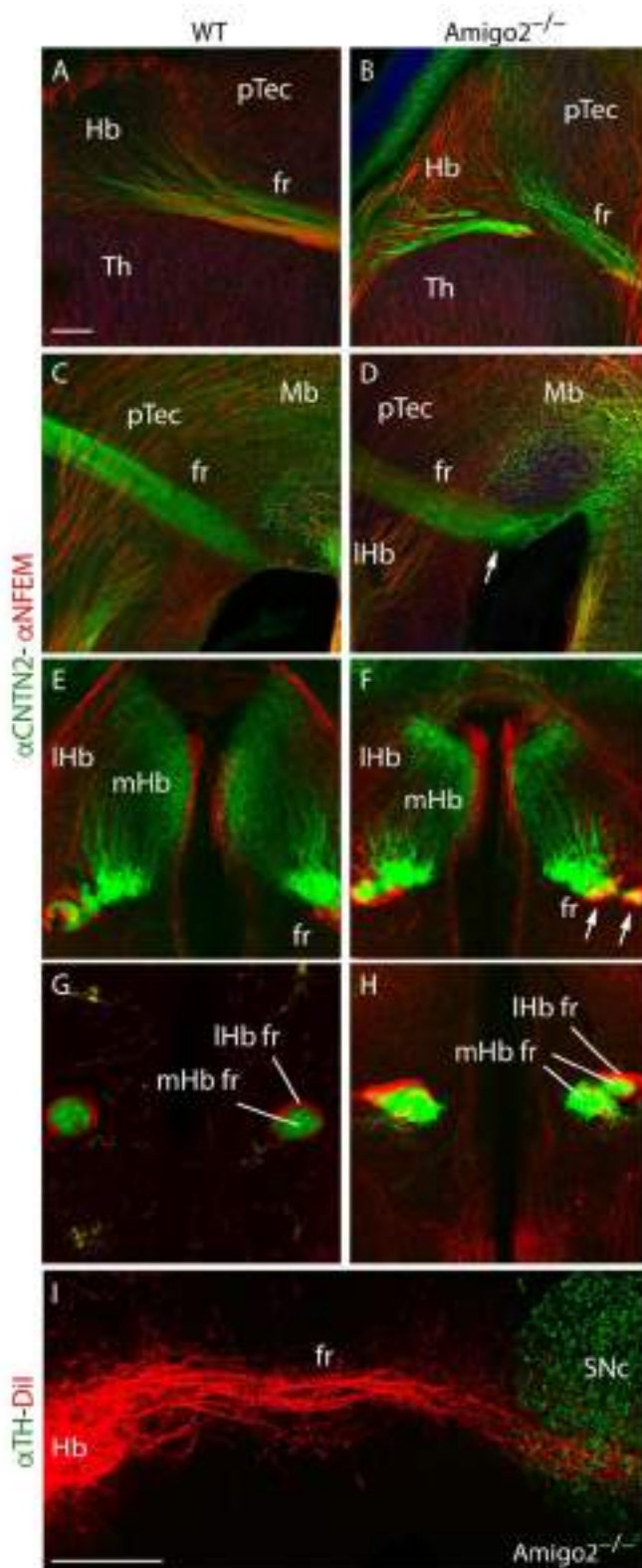


**Fig. 2: *Amigo2* expression in the habenular development.** Coronal sections of E11.5 (A, D, G, J, M), E13.5 (B, E, H, K, N) and E15.5 (C, F, I, L, O) brains. *Amigo2* in situ hybridization (A, B, C). Immunohistochemistry against DCC (D, E, F), CNTN2 (G, H, I) and ROBO3 (J, K, L) as mHb markers and NFEM (M, N, O) as lHb marker. The lHb neurons were firstly detected at E11.5 (arrow in M). We were able to follow, at E13.5 and E15.5, the development of both nuclei with all the selected markers. Abbreviations: fr, fasciculus retroflexus; lHb, lateral habenula; mHb, medial habenula; Th, thalamus. Scale bar: 200µm.

### ***Amigo2* loss of function phenotype**

With the aim to describe the effect of *Amigo2* lack of function in the fr development, we compared wild type and *Amigo2*<sup>-/-</sup> E15.5 brains. We observed in wild type sagittal sections, in the fr initial segment, CNTN2 positive mHb fasciculated fibers in the fr core meanwhile NFEM positive lHb axons conformed the shell of the tract (Fig. 3A). In mutant brains, we found a strong fasciculation delay in space, the CNTN2 positive axons occupied a broader territory and delayed their condensation until the ventral portion of the tract (Fig. 3B). In the wild type, in the diencephalic basal plate vicinity, we observed the tightly fasciculated mHb axons reaching the pial surface before turning caudally towards the hindbrain, meanwhile the lHb axons in the fr shell were not detectable in the lower thalamic basal plate (Fig. 3C). In the mutant, the initial fasciculation alterations observed are

in some way recovered. Nevertheless, some disorganization is observed between the mHb and IHb axons (arrow in Fig. 3D).

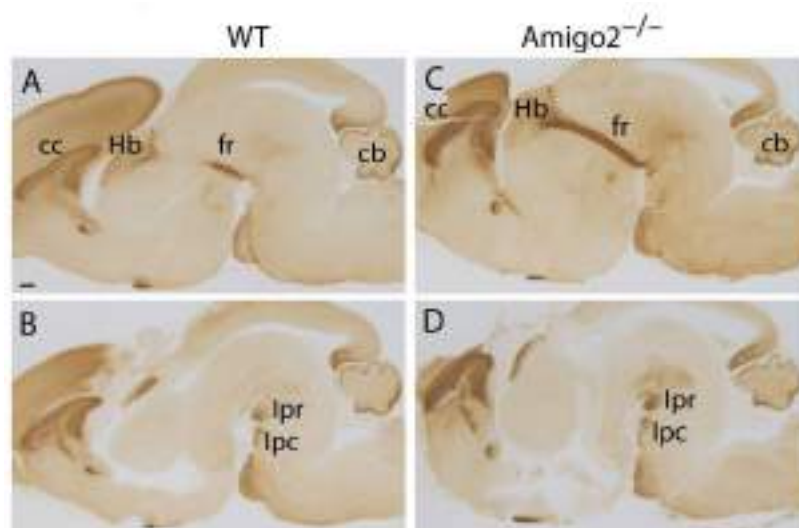


**Fig. 3: Study of the fr phenotype in *Amigo2*<sup>-/-</sup> mutant.**

E15.5 wild type brain sagittal section (A, C) and E15.5 *Amigo2*<sup>-/-</sup> brain sagittal section (B, D) at two different levels. Coronal sections of an E15.5 wild type (E, G) and an E15.5 *Amigo2*<sup>-/-</sup> mutant brain (F, H) at two different levels. All of them are stained with NFEM (as IHb marker) and CNTN2 (as mHb marker). DII labeling and  $\alpha$ TH immunocytochemistry in a sagittal section of an E15.5 *Amigo2*<sup>-/-</sup> mutant embryo (I). The tract was thicker in the mutant embryo and the axons were less fasciculated. Abbreviations: fr, fasciculus retroflexus; Hb, habenula; IHb, lateral habenula; IHb fr, lateral habenular axons of the fasciculus retroflexus; mHb, medial habenula; mHb fr, medial habenular axons of the fasciculus retroflexus; pTec, pretectum; SNc, substantia nigra pars compacta; Th, thalamus. Scale bar: 100 $\mu$ m.



In coronal sections, we nicely showed how the CNTN2 positive mHb axons fasciculated in the initial fr core segment. As well as the NFEM positive lHb fibers did as they reached the fr shell (Fig. 3E). In the mutant embryo, it was striking to observe how the mHb axons were unable to form a unique tract and also how the lHb fibers accompanied the different tracts generating its corresponding shells (arrows in Fig. 3F). In fr lower portions, we observed an individual tract with the mHb axons compacted in the core and the surrounding lHb fibers in the shell in the wild type (Fig. 3G). In the mutant, we were able to describe different levels of fasciculation, even between left-right sides, with not as strongly compacted tracts or even with the fibers divided in two isolated fascicles (Fig. 3H). This slightly asymmetric phenotype was side independent and inconstant. In order to get a general view of this fasciculation impairment in the mutant, we labelled the complete fr applying a Dil crystal in the habenular neuronal complex. After incubation, we analyzed the fr fibers distribution together with the SNC localization. The fibers maintained the fr trajectory in spite of their clear defasciculation (Fig. 3I) if we compared with the wild type (Fig. 1A). The fr was able to reach its final target and innervate the Ip nucleus (Electronic Supplementary Material 1).



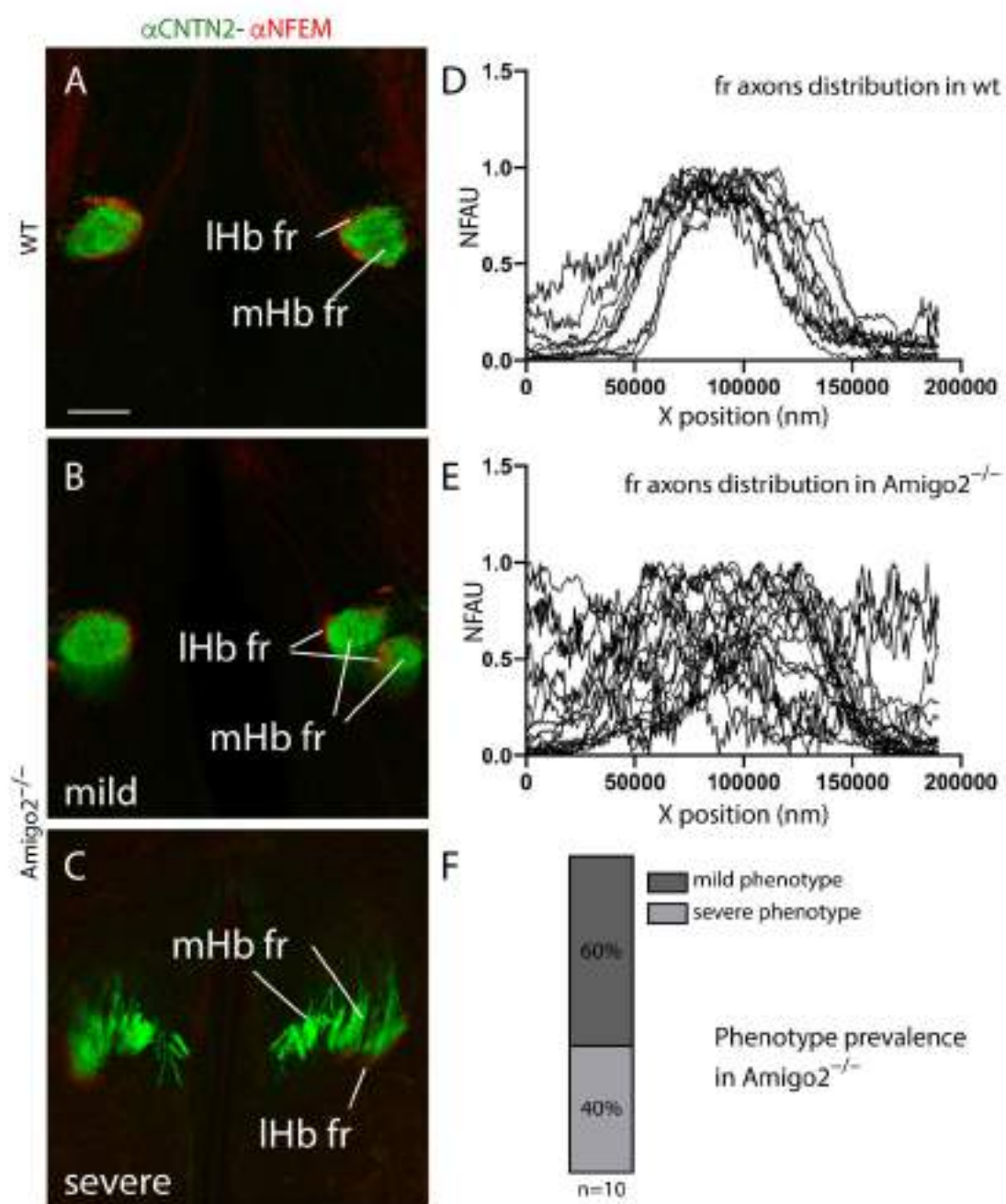
**ESM1: Normal mHb fr trajectory in *Amigo2*<sup>-/-</sup>.** Sagittal sections of E18.5 wild type (A, B) and *Amigo2*<sup>-/-</sup> brains (C, D) labelled by immunohistochemistry against CNTN2. In a lateral section we observed the mHb fr reaching the rhombomere 1 (A) and in a more medial section the two Ip nucleus main components (rostral and caudal) labelled by the

innervation of the CNTN2 positive mHb fr axons. In the *Amigo2*<sup>-/-</sup> a wider fr is observed following the expected trajectory (C) and how its fibers innervate with no obvious defect the Ip nucleus (D). Abbreviations: cb, cerebellum; cc, corpus callosum; fr, fasciculus retroflexus; Hb, habenula; Ipc, caudal part of the interpeduncular nucleus; Ipr, rostral part of the interpeduncular nucleus. Scale bar: 200µm.

### ***Phenotype quantification and variability***

Once the phenotype was described, we aimed to quantify the alteration observed. We analyzed twelve wild type (Fig. 4A) and twenty mutant fr (Fig. 4B, C). First of all, we become aware that the phenotype described in the mutant was not constant. In 60% of the samples, we described a mild phenotype with a defasciculated fr in two tracts (Fig. 4B, F), unilaterally and not always the same side, and in 40%, we observed a fr that displayed a bilateral strong defasciculation (Fig. 4C, F).

In order to quantify the fr fibers distribution, we selected a transversal section to the tract and analyzed the distribution of normalized fluorescent arbitrary units along the surface of the sectioned tract. The distribution on the wild type fr showed a compacted tract with its fibers occupying around 100 microns and a constant disposition between samples (Fig. 4D). Meanwhile, the mutant fr displayed a wider distribution with its axons covering an extension of more than 200 microns and a variable spread between the analyzed tracts (Fig. 4E). The difference in the distribution of the fr between wild type and mutants was compared by Kolmogorov-Smirnov test and the result was statistically significant ( $P < 0,0001$ ).

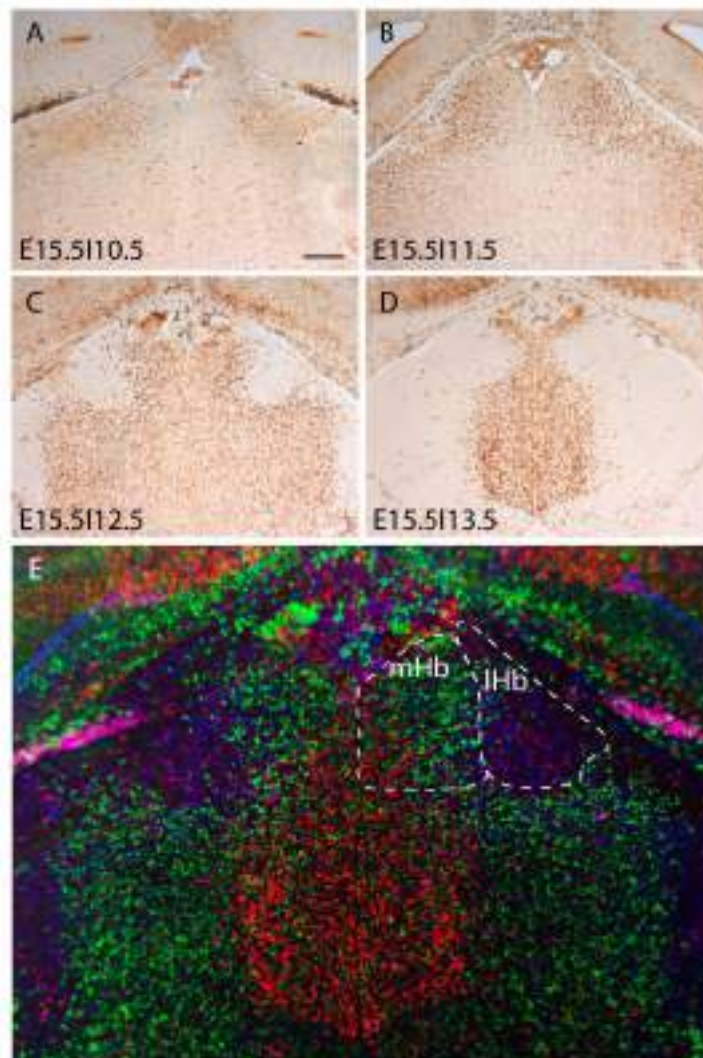


**Fig. 4: Classification of the fr phenotype in *Amigo2*<sup>-/-</sup> mutant.** (A) fr coronal section of a E15.5 wild type embryo; (B, C) fr coronal section of two E15.5 *Amigo2*<sup>-/-</sup> mutant embryo, (B) presents a mild phenotype and (C) a severe phenotype. Labeled against CNTN2 (as mHb marker) and NFEM (as LHb marker). The tract was less compacted and generated unilateral aberrant duplications of fr. (D, E) Graphical representation of the normalized arbitrary fluorescent unit distribution of the wild type (D; n=12) and *Amigo2*<sup>-/-</sup> mutant fr (E; n=20). (F) Graphical representation of the phenotype prevalence distribution in *Amigo2*<sup>-/-</sup> mutant tracts. Abbreviations: fr, fasciculus retroflexus; LHb fr, lateral habenular axons of the fasciculus retroflexus, mHb fr, medial habenular axons of the fasciculus retroflexus; NFAU; normalized fluorescent arbitrary units. Scale bar: 100 $\mu$ m.



### ***Amigo2* gain of function**

Once we described the *Amigo2* lack of function phenotype, we decided to study the effect of an *Amigo2* overexpression or gain of function in the habenular complex of wild type embryos. In order to select the right time window, we analyzed the birth dating and fate of the habenular neurons. The lHb neurons were born between E10.5 and E11.5 meanwhile the mHb neurons were born between E12.5 and E13.5 (Electronic Supplementary Material 2). We selected this period to target the mHb by electroporation of *Amigo2* functional vector in Organotypic nervous tissue cultures (ONTCs).



**ESM2: Birth-dating of the habenular neurons.** Coronal sections of E15.5 wild type brains. The embryos were collected at E15.5 after five BrdU injections during the designated day: 10.5 (A), 11.5 (B), 12.5 (C) and 13.5 (D). In E we show color-coded

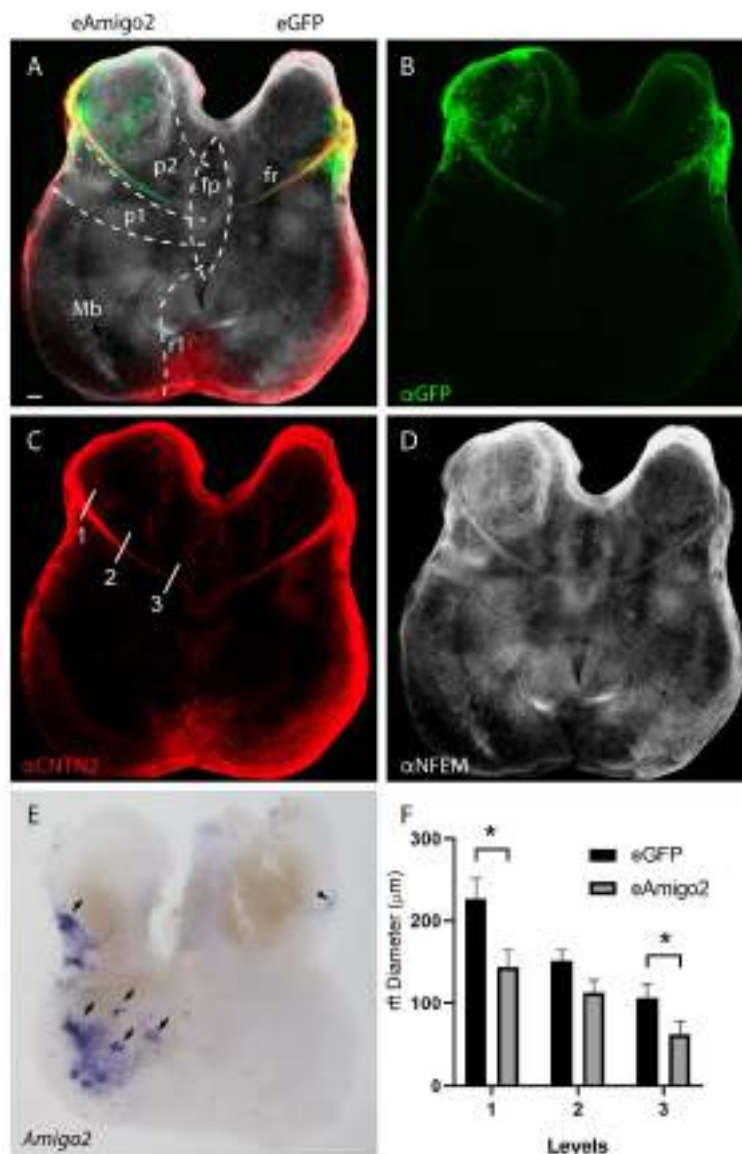
overlays of the previous images in order to get a general overview of the habenular birth date, E10.5 in magenta, E11.5 in blue, E12.5 in green and E13.5 in red. The LHb is born around E10.5 and E11.5 meanwhile the mHb is born around E12.5 and E13.5. Abbreviations: LHb, lateral habenula; mHb, medial habenula. Scale bar: 200 $\mu$ m.

On the left side of the wild-type ONTCs we electroporated *Amigo2* plus *Gfp* expressing vectors meanwhile in the right side we electroporated *Gfp* alone as a control (n=4). The electroporated area was easily identified by the GFP presence (Fig. 5A, B), the mHb axons behavior was displayed by CNTN2 (Fig. 5A, C) and the LHb axons by NFEM (Fig. 5A, D). The *Amigo2* functional vector activity was positively tested by in situ hybridization (Fig. 5E). In the control side, the *Amigo2* expression was found only in the Habenula (arrowhead in Fig. 5E) meanwhile in the experimental side it was found in an extended electroporated area (arrows in Fig. 5E). In order to quantify the phenotype observed, we selected three levels along the fr to measure the tract thickness, one close to the origin, one at the point of the caudal bending and one at the midpoint between the previous ones (1-3 in Fig. 5B). In the three levels, the electroporated tract diameter was thinner than in the controls. This phenomenon was observed not only in the mHb axons (Fig. 5C) but in the LHb axons (Fig. 5D). Nevertheless, only in the upper and lower points the difference was statistically significant ( $P < 0,05$  by Unpaired t-test in each level; Fig. 5F). Thus, an *Amigo2* overexpression in the habenular territory resulted in an fr extra-fasciculation.

### ***Amigo2*<sup>-/-</sup> phenotype rescue**

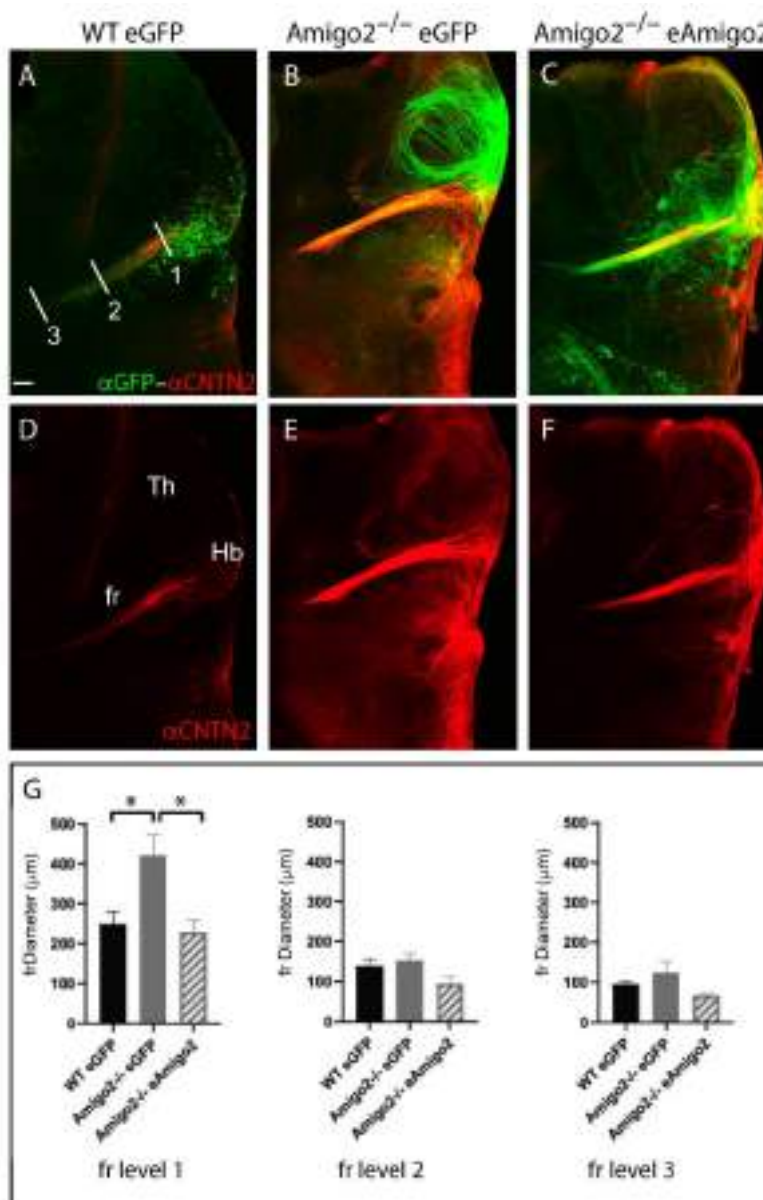
Finally, we decided to test if we could rescue the phenotype observed in the *Amigo2* mutant. We electroporated *Gfp* in wild type (Fig. 6A; n=3) and mutant Hb (Fig. 6B; n=3) as controls and *Amigo2* plus *Gfp* in mutant Hb (Fig. 6C; n=3). The fr behavior was shown by CNTN2 labelling and the diameter measures were done in the three levels described above. In comparison with the wild type (Fig. 6D), the *Gfp* electroporated mutant fr displayed a wider dimension (Fig. 6E) meanwhile the *Amigo2* electroporated mutant fr appeared compacted with a similar proportion to

the wild-type. Nevertheless, the statistical analysis demonstrated that only at the proximal level, the difference between the samples was statistically significant ( $P < 0,05$  by One-way ANOVA test in each level, Fig. 6G). Therefore, we were able to demonstrate that functional *Amigo2* is able to recover the phenotype observed in the mutant and that it is sufficient to recuperate the tract fasciculation.



**Fig. 5: Overexpression of Amigo2 in wild type ONTCs.** E13,5 wild type ONTCs electroporated with an *Amigo2+GFP* (left side) and *GFP* (right side) expressing vectors and after 72h of incubation (A-E). ONTC labelled by immunohistochemistry against GFP (B), CNTN2 (C) and NFEM (D). In the experimental side we labelled the three points of measurement. ONTC labelled by in situ hybridization against *Amigo2*, the arrow indicates ectopic expression in the experimental side, the arrowhead indicates the endogenous expression in the control side (E). Significance was analyzed by Unpaired t-tests. Significant differences ( $* < 0,05$ ) among *Amigo2* electroporated and control fr are found at

level 1 and 3 (F). Abbreviations: fp; floorplate; fr; fasciculus retroflexus, Mb, midbrain; p1, prosomere 1 (preteectum); p2, prosomere 2 (thalamus); p3, prosomere 3; r1, rhombomere 1. Scale bar: 200 $\mu$ m.



**Fig. 6: *Amigo2*<sup>-/-</sup> phenotype recovery.** E13,5 wild type and mutant ONTCs electroporated with an *Amigo2*+*GFP* or *GFP* expressing vectors and after 72h of incubation (A-F). Wild-type ONTC *GFP* electroporated (A, D), *Amigo2*<sup>-/-</sup> *GFP* electroporated (B, E) and *Amigo2*<sup>-/-</sup> *Amigo2*+*GFP* electroporated (C, F). Labelled against GFP and CNTN2 by immunohistochemistry. The numbers indicated in A indicate the measurement points. Significance was analyzed by One-way ANOVA tests. Significant differences (\*<0,05) were found among wild type and *Amigo2* electroporated mutant fr at level 1 and also between

*Amigo2* electroporated mutant and GFP electroporated mutant fr at level 1 (G). Abbreviations: fr, fasciculus retroflexus; Hb, habenula; Th, thalamus. Scale bar: 200 $\mu$ m.

## Discussion

Axonal behavior is regulated by surface molecules that controls the generation of fascicles by fasciculation processes and the reception of short and long signals to guide the growing axons toward their final targets (Chédotal and Richards, 2010; Kolodkin and Tessier-Lavigne, 2011; Spead and Poulain, 2020). The fr is a tightly packed tract originated in the habenular complex. Its fibers are segregated in a core region, axons from the mHb, and a shell area, axons from the lHb (Herkenham and Nauta, 1979; Ichijo and Toyama, 2015). Under an evolutionary point of view, it has been proposed that lampreys and teleost Habenula is homologous to the mammal mHb and that the lHb would have appeared later in vertebrate evolution (Concha and Wilson, 2001). This theory would nicely fit with the mammal fr organization of the mHb axons in the core and the late evolutionary lHb axons in the shell. All the fr axons share the same initial behavior but differ in the final segment. What means that they follow a common initial guidance molecule and later the lHb axons display a defasciculation process to follow their own trajectory. The fasciculation/defasciculation processes involved in the fr development are unknown. Some of the well-known guidance molecules, as DCC, ROBO or EPHRINS among others promote the fasciculation (Spead and Poulain, 2020). Nevertheless, the specific surface proteins that interact in this specific tract are unknown. We have selected, from a group of these specific surface molecules of the mHb, *Amigo2* as a candidate to play a role in the fasciculation behavior of the mHb axons (Schmidt et al., 2014).

Our results have demonstrated that *Amigo2* plays a role in the fr fasciculation process but not in its guidance mechanisms, as the fascicle is able to reach its final target in the *Amigo2* absence. The lack of function results in a variable fr defasciculation that tends to be slightly asymmetric. The mammalian Hb, as well as its fr, is a rather symmetric structure in contrast to reptiles, amphibia and fishes

where strong asymmetries have been described (Concha and Wilson, 2001; Bianco and Wilson, 2009). Nevertheless, subtle differences have been also described in some rodent strains (Concha and Wilson, 2001). Thus, the *Amigo2* alteration may have uncovered these subtle heterogeneities between both sides and the resulting phenotype has different penetrance.

It is rational to think that a particular axon contains a surface molecules cocktail that could have redundant roles in the behavior of the neuronal fiber. Moreover, the capability of the different *Amigo* members to interact in a heterophilic manner together with these redundant roles could explain the variability in the phenotype that we have observed when we removed only one of these surface proteins. Small alterations in the combination of molecules resulted in a severe phenotype meanwhile the normal combination produced the mild phenotype. It is remarkable, that the mHb axons defasciculation also produced an alteration in the fasciculation process of the lHb axons. Once the fr core is disorganized, the shell is not able to assemble properly. This result exhibits the strong interaction between lHb and mHb axons in the fr.

Finally, *Amigo2* electroporation incremented the fr fasciculation in the wild type. Meanwhile, in the mutant the altered phenotype observed is rescued but it did not reach the electroporated wild type level. Thus, *Amigo2* is determinant to define the fasciculation level of the fr and our results allowed us to postulate that *Amigo2* is involved in the fasciculation of the fr. This process must involve other surface molecules that in synchrony with *Amigo2* are able to compact this fascicle.

## **Material & methods**

### ***Mouse strains***

For staging, the day when the vaginal plug was detected was considered as embryonic day 0.5 (E0.5). All mouse manipulation and experimental procedures were performed according to the directives of the Spanish and European Union governments and the protocols were approved by the Universidad Miguel

Hernández OIR Committee (2016/VSC/PEA/00190). The *Amigo2* knock-out line generation and genotype was previously described in Li et al., 2017.

### ***In situ hybridization (ISH) and immunohistochemistry (IHC)***

Mouse embryo brains were fixed overnight in 4% Paraformaldehyde (PFA) in Phosphate Buffered Saline (PBS). Samples were agarose-embedded and sectioned at 100  $\mu$ m by vibratome.

For ISH, the tissue was post fixed in 4% PFA. Next, it was rinsed in PBS, and pre-hybridized with hybridization buffer [Deionized Formamide (Ambion 50%), Salt sodium citrate (SSC 5x, pH 5.3), Heparin (Sigma-Aldrich 50 lg/ml), Tween 20 (Sigma-Aldrich, 0.1%)]. The Digoxigenin-labeled RNA probe (*Amigo2*, BC095990) was denaturalized at 80°C. The tissue was incubated in hybridization buffer with the probe over night at 65°C. The samples were washed (SSC 2x pH4.5, Formamide 50 % and SDS 1%, water 50%) 5 times at 65°C. Afterwards, the samples were washed with MABT 1x (NaCl (150 mM), maleic acid (100 mM, Sigma-Aldrich) NaOH (Sigma-Aldrich) to obtain pH 7.5, and Tween 20 0.1%) and the tissue was blocked in Sheep Serum 20%, (Sigma-Aldrich, #S3772) and 2% of blocking reagent (Roche; #11096176001) in MABT 1x, and incubated overnight with an alkaline phosphatase-coupled anti-digoxigenin antibody (Roche Diagnostics, #1109327 4910). Next day, the samples were extensive washed with MABT 1X to remove the traces of non-specific bound antibodies. Before the colorimetric reaction, the samples were incubated in NTMT [NaCl (0.1 M), Tris-HCl (0.2M, pH9.5), MgCl<sub>2</sub> (0.05 M) and Tween 20 (0.1%)]. The NBT/BCIP (Boehringer, Mannheim) was used as a chromogenic substrate to detect the probes. The alkaline phosphatase reacts with this substrate producing a solid precipitate.

For IHC, it was performed as previously described (Murcia-Ramón et al., 2020). The primary antibodies used were:  $\alpha$ BrdU (1:200; M 0744/ Dako),  $\alpha$ CNTN2 (1:500; AF4439/ RD Systems),  $\alpha$ DCC (1:100; #sc-6535/ Santa Cruz),  $\alpha$ NFEM (1:1000; AB1987/Chemicon),  $\alpha$ ROBO3 (1:300; AF3076/Rdsystems) and  $\alpha$ TH (1:1000; AB152/ Sigma-Aldrich).



### ***Axonal tracing***

For axonal tracing, the embryonic brains were fixed for 1 hour in 4% PFA. Small Dil crystals (1,1'-dioctadecyl 3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate; Molecular Probes) were inserted into the habenular nuclei. The labeled brains were incubated at 37°C in 4% PFA until the tracers had diffused sufficiently. The brains were sectioned and IHC processed without detergent to avoid the Dil signal loss.

### ***Birth dating by BrdU labeling***

For detection of the peak of neurogenic proliferation, BrdU was administered intraperitoneally to the pregnant females (3 mg/100 g body weight) every 2 h, for a period of 10 h (five injections in total) starting at desired stages. The embryos were extracted at E15.5.

### ***Organotypic nervous tissue culture (ONTCs)***

They were developed as previously described (Moreno-Bravo et al., 2016). In brief, E13.5 embryos neural tubes were dissected and opened along the dorsal midline and telencephalic vesicles and hypothalamus regions were removed. The fr developing area was kept intact. Finally, the dissected explants were cultured like an open book with the ventricular surface looking upwards on a polycarbonate membrane (Whatman® Nuclepore Track-Etched Membranes). The ONTCs in the incubator 3 hours at 37°C, 5% CO<sub>2</sub> until the electroporation process.

### ***Overexpression of Amigo2 in ONTCs experiment***

Amigo2 (BC095990) and/or PCX-GFP expressing vectors were focally electroporated in ONTCs. For the electroporation procedure the ONTCs with its supporting membrane was placed onto an 1% agarose block within a setup of two

horizontally oriented platinum electrodes. An 1% agarose column was attached to the mobile upper electrode. Two electric pulses of 80V and 5ms, spaced 500ms using a square pulse electroporator were applied. The electroporated ONTCs were incubated 72 hours at 37°C, 5% CO<sub>2</sub> in enriched DMEM.

### ***ONTCs immunocytochemistry***

The incubated ONTCs were fixed in 4% PFA for 3 hours. After dehydration in methanol, the samples were bleached using 6% Hydrogen Peroxide solution in 100% methanol O/N at 4°C. Samples were blocked using PBS-GT, PBS containing 0,2% Gelatin (Prolabo) and 0.5% Triton X-100 (Sigma-Aldrich) O/N at RT and then incubated in agitation for 7 days at 37°C with  $\alpha$ CNTN2 (1:500; AF4439/ RD Systems),  $\alpha$ NFEM (1:1000; AB7794/Abcam) and  $\alpha$ GFP (1:500: GFP-1020/ AVES). This was followed by six washes of 30 min in PBS-GT 0.5% at RT and incubated with the secondary antibodies O/N at 37°C. ONTCs were counterstained with DAPI diluted in PBS at 0,001% and incubated 10 min. at room temperature.

### ***Image Processing and Quantification.***

Bright field and fluorescent images were acquired with a camera (Leica DFC500) associated with a stereomicroscope (Leica Fluo-III) and with Leica Confocal SPEII respectively. The figures were composed with Adobe System software. The axon behavior in the *Amigo2* mutant and control was quantified by the red and green fluorophore distribution in the fr area by the Plot Profile tool of the Fiji software. The fr phenotype in *Amigo2* mutant, control and electroporated ONTCs was quantified in three fixed levels along the longitudinal aspect of the fascicle by Fiji software. The statistical analysis was performed with Kolmogorov-Smirnov test (Fig. 4), Unpaired t-tests (Fig. 5) and One-way ANOVA test (Fig. 6) using GraphPad Prism software.

## Acknowledgements

Work supported by MINECO/AEI/FEDER (BFU2013-48230) to E. Puelles and D. Echevarría; MINECO/AEI/FEDER (SAF2017-83702-R), GVA (PROMETEO/2018/041), ISCIII (“RD16/001/0010”), co-funded by ERDF/ESF, “Investing in your future”, and FTPGB (FTPGB18/SM) to S. Martinez; MECD (FPU16/03853) to V. Company. The Institute of Neurosciences is a “Centre of Excellence Severo Ochoa”. We thank Dr. H. Rauvala for sharing Amigo2<sup>-/-</sup> strain.

## References

Aizawa H, Amo R, Okamoto H (2011) Phylogeny and ontogeny of the habenular structure. *Front Neurosci* 5:1–7. <https://doi.org/10.3389/fnins.2011.00138>

Bianco IH, Wilson SW (2009) The habenular nuclei: A conserved asymmetric relay station in the vertebrate brain. *Philos Trans R Soc B Biol Sci* 364:1005–1020. <https://doi.org/10.1098/rstb.2008.0213>

Braisted JE, Catalano SM, Stimac R, et al (2000) Netrin-1 promotes thalamic axon growth and is required for proper development of the thalamocortical projection. *J Neurosci* 20:5792–5801. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.20-15-05792.2000>

Bühler A, Carl M (2021) Zebrafish tools for deciphering habenular network-linked mental disorders. *Biomolecules* 11:1–18

Chédotal A, Richards LJ (2010) Wiring the brain: The biology of neuronal guidance. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2:. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a001917>

Company V, Andreu-Cervera A, Madrigal MP, et al (2021) Netrin 1-Mediated Role of the Substantia Nigra Pars Compacta and Ventral Tegmental Area in the Guidance of the Medial Habenular Axons. *Front Cell Dev Biol* 9:1183. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.682067>

Concha ML, Wilson SW (2001) Asymmetry in the epithalamus of vertebrates. *J Anat* 199:63–84. <https://doi.org/10.1046/j.1469-7580.2001.19910063.x>

Duman RS, Sanacora G, Krystal JH (2019) Altered Connectivity in Depression: GABA and Glutamate Neurotransmitter Deficits and Reversal by Novel Treatments. *Neuron* 102:75–90

Fakhoury M (2017) The habenula in psychiatric disorders: More than three decades of translational investigation. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 83:721–735

Fakhoury M (2018) The dorsal diencephalic conduction system in reward processing: Spotlight on the anatomy and functions of the habenular complex. *Behav Brain Res* 348:115–126. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2018.04.018>

Fontanals-Cirera B, Hasson D, Vardabasso C, et al (2017) Harnessing BET Inhibitor Sensitivity Reveals AMIGO2 as a Melanoma Survival Gene. *Mol Cell* 68:731-744.e9. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.11.004>

Funato H, Saito-Nakazato Y, Takahashi H (2000) Axonal growth from the habenular nucleus along the neuromere boundary region of the diencephalon is regulated semaphorin 3F and netrin-1. *Mol Cell Neurosci* 16:206–220. <https://doi.org/10.1006/mcne.2000.0870>

Giger RJ, Cloutier JF, Sahay A, et al (2000) Neuropilin-2 is required in vivo for selective axon guidance responses to secreted semaphorins. *Neuron* 25:29–41. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80869-7](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80869-7)

Gimelli S, Makrythanasis P, Stouder C, et al (2011) A de novo 12q13.11 microdeletion in a patient with severe mental retardation, cleft palate, and high myopia. *Eur J Med Genet* 54:94–96. <https://doi.org/10.1016/j.ejmg.2010.09.008>

Guida V, Calzari L, Fadda MT, et al (2021) Genome-Wide DNA Methylation Analysis of a Cohort of 41 Patients Affected by Oculo-Auriculo-Vertebral Spectrum (OAVS). *Int J Mol Sci* 22:1–19. <https://doi.org/10.3390/ijms22031190>

Herkenham M, Nauta WJH (1979) Efferent connections of the habenular nuclei in the rat. *J Comp Neurol* 187:19–47. <https://doi.org/10.1002/cne.901870103>

Hu H, Cui Y, Yang Y (2020) Circuits and functions of the lateral habenula in health and in disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 21:277–295

Huo T, Canepa R, Sura A, et al (2017) Colorectal cancer stages transcriptome analysis. *PLoS One* 12:1–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0188697>

Ichijo H, Toyama T (2015) Axons from the medial habenular nucleus are topographically sorted in the fasciculus retroflexus. *Anat Sci Int* 90:229–234. <https://doi.org/10.1007/s12565-014-0252-z>

Kanda Y, Osaki M, Onuma K, et al (2017) Amigo2-upregulation in tumour cells facilitates their attachment to liver endothelial cells resulting in liver metastases. *Sci Rep* 7:1–13. <https://doi.org/10.1038/srep43567>

Kantor DB, Chivatakarn O, Peer KL, et al (2004) Semaphorin 5A is a bifunctional axon guidance cue regulated by heparan and chondroitin sulfate proteoglycans. *Neuron* 44:961–975. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2004.12.002>

Kolodkin AL, Tessier-Lavigne M (2011) Mechanisms and molecules of neuronal wiring: A primer. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 3:1–14

Kuja-Panula J, Kiiltomäki M, Yamashiro T, et al (2003) AMIGO, a transmembrane protein implicated in axon tract development, defines a novel protein family with leucine-rich repeats. *J Cell Biol* 160:963–973. <https://doi.org/10.1083/jcb.200209074>

Laeremans A, Nys J, Luyten W, et al (2013) AMIGO2 mRNA expression in hippocampal CA2 and CA3a. *Brain Struct Funct* 218:123–130. <https://doi.org/10.1007/s00429-012-0387-4>

Li Z, Khan MM, Kuja-Panula J, et al (2017) AMIGO2 modulates T cell functions and its deficiency in mice ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain Behav Immun* 62:110–123. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2017.01.009>

Liu Y, Yang J, Shi Z, et al (2021) In vivo selection of highly metastatic human ovarian cancer sublines reveals role for AMIGO2 in intra-peritoneal metastatic regulation. *Cancer Lett* 503:163–173. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2021.01.024>

Miyake N, Tonoki H, Gallego M, et al (2004) Phenotype-genotype correlation in two patients with 12q proximal deletion. *J Hum Genet* 49:282–284. <https://doi.org/10.1007/s10038-004-0144-5>

Moreno-Bravo JA, Martinez-Lopez JE, Madrigal MP, et al (2016) Developmental guidance of the retroflex tract at its bending point involves Robo1-Slit2-mediated

floor plate repulsion. *Brain Struct Funct* 221:.. <https://doi.org/10.1007/s00429-014-0932-4>

Murcia-Ramón R, Company V, Juárez-Leal I, et al (2020) Neuronal tangential migration from Nkx2.1-positive hypothalamus. *Brain Struct Funct* 225:.. <https://doi.org/10.1007/s00429-020-02163-x>

Nakamura S, Kanda M, Shimizu D, et al (2020) AMIGO2 Expression as a Potential Prognostic Biomarker for Gastric Cancer. *Anticancer Res* 40:6713–6721. <https://doi.org/10.21873/anticancerres.14694>

Nieuwenhuys R, Voogd J, van Huijzen C (2008) Greater Limbic System. In: *The Human Central Nervous System, Fourth Edi.* Springer Verlag, pp 917–941

Nikolenko VN, Oganessian M V., Rizaeva NA, et al (2020) Amygdala: Neuroanatomical and morphophysiological features in terms of neurological and neurodegenerative diseases. *Brain Sci.* 10:1–18

Ono T, Sekino-Suzuki N, Kikkawa Y, et al (2003) Alivin 1, a novel neuronal activity-dependent gene, inhibits apoptosis and promotes survival of cerebellar granule neurons. *J Neurosci* 23:5887–5896. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.23-13-05887.2003>

Park H, Lee S, Shrestha P, et al (2015) AMI GO2, a novel membrane anchor of PDK1, controls cell survival and angiogenesis via Akt activation. *J Cell Biol* 211:619–637. <https://doi.org/10.1083/jcb.201503113>

Perälä NM, Immonen T, Sariola H (2005) The expression of plexins during mouse embryogenesis. *Gene Expr Patterns* 5:355–362. <https://doi.org/10.1016/j.modgep.2004.10.001>

Petrovic M, Schmucker D (2015) Axonal wiring in neural development: Target-independent mechanisms help to establish precision and complexity. *BioEssays* 37:996–1004. <https://doi.org/10.1002/BIES.201400222>

Rengasamy Venugopalan S, Farrow E, Sanchez-Lara PA, et al (2019) A novel nonsense substitution identified in the AMIGO2 gene in an Occulo-Auriculo-Vertebral spectrum patient. *Orthod Craniofacial Res* 22:163–167. <https://doi.org/10.1111/ocr.12259>

Roman E, Weininger J, Lim B, et al (2020) Untangling the dorsal diencephalic conduction system: a review of structure and function of the stria medullaris, habenula and fasciculus retroflexus. *Brain Struct. Funct.* 225:1437–1458

Sahay A, Molliver ME, Ginty DD, Kolodkin AL (2003) Semaphorin 3F is critical for development of limbic system circuitry and is required in neurons for selective CNS axon guidance events. *J Neurosci* 23:6671–6680. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.23-17-06671.2003>

Schmidt ERE, Brignani S, Adolfs Y, et al (2014) Subdomain-mediated axon-axon signaling and chemoattraction cooperate to regulate afferent innervation of the lateral habenula. *Neuron* 83:372–387. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.05.036>

Shu T, Valentino KM, Seaman C, et al (1999) Expression of the netrin-1 receptor, deleted in colorectal cancer (DCC), is largely confined to projecting neurons in the developing forebrain. *J Comp Neurol* 416:201–212. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9861\(20000110\)416:2<201::AID-CNE6>3.0.CO;2-Z](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9861(20000110)416:2<201::AID-CNE6>3.0.CO;2-Z)

Sonzogni O, Haynes J, Seifried LA, et al (2018) Reporters to mark and eliminate basal or luminal epithelial cells in culture and in vivo. *PLoS Biol* 16:. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2004049>

Spead O, Poulain FE (2020) Trans-axonal signaling in neural circuit wiring. *Int. J. Mol. Sci.* 21:1–19

Wagner F, Stroh T, Veh RW (2014) Correlating habenular subnuclei in rat and mouse by using topographic, morphological, and cytochemical criteria. *J Comp Neurol* 522:2650–2662. <https://doi.org/10.1002/cne.23554>

Wang L, Marquardt T (2013) What axons tell each other: axon–axon signaling in nerve and circuit assembly. *Curr Opin Neurobiol* 23:974–982. <https://doi.org/10.1016/J.CONB.2013.08.004>

Worzfeld T, Puschel AW, Offermanns S, Kuner R (2004) Plexin-B family members demonstrate non-redundant expression patterns in the developing mouse nervous system: an anatomical basis for morphogenetic effects of Sema4D during



development. *Eur J Neurosci* 19:2622–2632. <https://doi.org/10.1111/j.0953-816X.2004.03401.x>

Zhao X, Kuja-Panula J, Sundvik M, et al (2014) Amigo adhesion protein regulates development of neural circuits in zebrafish brain. *J Biol Chem* 289:19958–19975. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.545582>

## **Agradecimientos**



## Agradecimientos

Llevaba queriendo escribir los agradecimientos de la tesis casi desde antes de empezarla, y, sin embargo, que difícil resulta ahora hacerlo, cuando tienes que resumir 5 años de gracias infinitas en unas pocas líneas.

Empecé la tesis en un momento complicado de mi vida personal, aún en tratamiento por una leucemia que había puesto en jaque todo lo que había aprendido hasta el momento, y esto, que podría ser simplemente una circunstancia más, ha marcado no sólo mi viaje de estos últimos años, sino el de todas las personas que han viajado conmigo, algunas de ellas incluso sin saberlo. Las limitaciones han sido muchas y muy variadas, y estoy segura de que no podría haber terminado esta etapa y estar escribiendo esto hoy si no hubiese sido por que todos los que aparecen aquí, y otros muchos que no caben, me han ayudado de infinidad de maneras. No puedo empezar, pues, sin agradecer a todo aquellos que ya me acompañaban en mi barco, por haberme ayudado a llegar una vez más a puerto, y a todos aquellos nuevos “marineros” que no habéis dudado ni un momento en uniros en esta nueva etapa y empezar a remar conmigo, cómo si este fuese vuestro viaje también. Gracias, porque esta tesis no es otra cosa que el resultado del trabajo de un gran equipo.

De las personas que seguramente merezcan mi gracias más grande, son mis directores de tesis. No sólo por haberme enseñado todo y más sobre ciencia, sino por haberme inculcado el gusto por aprender, a ser curiosa, a no conformarme. Sois, como profesores, todo lo que yo aspiro a ser algún día, pero es que además vuestra calidad humana es incuestionable. Que orgullosa me siento cuando me encuentro a alguien y lo primero que me dicen es eso de “tus jefes son los mejores”. Sois grandes científicos, pero enormes como personas.

Gracias, por haber priorizado siempre mi bienestar personal. Por haber cuidado de mí, aunque eso haya implicado tener que ayudarme a cargar, transportar o desenchufar, venir a recogerme o llevarme, llamar una a una a las mil farmacias de la provincia, hacer porras para ayudarme a llevar mejor los días difíciles o incluso obligarme a quedarme en casa cuando mis defensas no estaban a la altura. Gracias, además, por haber confiado en mí más que yo misma, y haberme ayudado a conseguir mis logros. Sois mi familia, mi referente, mi ejemplo a seguir.

Edu, mi director de tesis. Sin duda alguna, de las mejores decisiones que he tomado en mi vida fue la de dejarlo todo por intentar conseguir una beca para que fueras tú mi mentor. Y mira todo lo que me has ayudado a conseguir, lo que hemos conseguido juntos. Gracias por la oportunidad de conocer tu mundo, de convertir el laboratorio en mi nuevo hogar. Gracias por explicarme una y otra vez las cosas que no entiendo, por darme la confianza necesaria para lograr sacar el mejor potencial de alguien tan insegura como yo. Por todas y cada una de nuestras enriquecedoras conversaciones. Solo necesito escucharte eso de “no te preocupes Vero, que esto lo tenemos hecho” para saber, que no solo saldrá, sino que lo hará estupendamente. Eres la amabilidad personificada, la eterna sonrisa, un trabajador incansable, la sabiduría. Pasar tanto tiempo contigo me ha servido para aprender absolutamente de todo, del cerebro por descontado, pero no hay un día que no aprenda una cosa nueva, desde por qué el maíz se convierte en palomita, hasta el origen de la palabra “absentismo”. Gracias siempre por tantísimas cosas que has hecho por mí. Siempre estaré orgullosa de poder contar que fui tu primera TFG, y que desde entonces sigo aquí. Ten la certeza de que vayas dónde vayas en el futuro, yo voy contigo. Me pido en tu equipo, siempre.

Diego, gracias por ayudarme a crecer tantísimo, llevándome a Bielorrusia (espero acompañarte mínimo 20 veces más), dejándome ser tu mano derecha en la semana del cerebro, contando conmigo para todas tus aventuras. El miedo a embarcarme en ellas siempre se diluye gracias a la certeza de que, aunque siempre me animes a andar sola, cuando me he dado la vuelta porque te he necesitado siempre has estado ahí, ante cualquier duda, siempre dispuesto a ayudarme o a salvar mis errores. Gracias por ser empuje y apoyo siempre. Por llamarme todas las veces que hiciera falta a Niza para asegurarte que estaba bien, que no me venía abajo. Por todas las charlas que han servido para calmarme cuando estaba al borde de dejarlo todo, por luchar porque me vaya bien en mi carrera profesional con tanta fuerza. Por celebrar todos mis triunfos de vida personal y profesional como si fuesen tuyos. Por tu capacidad para motivar. Vale la pena escucharte decir una y otra vez eso de “cuando llegaste no apostaba un duro por ti” porque siempre va seguido de un “y has conseguido cosas increíbles”. Ojalá aprender a cuidar de los míos como haces tú.

Os admiro.

Paqui, el alma de nuestro laboratorio. Has sido en estos años, un pilar imprescindible, como técnico para mi tesis (gracias siempre por tu ayuda incansable), pero cómo amiga, compañera, psicóloga e incluso madre para mí. Gracias por haberme cuidado tanto. Siendo tan diferentes, qué feliz me hace que compartamos tantos valores: la importancia de la familia, la lealtad con quienes queremos, el esfuerzo inagotable. Aún no me explico cómo haces para llegar en el día a día a todo y aun así tener tiempo para ayudarnos a cada uno de nosotros. Admiro lo valiente y luchadora que eres. Ojalá no perder nunca nuestros cafés, han sido oasis en el desierto durante toda esta etapa.

Salva, el gran jefe. Gracias por haber creado esta gran familia, abrirnos las puertas de tu casa y ser soporte de cada uno de nuestros proyectos. Gracias también a Emilio, por tu buena disposición y amabilidad infinitas, por cada pregunta en los labmeeting que nos hacen mejorar. Gracias a cada uno de los miembros del laboratorio, aquí y en Murcia. En especial a aquellos con los que he tenido la suerte de convivir: Alicia siempre con una sonrisa contagiosa de energía; Ana y Raquel, siempre dispuestas a ayudar; Claudia, ánimo que puedes con todo y antes de que te des cuenta, lo tienes hecho; Tono, espero que te vaya genial, echo de menos aquellas tardes de charlas, ¡vuelve!; Mari paz, siempre dando ánimos y buenas palabras; Marusa, por tenerlo todo bajo control; Mari Carmen Lillo, ha sido un placer compartir zamburiñas y viajes a Bielorrusia contigo, ojalá sólo sea el principio; Nica, has llegado el último a la familia, pero ya te has ganado un puesto de “honor”, gracias por cada palabra de ánimo, por todos los consejos, por tu amabilidad, pero deja de traer bizcochos irresistibles o tendremos que hablar seriamente.

A lo largo de todos estos años, he coincidido con muchas personas en el INA, con las que he compartido mucho más que el mundo científico.

Empecé la tesis con la mejor de las compañías, mi “Neural tube team”. Me inicié en esta andadura con ellos y fue gracias a eso, a lo que no salí corriendo aquel primer año en que todo era novedad para mí. Fran, echo de menos debatir juntos de la vida; Adri, siempre tan atento y bonito; Sari, que bonito fue tenerte y cuánto aprendí de ti; Carla, sólo tú y yo sabemos la intensidad que vivimos ese año, fuiste mi mayor apoyo y no puedo alegrarme más de todo lo bonito que te esté por venir. Iris, hemos compartido un sinfín de experiencias, y la tesis no podía ser menos: primero fuiste

de mis mejores profesoras, luego tuve la oportunidad de ser tu amiga y, por si fuera poco, terminamos siendo compis de trabajo en el lab y departamento... No sé cuántas aventuras más nos esperan, pero no tengo ninguna duda de que podremos con ellas.

Junior, cuanto echo de menos tus visitas diarias a Edu, en las que me poníais al día de los entresijos del INA. Compartimos poco tiempo y ojalá hubiese sido mucho más, pero fue un placer poder disfrutarlo.

Pili, hemos compartido viajes e incluso varias horas en el Imaris. Te agradeceré siempre tu disposición para ayudarme cada una de las veces que te he necesitado. Eres un sol. No sé si te lo he dicho nunca, pero yo de mayor quiero ser como tú.

Quique y Laura, nunca olvidaré nuestros viajes en coche arreglando el mundo.

Mis Guillerminos... Lorenzo, siempre contagiándome alegría, ojalá nos queden unas cuantas natillas más por hacer juntos, deberíamos vernos más. Mar, que bonito todo el tiempo compartido, momentos de terraza y debates de comida interminables de los que aprendo tanto. Belén, mi ser de luz, te quiero casi desde antes de conocerte, pero qué afortunada me siento de que nuestros caminos se cruzaran.

Juan Antonio, que difícil haber llegado al lab detrás de ti, sin dejar de escuchar ni un solo día lo bien que lo hacías todo. Te debo un gracias muy grande, sobre todo, por tu generosidad. Por haberme regalado tu bien más preciado, tu tiempo, y conseguir que viera la habénula transfiriéndome tus poderes mágicos. Gracias, porque tus consejos y exigencia han hecho, sin duda, de este un mejor trabajo. Por enseñarme que con esfuerzo “el que la sigue la consigue” y que mi cabezonería no siempre es un defecto. Por tu paciencia y haber estado dispuesto a ayudarme y responder mis mil preguntas a pesar de que pregunto más de lo que debería.

Álvaro, mi antes vecino y genio de la lámpara. Sólo me hacía falta decir en voz alta mi deseo, para que lucharas fuerte por hacerlo realidad. Creo que nadie ha tenido nunca tantos detalles lindos conmigo como tú. A pesar de que no esté de acuerdo con los test de inteligencia emocional, y nos hayan traído algún quebradero de cabeza, cuánto te echo de menos.



Rita, mi chica wonder. Cuánto te admiro por tu capacidad para enfrentarte a la adversidad, de hacer sentir bien a todo el mundo, por tu valentía. Cuánto tengo que agradecerte lo que me has cuidado, resistí en Niza gracias a los audios constantes, a los ánimos, y esto es sólo un ejemplo de entre mil más. Todo lo que hemos compartido forma parte de mis recuerdos más especiales de la tesis. Gracias a ti y a tu familia por haberme hecho sentir cómo en casa, y no dudes que haya donde estemos yo y los míos, estarán siempre las puertas abiertas para ti.

Y si empecé con gente bonita... el final no ha podido ser mejor. Tengo que agradecer a cada uno de los alumnos y alumnas que han pasado por el laboratorio (no han sido pocos) todo lo que he aprendido gracias a ellos, pero guardo un recuerdo especial de Juan, ojalá haberte quedado con nosotros.

A mi Pauli y Ana. Habéis sido mi recarga de gasolina cuando ya estaba bajo mínimos. El último empujón que necesitaba para terminar la tesis. Que tierno ha sido veros juntas, aprender a quereros mientras crecáis tanto a nivel personal como profesional. Os quiero mucho.

Paula, creo que nunca he conocido a nadie tan predisposto, siempre con una sonrisa. Gracias por haber confiado tanto en mí, por todos los momentos que nos has regalado y que no olvidaré jamás. Qué bonita eres y cuantísimo te estamos echando de menos pequeña Paulita, pero no tengo ni duda que conseguirás todo lo que te has propuesto, porque es poco para lo que te mereces.

Y Ana, mi tesoro más preciado. Nunca, pero absolutamente nunca, podré agradecerte lo suficiente todo lo que has hecho por mí este último año. Has sido mi salvación, mi chaleco salvavidas, la responsable de que no haya abandonado en más de un momento. Solo gracias al equipazo que hemos formado, a que nos hemos complementado tanto y tan bien, hoy estoy escribiendo esto. Aprendo de ti cada segundo. Anita... ojalá algún día te reconozcas en la mujer buena, inteligentísima, bella y poderosa que yo veo en tu persona, pocas veces me he sentido tan orgullosa de alguien como lo hago de ti. No sé qué te espera en el futuro (que será brillante sin duda) pero, sea como sea, te prometo que buscaré la manera de seguir cerca de ti para que sigamos arreglando el mundo juntas, y compartiendo mil momentos lindos más.

A todas las personas que componen los servicios comunes del INA, sin los cuáles esta y cualquier investigación sería imposible: limpieza, conserjería, imagen, genotipado, doctorado, administración... En especial a Eva por habernos salvado una y mil veces con las PCR, por el tiempo compartido contigo y con Masha y por estar dispuesta a ayudarnos siempre. Y a Trini, porque por mal que vaya el día, basta con cruzarse contigo por el pasillo para que te sonría el alma.

No quiero perder la oportunidad de agradecer a mis compañeras de Terapia Ocupacional. Es un orgullo trabajar junto a la mayoría de las que fueron mis profesoras, profesionales de las que aprendí y aprendo tanto, con la tranquilidad de que estamos luchando por hacer de nuestra disciplina algo muy grande. Gracias a todas (y todos), pero en especial a Miriam, por el apoyo constante y el consejo sincero; Paula Peral y Alicia, por las oportunidades que me habéis brindado desde que empecé; Irene, por tenderme la mano siempre y tener palabras de ánimo preparadas en cualquier momento; Encarni, te admiro y no me canso nunca de aprender de ti; Gema, formar parte de esto contigo está siendo un placer.

A todas mis alumnas de Terapia Ocupacional por ser el motivo, la verdadera razón de todo esto. En especial a Lucía, Bea, Sonia, Mireya, Laura, Noemí y Elena. Por equilibrar mi balanza, por enseñarme a ser profesora, por hacer que siempre quiera hacerlo mejor para alumnas como vosotras. Le dais sentido a todo.

A mis otros terapeutas: a Laura, porque los ratitos contigo han sido bálsamo y me han permitido coger fuerzas para continuar, como compañera o vecina, espero seguir teniéndote cerca mucho tiempo más. Pedro, eres medicina, nunca dejo de aprender de ti. Beatriz, no sé porque no nos habíamos conocido antes, pero ahora no te pienso dejar marchar jamás. Gracias amiga, ojalá siempre nos falten horas cada vez que nos vemos y nos sobren historias que encadenar. No dejes nunca de enseñarme tanto y de regalarme tanta felicidad. Te quiero mucho y bien bonito.

Y para terminar con mi etapa de doctorado... Mi bien más preciado, mis especialitos.

*“Me maten si no pueden entrar, me muera no les puedo fallar,  
yo sin esta gente pa que cxxxxxs quiero pasar”.*

Sois la familia que se elige. El karma me venía debiendo algún regalo hace ya un tiempo... y aquí estáis vosotros. La luz en estos últimos años de tesis que, pandemia mediante, se convirtieron en tan complicados. Qué difícil explicar que la época más dura de mi vida, con la tesis en el aire, y la pandemia asolando medio mundo, ha sido a la vez de las más felices que recuerdo nunca, por haberos tenido a mi lado. Encontrarnos fue mejor que cualquier cosa... y no sólo me habéis regalado vuestra infinita amistad, sino un millón de recuerdos preciosos que guardar e incluso una familia gigante entre las que se encuentran vuestros padres, hermanos, sobrinas (Marga te quiero) que nos han tratado como si fuéramos uno más. Que suerte tenemos de tenernos, pero sin duda, el premio gordo me lo llevé yo. Cuantísimo me cuidáis todes, cada una a su manera, que fácil es sentirse valorada con unos amigos como vosotros.

Mis Ávaros. Mis dos imprescindibles. Tan iguales que sois almas gemelas. Siempre cuidando a los demás, pero discretamente, desde la sombra, porque eso del protagonismo no va con vosotros. Lo de expresar los sentimientos tampoco, pero que fácil os sale demostrarnos cuánto nos queréis con hechos. Que especiales sois. Hasta vuestras orangutanadas me llenan de ternura y cariño. Gracias ÁlvaroR por mirarme tan bonito, por tener sólo buenas palabras para mí, por mimarme tanto. Et vull un món sencer. Gracias ÁlvaroK por estar pendiente de mí (y de todos) cuando más he necesitado, por cederme siempre el sofá y por toda la ayuda con la tesis, por facilitarme tanto el camino.

Abra, mi post, mi ahora vecino, mi desrrallador mágico. Siempre tan generoso, dando todo a cambio de nada, haciendo hogar allá por dónde vas. Traes la felicidad de la mano, haces de mi mundo es un lugar mejor, siempre intentando que me sienta bien, ayudándome a trivializar los problemas. Gracias por hacer que no me sintiera nunca sola en el lab, por ser mi eterno compañero, por venir siempre al rescate cuando las cosas se ponen feas. Ahora mismo no sabría vivir sin ti, pero tampoco importa porque no voy a tener que hacerlo nunca. Ojalá tengas la culpa de 1000

cervezas más (y otros tantos vinos). Eres la calma en mi vida, la seguridad. Cásate ya, que va a ser uno de los días más felices de mi vida.

Óscarlos, mi cucuruchito, mi amigastro, mi vecino... significas tantas cosas que no caben aquí. Hay un millón de cosas que admiro en ti (y no, no es que seas el más guapo del INA). Tu ausencia de prejuicios, hace que la gente se sienta libre y orgullosa de ser quien es, porque no juzgas nunca a nadie. Gracias por ser apoyo siempre, por escuchar cada una de mis historias, y problemas y ayudarme una y otra vez a encontrar soluciones. Por ser mi psicólogo personal. Nuestra complicidad es un regalo. No somos novios porque roncas y no quieres tener hijos, pero no puedo quererte más bonito.

Onofre, mi Úrsula preferida. La sal del grupo. La persona que me da la vida, y me alegra la existencia con sus audios infinitos y sus comentarios siempre a punto sobre las causas más diversas de la vida. Cuánto sumas y cómo me gustaría tenerte siempre aquí. Cuánto cariño nos das. Eres genial guapet.

Y para terminar... mis chicas, mis Verónicas. Mis pilares fundamentales.

Kika, la líder del grupo sin la que no sabemos hacer nada. Mi otra hermana, cuánto me proteges. Eres, sin dudas, la mujer a la que más admiro en mi vida. La más valiente, luchadora, y fiel a los suyos que conozco. Yo, no voy a poder devolverte nunca todo lo bonito que me das, pero si puedo prometerte que no te pienso fallar nunca. Que yo... me juego todo por ti, incondicionalmente, con la certeza de que eres la mejor apuesta y siempre saldré ganando. Ahora bien, dedícame el Nobel cuándo lo ganes, que me declaro tu mayor fan. No voy a aprender a atarme los cordones para que tengas que atármelos siempre tú. Menos mal que te he encontrado. Te adoro infinito.

Raquel, no hay nada que pueda decirte que no te haya dicho ya. Creo que nadie mejor que tú sabe todo lo que significas para mí. Eres mi persona. Mi compañera de vida. La más incondicional. Alguien increíble. Sólo sé, que a pesar de todos los momentos duros y días malos que haya podido pasar en esta tesis, han valido la pena todos y cada uno de ellos, y volvería a pasarlos una y otra vez, porque sin duda alguna, lo mejor que me llevo de mi tesis, mi verdadero premio, has sido tú.

Y ahora... voy con los verdaderos perjudicados de toda esta etapa. Todas esas personas tan importantes para mí, que llevan los últimos años de mi vida escuchando mis "no puedo". No puedo quedar, no puedo ir a casa, no puedo ese fin de semana, no puedo verte, no tengo tiempo. Sé que, en todo este tiempo, no he logrado ser la mejor de las amigas, ni la mejor de las hijas, hermanas o sobrinas. Y no puedo más que agradeceros vuestra paciencia infinita y vuestra comprensión. A todos/as, que os he tenido que dejar en un segundo plano en algún momento, os prometo volver a ordenar mis prioridades.

A las alternativas (y alternativos), por tratarme como una más de vuestras familias y seguir tan de cerca mi camino.

A mi familia de Murcia, deseando estoy que llegue la comuna 2.0. Cuantísimo echo de menos teneros más cerca: Manu, Gita, George, Mari, Pedro y los pequeños Nahuel, Leo y Candela. A Luis y Carmen, sois, sin duda alguna las personas que mejor me conocéis del mundo, en las que más confío y teneros lejos no es fácil nunca. Baxal, ven a peinarme que te llevo a la playa. Cuánto te necesito. Luis, que bonito seguir construyendo juntos, compartiendo camino (me debes un viaje o un coche, a elección). Os quiero.

A todas mis amigas y amigos. De la infancia, universidad(es) y de vida. Porque, aunque no nos hayamos visto mucho en estos años, habéis hecho esto mucho más fácil.

A Laura, perquè encara que no ens vegem, et sent a prop sempre. Ana, perquè per lluny que estiguem, quan ens veiem tornem a ser aquelles dos ànimes perdudes que es van sentar juntes el primer dia de classe i no es van tornar a separar més (que ganes tinc de coneixer al xicotiu).

Patri, porque después de todos los sustos que te he dado, y de que nos vemos menos de lo que nos gustaría, aun así no me has dejado sola nunca, ni un solo instante. Eres esa amistad constante, que te cuida y te salva los días que no van bien y celebra contigo cada uno de tus éxitos. Me siento una privilegiada por tenerte, y prometo estar aquí para siempre, para que sigamos escuchando cada una de nuestras historias, compartiendo momentos inolvidables y queriéndonos tanto en los buenos

y malos momentos. Nunca podré agradecerte todo lo que has hecho por mí, pero seguiré intentándolo. Te adoro.

A mi triángulo. Rocío y Álvaro. Mis incondicionales, mi alegría de vivir. Soy mejor persona cuando estamos juntos. Crecer con vosotros ha sido la suerte de mi vida, como lo es la certeza, de que, en el futuro, mientras nos tengamos, todo irá bien. Gracias también por permitirme sentir a vuestras familias como la mía propia. Roci, mi pequeña. La persona a la que más me duele haberle robado tiempo. Siento cada uno de los momentos en los que me has necesitado y no he podido estar. Aun así, no he dejado de sentir que cada vez que estamos juntas, vuelvo a casa. Siempre estaremos cuidándonos, dispuesta a pintar tus gafas de negro, convertir tus luchas en las mías y celebrar tus triunfos. Así siempre, hasta que cumplamos 100 años. Álvaro, mi cómplice, la persona que me ha enseñado a querer sin juzgar, de la forma más libre. Ojalá sigas rompiéndome los esquemas y cometiendo locuras por mí (empapélate en film y ven a saludarme a través del cristal) hasta que seamos viejecitos. Estar a tu lado es tener asegurado risas y cariño a borbotones, y nunca lograré devolverte ni un poquito de lo que me das tu a mí. Gracias también a Arturo, tienes el cielo ganado aguantándonos. Todo el mundo debería teneros en su vida.

Cualquiera que me conozca, sabe, que no se hablar de mí sin pronunciar la palabra familia. Mi enorme y preciosa familia, que importantes sois para mí.

A mis tíos y tías. Soy quien soy gracias a cada uno de vosotras y vosotros. El impacto que tenéis en mi es incalculable. A mi tío Pere y Aurora, a mi tío Tolo (ya sé yo que soy tu favorita), mi tía Mari Carmen, mi tía Rosa, mi tía Pilar y mi tío Pepe, mi tía Miriam, mi tía Montse, mi tío Jaume y mi tata Ade, Mi padrino (Vicente) y Mónica, Miguel y Cecilia, mi Madrina (Lola) y Mercedes.

A todas mis primas y primos. A los primos hermanos, a mis primos pequeños, a esos que son primos, aunque el resto del mundo se empeñe en contarnos que no lo somos: Gemma, David, Paula, Josep, Jose Enrique y Miguel; Naomi, Natalia, Fran, Raquel, David y Sergio; Paula, Javi y Jose; Álvaro, Pablo, Isabel y María; Alejandro y Jaime. A todas vuestras parejas a quiénes quiero como si fueran uno más. Haber crecido con vosotros ha sido un privilegio. Que suerte tengo. A las pequeñas y pequeños: Marc, Amelie, Stella, Claudia, Martina y Enric; Vera y Juan Antonio. No

sabéis la suerte que tenéis de haber nacido en esta familia. Está siendo un placer veros crecer.

A mis primos Francis y Tolo, porque más que primos sois mis hermanos. A Cati, Tolet y Cati, por completar la ecuación. A Ana, porque yo no sé cómo sobrevivía antes de conocerte, pero no puedo quererte y necesitarte más. Me faltan palabras para explicaros que sois mi soporte, la seguridad de que en la vida nunca jamás estaré sola. Os adoro.

I per a acabar, la meua llar. Perquè per descomptat, si algú es mereix el meu gràcies més gran, són ells, les persones més importants de la meua vida. Si he aconseguit acabar la tesi, ha sigut pel seu suport, pels seus ànims, per les seues ganes, per la seua ajuda. Perquè no han deixat que baixara la guàrdia ni un segon, perquè cada vegada que pensava en abandonar, feien del meu mantra vital el seu discurs "*No t'has rendit mai, no comences ara*". No sols haurien de sentir aquesta tesi com a seua també, sinó qualsevol dels meus èxits, ja que són sempre, la força que m'espenta.

Gracies Tomás, per ser família desde que vas arribar, el germà que no vaig tindre. Gràcies per voler-me i cuidar-me tant. Per ser solucionador de problemes, "manitas" a domicili i estar disponible les 24 hores per a mí. Per fer de la meua vida un lloc molt més fàcil i bonic. Què fàcil és voler-te. Gràcies per haver-me regalat també una família al complet, plena de ties, germanes, cunyats i nebots. Gràcies també per donar-me una segona mare, María et vull.

Gràcies als meus nebots. A Pere, la meua persona favorita. A Roc, l'abraçada més dolça. Sou la meua raó d'existir. Li doneu sentit a tot el meu món. Hi ha una cançó de Rozalén que vos dedicaria una i mil vegades: "No estoy hecha para mí, y en cambio cuando te miro, todo cobra sentido, y si vale la pena es por ti". Vosaltres no valeu la pena, valeu tota l'alegria del món. El major triomf de la meua vida, serà veure-us conquistar els vostres somnis. Vos estime infinit.

A la meua germana Rosa. La principal responsable de que jo haja arribat fins ací. Has sigut el principal motor de la meua carrera professional, la primera persona que va entendre i va donar suport al meu canvi de rumb fa ja molts anys, perquè sabia que aquell no era el meu camí. La meua animadora més fidel en aquesta nova ruta que vaig decidir començar. Per ningú m'he sentit més secundada, ningú confia més en



mi que tu. Em creus capaç de tot, i encara que no ho siga, no deixes d'intentar que m'ho crega. Em volies abans de conèixer-me, i des d'aquell moment no has deixat de voler-me, cuidar-me i ser la germana major que tot el mon voldria tindre. Gràcies per estar sempre disposta a donar-me la mà, encara que supose quedar-te sense menjar com al pati del col·le. Què bon equip formem, encara que deixa'm de dir-te, que la germana guapa i llesta eres tu, i la simpàtica jo. Et vull.

Als meus pares, per tantes coses que no caben en 20 tesi. Gràcies, per haver-vos esforçat tant en fer de mi una bona persona. Per tots els valors inculcats. Sou el meu major orgull. Gràcies per haver format el tàndem perfecte que m'ha mantingut amb vida tots aquests anys: mamà fent els tàpers (per a mi i mitja tropa més), papà agafant el cotxe pacientment per a fer de repartidor. Per no haver dubtat ni un segon en portar-me a Niça amb cotxe pera què la meua aventura començara tan bé com fora possible. Per aplanar el meu camí una i una altra vegada. Això és només el reflex del suport constant i el carinyo infinit que em doneu dia a dia. La tesi és vostra, perquè els meus pitjors moments, han sigut els vostres també.

Gràcies, per haver-me cosit les ales tan fort, i haver-me animat a volar tan lluny, preparant el niu amb tant cuidado per a quan necessite tornar.

Al meu pare, Roc, perquè sens dubte, és la persona que més orgullosa se sentirà d'açó. Ha valgut la pena tant d'esforç, només per saber el que significarà per a tu. Gràcies per voler-me tant, per estar sempre disponible per a mi. A pesar que pensem diferent, és un orgull saber que m'assemble tant a tu.

A la meua mare, Pepa. Una mica la mare de tots i totes. La cuidadora oficial del meu somriure. L'abraçada curativa, la llar. Qui et coneix, ja sap perquè necessite agrair-te tot i més. Diuen que l'amor més incondicional que hi ha és el d'una mare, i crec que no tinc cap dubte, gràcies per totes aqueixes vegades que m'has dit això de "no necessite cap tesi per a estar orgullosa de tu", eixes paraules han sigut la millor de les medicines.

Hauríeu de ser eterns. Vos vull.

Puesto que no creo en ningún Dios, he construido un cielo a mi medida. En él me esperan, lamentablemente, muchas personas que hoy estarían felices de celebrar conmigo: mis cuatro abuelos, mi tío Domingo, mi tía Carmen, y mis tíos Pablo e Isabel. A todos ellos, los llevo en siempre en mis recuerdos, siempre me acompañan, ayudándome a ser quién soy. Sin embargo... no puedo evitar nombrar a mi tío Miguel. Una de las personas que más me querrá jamás. Puc sentir com agafes la meua mà, i em comptes l'orgullós que estàs de mi.

Y por último, cómo no podría ser de otra forma:

A Laura y Alejandro. Os fuisteis demasiado pronto, y vuestra ausencia aún me duele, pero no he podido tener más suerte en la vida de haberla compartido con vosotros. Habéis sido, sois, y seréis siempre, la luz que guía mi camino.



