

03081

10  
24

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONALES Y DE  
POSGRADO

PROYECTO ACADÉMICO INVESTIGACION BIOMÉDICA BÁSICA

**CARACTERIZACIÓN DE PRECURSORES  
NEURALES RESPONSIVOS A FACTORES DE  
CRECIMIENTO.**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN  
INVESTIGACION BIOMÉDICA BÁSICA PRESENTA

M. IBB JESUS SANTA OLALLA TAPIA

CUERNAVACA, MORELOS

1996

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## RESUMEN.

Durante el desarrollo del sistema nervioso, el control de la diferenciación celular debe involucrar eventos dinámicos, que finalmente establecerán la expresión de moléculas que confieren funciones específicas a cada una de las neuronas. En este trabajo, nosotros examinamos el efecto de mitógenos clásicos sobre células precursoras neurales, en cultivos celulares del mesencéfalo embrionario (13.5 días de desarrollo), utilizando el factor de crecimiento epidérmico (EGF), el factor de crecimiento transformante- $\alpha$  (TGF- $\alpha$ ), el factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), el factor de crecimiento neural (NGF), y el factor de crecimiento transformante- $\beta$  (TGF- $\beta$ ). Nuestros resultados muestran que EGF, bFGF o TGF- $\alpha$ , pero no NGF ó TGF- $\beta$ , inducen la proliferación general de las células cultivadas, seguido por la formación de colonias. La combinación de estos tres factores sugieren que la mayoría de las células con la capacidad de formar colonias responden a EGF, TGF- $\alpha$ , o bFGF. El número de colonias incrementa significativamente cuando EGF, pero no TGF- $\alpha$ , fue utilizado en combinación con bFGF. Además, una segunda población que responde solo a EGF + bFGF se detectó en la región dorsal del mesencéfalo, que requiere una exposición secuencial (bFGF antes que EGF). La actividad formadora de colonia de bFGF fue dependiente de insulina, pero la cooperación entre insulina y bFGF fue indirecta ya que no se observó formación de colonias en subcultivos de células derivadas de las colonias, aún en la presencia de insulina. Las células obtenidas de nuestros cultivos presentan morfología glial o neuronal, y expresan marcadores tanto de neuronas como astrocitos; nestina, un marcador de células precursoras neurales, y enzimas involucradas en la síntesis de catecolaminas y GABA también se expresan en las colonias. Nuestros resultados sugieren que EGF y bFGF estimulan la proliferación de células precursoras neurales, las cuales tienen el potencial de diferenciar a los fenotipos catecolaminérgico y GABAérgico.

Vo.Bo.

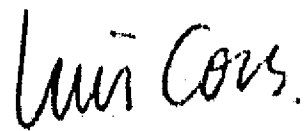


Dr. Luis Covarrubias Robles.

## ABSTRACT

During central nervous system development, the control of cellular differentiation should involve dynamic events, that finally establish the expression of molecules that conferring specific function to each neuron. In the last years, several experimental evidences have involved growth factors as key elements in this process. In this work, we examined the effects of classical mitogens on neural precursor cell, by culturing mouse cells of the embryonic (13.5 days post-coitum) mesencephalon and treating them with epidermal growth factor (EGF), transforming growth factor- $\alpha$  (TGF- $\alpha$ ), basic fibroblast growth factor (bFGF), nerve growth factor (NGF), and transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ). Our results show that EGF, bFGF or TGF- $\alpha$ , but not NGF or TGF- $\beta$ , induced general proliferation of the cultured cells, followed by formation of colonies. Combination of these three growth factor suggest that most cells with the capacity to form colonies responded to EGF, TGF- $\alpha$ , or bFGF. The number of colonies increased significantly when EGF, but not TGF- $\alpha$ , was used in combination with bFGF. Furthermore, a population responding only to EGF + bFGF was detected in the dorsal mesencephalon, that required a sequential exposition (bFGF before EGF). The colony-forming activity of bFGF was dependent on insulin, but bFGF and insulin cooperation was indirect since we could not observe colony formation in subcultures of cells derived from colonies, even in the presence of insulin. Cells obtained from our colonies displayed neuronal and glial morphology and expressed markers of both neurons and astrocytes; nestin, a marker of neural precursor cells, and enzymes involved in catecholamine and GABA synthesis were also expressed in the colonies. Our results suggest that EGF and bFGF stimulates the proliferation of neural precursor cells and that they have the potential of differentiating to the catecholaminergic and the GABAergic phenotypes.

Vo.Bo.



Dr. Luis Covarrubias Robles.

**DIRECTOR DE TESIS**

**Dr. Luis Fernando Covarrubias Robles.**

**COMITE TUTORIAL**

**Dr. Jean Louis Charli Casalonga**

**Dr. Gonzalo Martínez de la Escalera.**

**Dr. Luis Fernando Covarrubias Robles.**

**JURADO DE EXAMEN.**

**Dr. Jean Louis Charli Casalonga.**

**Dr. Arturo Federico Liévano Mendoza.**

**Dr. Vicente Madrid Marina.**

**Dr. José Segovia Vila.**

**Dr. Luis Fernando Covarrubias Robles.**

**Dr. Martín Pedraza Alva.**

**Dr. Froylan Gómez Lagunas.**

**ESTE TRABAJO FUE REALIZADO EN EL LABORATORIO DE BIOLOGIA  
MOLECULAR DE ANIMALES SUPERIORES, DEL DEPARTAMENTO DE  
GENETICA Y FISILOGIA MOLECULAR, DEL INSTITUTO DE  
BIOTECNOLOGIA.**

Expreso mi más sincero agradecimiento a la Dra. Patricia Joseph Bravo y, al Dr. Jean Louis Charli Casalonga, por haberme permitido iniciar esta fascinante carrera en su laboratorio. Al Dr. Luis Covarrubias Robles por fomentar en mí el espíritu crítico requerido para el buen desarrollo de las actividades científicas. Al Dr. Felix Recillas Targa, por sus comentarios durante la elaboración de la tesis. Y muy particularmente a cada uno de los miembros del jurado, por sus recomendaciones al trabajo escrito.

Este trabajo se lo dedico a:

Susana, por todo su amor y comprensión.

A mi padre, y hermanos, por el apoyo que siempre me han proporcionado durante mi formación.

A Eduardo, quien da felicidad a mi vida.

Y muy particularmente a mi madre, por sus sacrificios y respaldo, como pequeña muestra de la devoción que tengo hacia ella.

## RESUMEN.

Durante el desarrollo del sistema nervioso, el control de la diferenciación celular debe involucrar eventos dinámicos, que finalmente establecerán la expresión de moléculas que confieren funciones específicas a cada una de las neuronas. En este trabajo, nosotros examinamos el efecto de mitógenos clásicos sobre células precursoras neurales, en cultivos celulares del mesencéfalo embrionario (13.5 días de desarrollo), utilizando el factor de crecimiento epidérmico (EGF), el factor de crecimiento transformante- $\alpha$  (TGF- $\alpha$ ), el factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), el factor de crecimiento neural (NGF), y el factor de crecimiento transformante- $\beta$  (TGF- $\beta$ ). Nuestros resultados muestran que EGF, bFGF o TGF- $\alpha$ , pero no NGF ó TGF- $\beta$ , inducen la proliferación general de las células cultivadas, seguido por la formación de colonias. La combinación de estos tres factores sugieren que la mayoría de las células con la capacidad de formar colonias responden a EGF, TGF- $\alpha$ , o bFGF. El número de colonias incrementa significativamente cuando EGF, pero no TGF- $\alpha$ , fue utilizado en combinación con bFGF. Además, una segunda población que responde solo a EGF + bFGF se detectó en la región dorsal del mesencéfalo, que requiere una exposición secuencial (bFGF antes que EGF). La actividad formadora de colonia de bFGF fue dependiente de insulina, pero la cooperación entre insulina y bFGF fue indirecta ya que no se observó formación de colonias en subcultivos de células derivadas de las colonias, aún en la presencia de insulina. Las células obtenidas de nuestros cultivos presentan morfología glial o neuronal, y expresan marcadores tanto de neuronas como astrocitos; nestina, un marcador de células precursoras neurales, y enzimas involucradas en la síntesis de catecolaminas y GABA también se expresan en las colonias. Nuestros resultados sugieren que EGF y bFGF estimulan la proliferación de células precursoras neurales, las cuales tienen el potencial de diferenciar a los fenotipos catecolaminérgico y GABAérgico.



## ABSTRACT

During central nervous system development, the control of cellular differentiation should involve dynamic events, that finally establish the expression of molecules that conferring specific function to each neuron. In the last years, several experimental evidences have involved growth factors as key elements in this process. In this work, we examined the effects of classical mitogens on neural precursor cell, by culturing mouse cells of the embryonic (13.5 days post-coitum) mesencephalon and treating them with epidermal growth factor (EGF), transforming growth factor- $\alpha$  (TGF- $\alpha$ ), basic fibroblast growth factor (bFGF), nerve growth factor (NGF), and transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ). Our results show that EGF, bFGF or TGF- $\alpha$ , but not NGF or TGF- $\beta$ , induced general proliferation of the cultured cells, followed by formation of colonies. Combination of these three growth factor suggest that most cells with the capacity to form colonies responded to EGF, TGF- $\alpha$ , or bFGF. The number of colonies increased significantly when EGF, but not TGF- $\alpha$ , was used in combination with bFGF. Furthermore, a population responding only to EGF + bFGF was detected in the dorsal mesencephalon, that required a sequential exposition (bFGF before EGF). The colony-forming activity of bFGF was dependent on insulin, but bFGF and insulin cooperation was indirect since we could not observe colony formation in subcultures of cells derived from colonies, even in the presence of insulin. Cells obtained from our colonies displayed neuronal and glial morphology and expressed markers of both neurons and astrocytes; nestin, a marker of neural precursor cells, and enzymes involved in catecholamine and GABA synthesis were also expressed in the colonies. Our results suggest that EGF and bFGF stimulates the proliferation of neural precursor cells and that they have the potential of differentiating to the catecholaminergic and the GABAergic phenotypes.

## ABREVIATURAS

AADC	aminoácido-decarboxilasa
ADN	ácido desoxiribonucleico
ADNc	ADN complementario
aFGF	factor de crecimiento de fibroblastos ácido
AgT	antígeno T
AMPc	adenosin monofosfato cíclico
apoGAD	apoenzima de la glutamato descarboxilasa
ARNm	ácido ribonucleico mensajero
BDNF	factor de crecimiento derivado de cerebro
BF-1	factor cerebral-1
bFGF	factor de crecimiento de fibroblastos básico
CDF	factor de diferenciación colinérgico
CDK	proteincinasa dependiente de ciclinas
CNTF	factor neurotrófico ciliar
CRE	elemento responsivo al AMPc
DBH	dopamina-β-hidroxilasa
DDC	dopa-decarboxilasa
<i>dpc</i>	días <i>post coitum</i>
EGF	factor de crecimiento epidérmico
En-1	engrailed 1
En-2	engrailed 2
ERK	proteincinasa activada por señales extracelulares
GABA	ácido γ-aminobutírico
GAD <sub>65</sub>	glutamato descarboxilasa <sub>65</sub>
GAD <sub>67</sub>	glutamato descarboxilasa <sub>67</sub>
GDNF	factor de crecimiento derivado de una línea glial
GFAP	proteína ácida fibrilar glial
holoGAD	holoenzima de la glutamato descarboxilasa
HPRT	hipoxantina fosforibosil transferasa
HPLC	cromatografía líquida de alta resolución
ICE	proteasa involucrada en el procesamiento de interleucina-1β
IGF-1	factor de crecimiento semejante a insulina-1
IL-6	interleucina-6
LIF	factor inhibidor de leucemia
MAO	monoamino oxidasa
MAP-K	proteín-cinasa activada por mitógenos
MAP-KKK	fosforilasa de la fosforilasa de la proteincinasa activada por mitógenos
mE	día de desarrollo embrionario del ratón
NF-M	neurofilamento-M
NGF	factor de crecimiento neural
NT-3	neurotrofina-3
NT-4/5	neurotrofina-4/5
pb	pares de bases
PDGF	factor de crecimiento derivado de plaquetas
PI-3K	fosfatidil-inositol-3-cinasa
PK-A	proteincinasa-A
PK-II	proteincinasa-II
PLC-γ	fosfolipasa C-gamma
PNMT	feniletanolamina-N-metiltransferasa
Rb	gen del retinoblastoma
rE	días de desarrollo de la rata

RT-PCR	reacción en cadena de la polimerización de ácidos nucleicos
SN	sistema nervioso
SNC	sistema nervioso central
SNP	sistema nervioso periférico
TGF- $\alpha$	factor de crecimiento transformante- $\alpha$
TGF- $\beta$	factor de crecimiento transformante- $\beta$
TH	tirosin hidroxilasa

## PRESENTACION

En la última década, la biología ha sufrido una revolución tecnológica. Lo anterior ha permitido el diseño de estrategias experimentales que brindan la oportunidad de obtener una mejor respuesta a los problemas en estudio. En particular, la biología del desarrollo ha sido una de las áreas que se ha distinguido por aprovechar en forma intensa estas metodologías. Así, por ejemplo, ha sido posible incrementar nuestro conocimiento en lo que respecta a: el papel de genes específicos en el desarrollo, la comprensión de los procesos inductivos en el embrión, los factores involucrados en la formación de algunos tejidos, y el descubrimiento de moléculas involucradas en el establecimiento de tipos celulares particulares. Sin duda, el avance se debe fundamentalmente al enfoque molecular de las estrategias de estudio, que ha dado origen a nuevas técnicas, de entre las cuales destacan: procedimientos de transfección con nuevos vectores de expresión, útiles tanto *in vitro* como *in vivo*; la generación de ratones transgénicos, que permiten evaluar en el animal completo la función de factores que se han identificado en células en cultivo, y la disrupción génica ("gene targeting"), la cual permite estudiar durante la embriogénesis la relevancia de cualquier gen conocido, aunque en muchos de los casos la redundancia o la letalidad de estas mutaciones impide su análisis en etapas tardías del desarrollo.

A pesar de esta variedad de metodologías aún estamos lejos de comprender los mecanismos que participan en la definición de fenotipos particulares, evento que se lleva a cabo fundamentalmente en etapas tardías del desarrollo. La combinación de herramientas moleculares y celulares ayudará indiscutiblemente a analizar con mejor detalle estos fenómenos. Recientemente, se ha demostrado que bajo el efecto de factores de crecimiento es posible propagar precursores neurales. De esta forma, se ha hecho posible contar con poblaciones enriquecidas en células indiferenciadas, y ha permitido dar inicio a su mejor caracterización. En este contexto el presente trabajo describe las interacciones *in vitro* de diferentes factores de crecimiento, en la modulación de la proliferación de precursores neurales del mesencéfalo. Además, describe su utilidad como una nueva técnica para estudiar *in vitro* e *in vivo* los mecanismos involucrados en el control de la capacidad proliferativa, y su relación con la generación de fenotipos terminales en el sistema nervioso. En forma particular, documenta su potencial para ser utilizado como una herramienta experimental en el estudio de la diferenciación dopaminérgica y/o GABAérgica.

Como una introducción al área en estudio, se describirá brevemente el desarrollo embrionario del sistema nervioso central de los vertebrados. Posteriormente, se comentarán las diferentes estrategias que se han utilizado para estudiar a los precursores neurales, resaltando la importancia de los factores de crecimiento en el desarrollo del sistema nervioso. Por otro lado, se describirán algunas características generales de los precursores neurales, donde se detallarán los factores que pudieran estar involucrados de alguna manera en el control de la diferenciación terminal, en forma específica los asociados al fenotipo dopaminérgico y GABAérgico. Una vez hecha esta introducción, se establecerá el objetivo general de esta tesis. Si bien, los datos experimentales estarán incluidos principalmente en los artículos, se incluirá una breve descripción en la sección de resultados, con la finalidad de integrarlos con resultados adicionales aún no publicados, en el contexto de los objetivos planteados. Finalmente se realizará una discusión breve donde se resaltarán los datos que sugieren el posible efecto en sobrevivencia y diferenciación de bFGF, y se destacará la utilidad de este sistema experimental para la caracterización *in vivo* e *in vitro* de los precursores neurales.



## INDICE

	PRESENTACION	1
	INDICE	3
I)	DESARROLLO DEL SISTEMA NERVIOSO	5
	A) Inducción neural.	
	B) Regionalización.	
	C) Proliferación y diferenciación.	
II)	ESTRATEGIAS PARA ESTUDIAR A LOS PRECURSORES NEURALES.	15
	A) Líneas neurales tumorales.	
	B) Líneas neurales inmortalizadas.	
	C) Expansión de precursores neurales con factores de crecimiento.	
	D) Análisis <i>in vivo</i> de precursores neurales.	
III)	PARTICIPACION DE LOS FACTORES DE CRECIMIENTO EN EL DESARROLLO DEL SISTEMA NERVIOSO.	22
	A) Proliferación.	
	B) Supervivencia.	
	C) Diferenciación.	
	D) El precursor O2A.	
	E) Mediación intracelular.	
IV)	CARACTERISTICAS GENERALES DE LOS PRECURSORES DEL SISTEMA NERVIOSO.	35
	A) Célula precursora del sistema nervioso periférico.	
	B) Célula precursora del sistema nervioso central.	
V)	EL FENOTIPO DOPAMINERGICO.	41
	A) Generalidades del sistema dopaminérgico.	
	B) Neurogénesis y ontogenia de las neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo.	
	C) Efectos <i>in vitro</i> sobre la maduración del fenotipo dopaminérgico.	
VI)	EL FENOTIPO GABAERGICO.	47
	A) Generalidades del sistema GABAérgico.	
	B) Efectos <i>in vitro</i> sobre la maduración del fenotipo GABAérgico.	
VII)	JUSTIFICACION Y OBJETIVO.	51
VIII)	MATERIALES Y METODOS.	53
	A) Cultivo de células.	
	B) Purificación de ARN, síntesis de ADNc y procedimiento de reacción en cadena de la polimerasa.	
	C) Inmunocitoquímica.	
	D) Análisis estadístico.	

IX)	RESULTADOS.	55
	A) Interacciones de factores de crecimiento en la generación de colonias de precursores neurales.	
	B) Efecto de factores de crecimiento sobre el establecimiento de fenotipos específicos.	
	ARTICULOS	67
X)	DISCUSION Y PERSPECTIVAS.	68
	A) Proliferación versus sobrevivencia.	
	B) Diferenciación a fenotipos terminales.	
	C) Caracterización de precursores neurales.	
	D) Utilidad clínica de células precursoras	
	REFERENCIAS.	77

## I) DESARROLLO DEL SISTEMA NERVIOSO.

El sistema nervioso (SN) de los vertebrados se origina por un proceso inductivo del mesodermo sobre el ectodermo, el cual genera un engrosamiento a lo largo del surco primitivo conocido como placa neural. Poco después, la placa neural sufre una invaginación que se profundiza gradualmente para, finalmente, cerrarse y formar el tubo neural. Esta estructura sufre cambios morfogenéticos dramáticos que regionalizan su extremo rostral, formando tres vesículas denominadas cerebro primitivo anterior, medio y posterior (Fig. I.1). Del cerebro primitivo anterior o prosencéfalo emergen dos estructuras: el telencéfalo, el cual dará origen a la corteza cerebral y a los ganglios basales, los dos principales componentes de los hemisferios cerebrales, y al diencéfalo, del cual se formará el tálamo e hipotálamo. El cerebro medio o mesencéfalo no sufre modificación morfológica importante, mientras que el cerebro posterior o rombencéfalo, da lugar al metencéfalo, del que se origina el puente y cerebelo, y al mielencéfalo, que generará el bulbo raquídeo. Morfológicamente, la región caudal del tubo neural no cambia de manera significativa, y da lugar a lo que en el organismo adulto se conoce como la médula espinal. Una vez realizados estos cambios morfogenéticos, el tubo neural experimenta una proliferación muy activa para generar, a tiempos precisos y en diferentes sitios, las distintas neuronas y células gliales que cumplen con las diversas funciones del SN. En las siguientes secciones se describirán, brevemente, algunas moléculas que podrían participar en la inducción neural, en la regionalización, y en la proliferación y diferenciación neural, haciendo énfasis en el desarrollo de vertebrados.

### A) Inducción neural.

La participación del mesodermo en el establecimiento de la placa neural se fundamentó en los hallazgos de Spemann y Mangold, en los cuales, al transplantar el labio mesodérmico dorsal (organizador) de anfibios en el estadio de gástrula temprana a la región ventral del embrión, se generó un segundo neuroeje completo<sup>225</sup>. Desde entonces, se inició la búsqueda de la(s) molécula(s) que tuviera(n) a su cargo la determinación neural. Ensayos *in vitro* con ectodermo del polo animal del embrión de *Xenopus* permitieron identificar a la activina-A como una molécula inductora; cuando se expuso este factor de crecimiento a explantes del polo animal en etapa



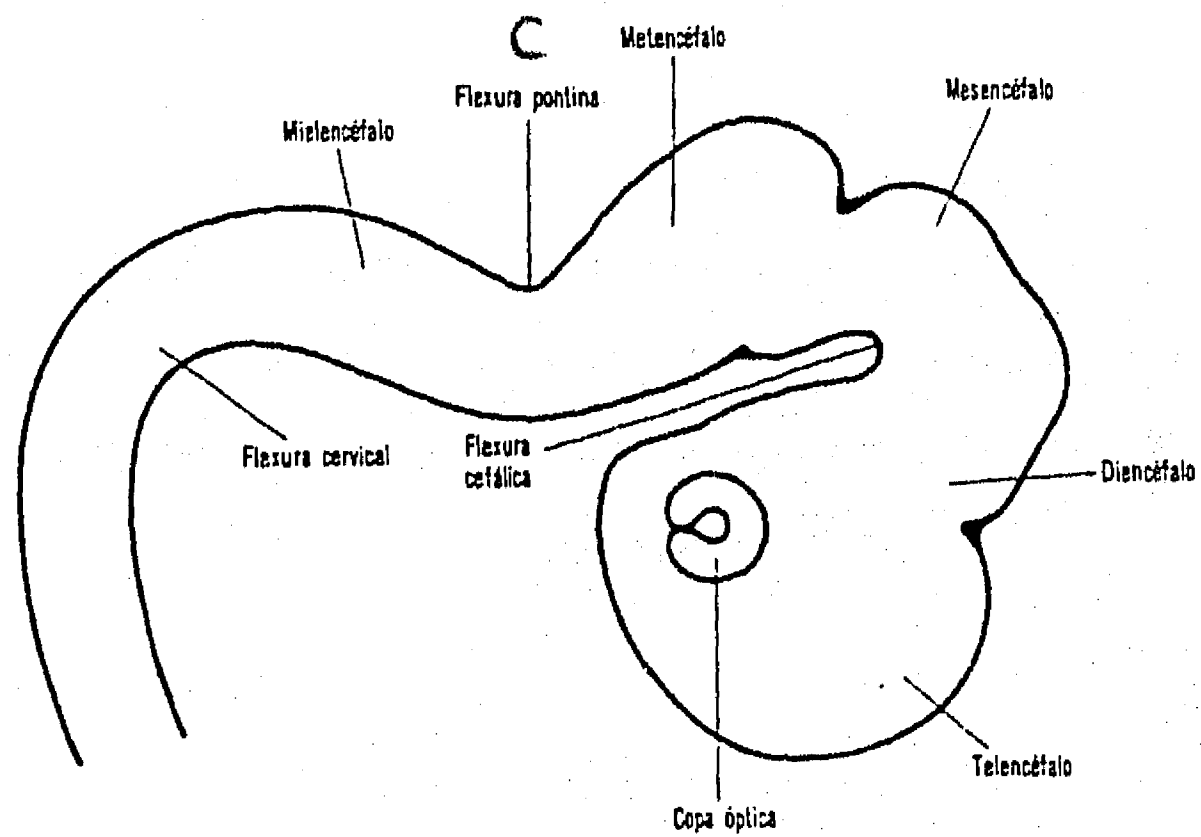
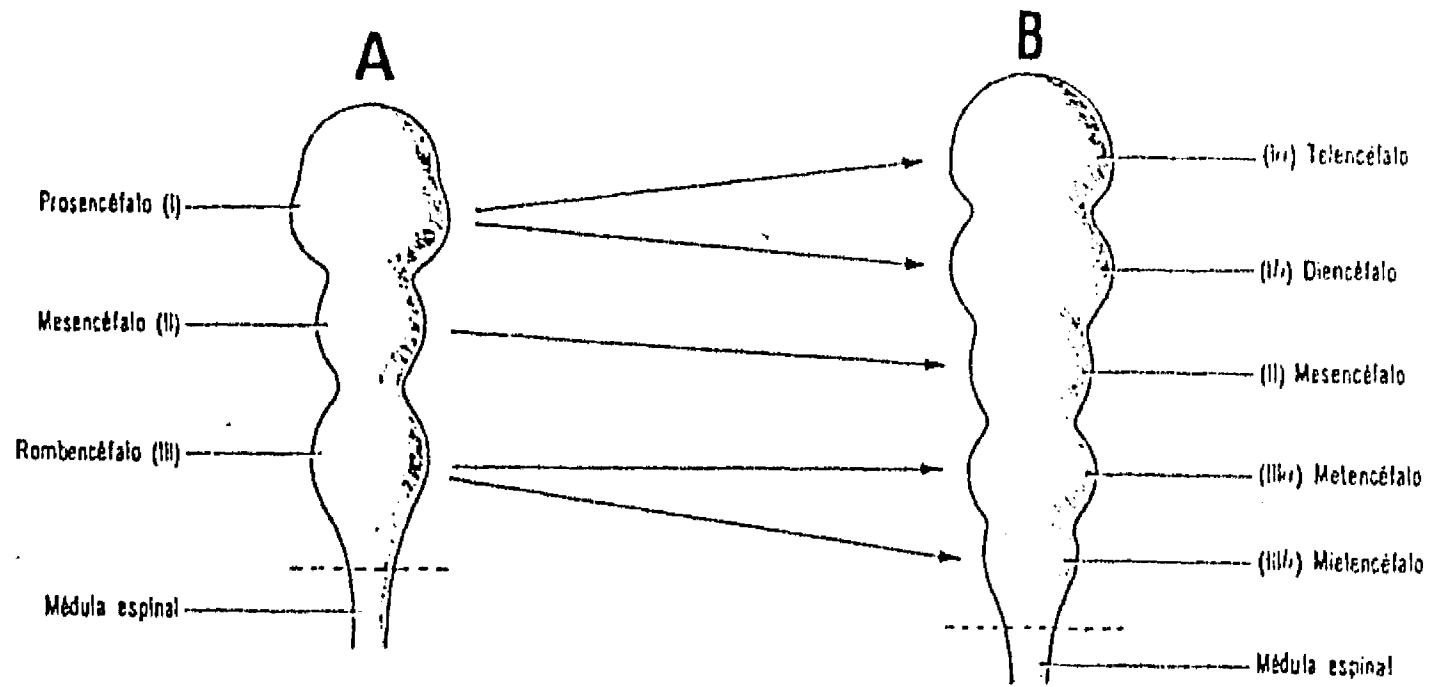


Figura I.1- Vesículas cerebrales. A) Primarias, B) Secundarias, C) Vesículas cerebrales secundarias, vista de perfil aproximadamente 10 días de desarrollo embrionario del ratón. Tomada de la referencia 150, pag. 35,36.

de blástula tardía, fue posible inducir la generación de tejido mesodérmico y neural<sup>221</sup>. De esta forma se propuso que la activina-A podría participar en el establecimiento del mesodermo dorsal, e indirectamente, en la inducción neural. Una actividad similar se describió para el factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF). En atención a lo anterior, se establecieron dos requisitos mínimos que debieran ser cumplidos por cualquier molécula que se postulase como inductor neural: primero, ser capaz de inducir la formación de tejido neural sin la formación de mesodermo, y segundo, el ectodermo debe de responder al inductor en el estado de gástrula, cuando el mesodermo dorsal puede inducir la generación del tejido neural. Noggin (proteína secretable) fue la primer molécula que cumplió con estas dos características, además, se expresa en el lugar y el tiempo adecuado para cumplir con la función de un inductor neural<sup>133</sup>. No obstante, se deben requerir componentes adicionales, ya que fue incapaz de inducir marcadores celulares de las regiones más posteriores del tubo neural. Recientemente, se propuso que la folistatina podría funcionar también como un inductor neural, ya que cumple con las mismas propiedades que noggin (i.e. no indujo mesodermo y se encuentra en el organizador)<sup>98</sup>. La folistatina interactúa directamente con la activina-A inhibiendo su actividad, sugiriendo que ésta participa de manera relevante en el proceso de inducción neural. De acuerdo con esta propuesta, experimentos con receptores mutantes dominantes negativos de activina-A, demostraron que la actividad del receptor es importante para inhibir la determinación neural<sup>99</sup>. De este modo, la inducción neural pudiera involucrar el paso del ectodermo a un estado permisivo, cuyo destino está predispuesto hacia la diferenciación neural, por lo que, factores inhibitorios (e.g. activina-A) serían necesarios para permitir la diferenciación hacia otros tipos celulares (e.g. los de la epidermis). La folistatina, al igual que noggin, es incapaz de inducir la expresión de marcadores de la región caudal del tubo neural, por lo que es probable que existan interacciones con factores adicionales para llevar a cabo la inducción neural completa. Un factor que podría ser importante en la regulación de la neurogénesis a lo largo del eje antero-posterior es bFGF. Experimentos *in vitro* demostraron que si se expone la epidermis de *Xenopus laevis* a dosis bajas de bFGF se favorece la expresión de marcadores neurales anteriores, mientras que, dosis altas establecen la de marcadores más caudales<sup>119</sup>. Estos efectos se llevan a cabo de manera independiente a noggin y folistatina, de manera que será importante determinar las interacciones entre estas tres moléculas.

## B) Regionalización.

Una vez que se ha generado el tejido neural, debe existir en él información que especifique las diferentes estructuras que se generarán en los distintos ejes del SN. Teniendo como antecedente que durante el desarrollo de *Drosophila melanogaster* la expresión de genes con cajas homeóticas participa en la formación de sus segmentos, se han buscado genes homólogos en mamíferos. Estos factores transcripcionales han mostrado patrones de expresión claramente definidos en el SN de vertebrados, por lo que se ha propuesto que podrían participar, de manera similar a lo que ocurre en *Drosophila melanogaster*, en la determinación de la identidad posicional. Así, en la médula espinal durante el desarrollo del ratón, se encontró un nivel diferente de expresión en el eje dorso-ventral de factores transcripcionales del tipo Pax<sup>87</sup> (Fig. I.2A); en el rombencéfalo la expresión de genes tipo Hox delimita a los rombómeros en el eje antero-posterior<sup>120</sup> (Fig. I.2B); y en el telencéfalo, la expresión de Otx, Dlx, Gbx definen distintas zonas, denominadas prosómeros, que podrían tener la capacidad de generar estructuras específicas dentro de la región rostral del tubo neural<sup>205</sup> (Fig. I.2C).

Una de las regiones en la cual se han acumulado evidencias que sugieren que estos factores participan en la regionalización, es el mesencéfalo. En el octavo día de desarrollo embrionario del ratón (mE8), es posible detectar la transcripción de dos genes con cajas homeóticas de la familia *engrailed* (*En-1* y *En-2*). Estos sobrelapan entre el mesencéfalo y el metencéfalo con la expresión del proto-oncogen *Int-1* (*Wnt-1*), posteriormente, la expresión se extiende a otras zonas, detectándose *En-1* en el rombencéfalo y médula espinal, y *En-2* en el cerebelo<sup>51</sup>. Cuando se generó la mutación nula del gen de *Wnt-1*, los ratones mutantes homocigotos no desarrollaron el mesencéfalo, cerebelo y la región rostral del metencéfalo<sup>162</sup>. En *Drosophila*, se ha descrito que los genes *En* son regulados positivamente por *Wnt-1*, por lo que fue relevante demostrar que el defecto generado en la mutante se acompañó de la desaparición de la expresión de *En-1*<sup>163</sup>. Mutaciones en el gen de *En-1* generaron la pérdida de una parte importante del mesencéfalo, cerebelo y puente, lo cual se asemeja a la mutación de *Wnt-1*<sup>245</sup>, mientras que, mutantes en *En-2* muestran solo una reducción en el tamaño del cerebelo, y alteración en el patrón de foliación<sup>167</sup>. Las diferencias en los fenotipos obtenidos pudieran deberse a los distintos patrones de expresión de *En-1* y *En-2* en la unión meso-metencefálica, en vista que es posible

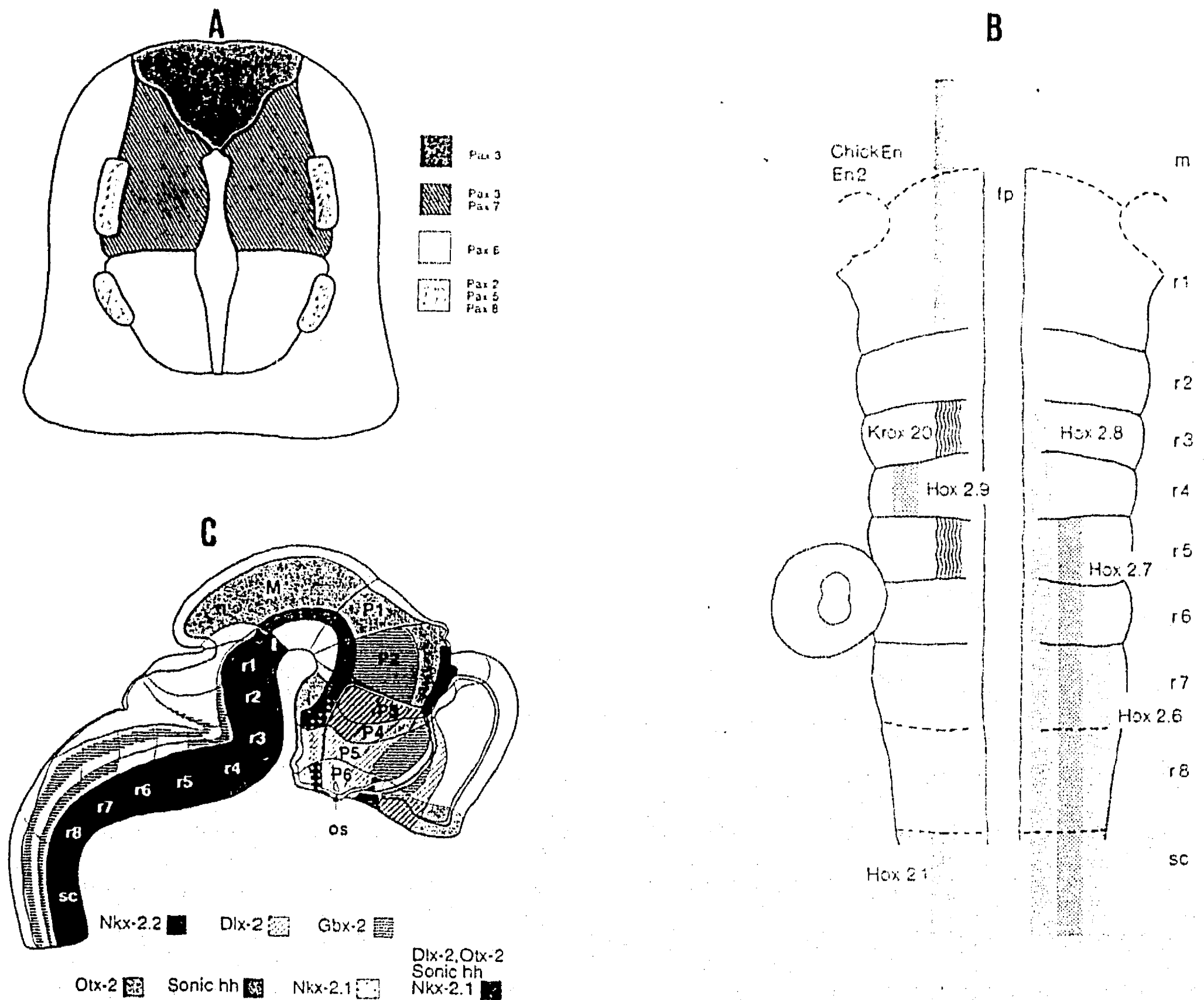


Figura 1.2. Moléculas con caja homeótica que tienen patrones de expresión restringidos en diferentes regiones del SNC del ratón. A) Expresión de genes Pax en el eje dorso ventral a la edad de 11 días de desarrollo. Pax-3 y Pax-7 se expresan en la zona ventricular de la placa alar. Pax-3 en la placa del techo. Pax-6 en toda la placa basal. En contraste, la expresión de Pax-2, Pax-5 y Pax-8 se restringe a un grupo de células en la zona ventricular de las placas alar y basal. B) Patrón de expresión de diferentes genes homeóticos en los rombómeros (r) a la edad de 9.5 días de desarrollo. C) Expresión de genes que delimitan regiones en el telencéfalo denominadas prosómeros (p) a los 12.5 días de desarrollo. I, itsmo; M, mesencéfalo; OS, tallo óptico; r, rombómeros; SC, médula espinal. Tomadas de las referencias 87,121,205.

recuperar la mutante de *En-1*, si se intercambia con recombinación homóloga por *En-2*<sup>93</sup>. De esta forma, los datos anteriores sugieren que *En-1*, *En-2* y *Wnt-1*, participan en la determinación o desarrollo de una región específica del SN dentro del eje antero-posterior.

Durante la regionalización dorso-ventral de la médula espinal, es probable que estructuras mesodérmicas participen en el establecimiento del patrón de expresión de factores transcripcionales determinantes. En apoyo de esta hipótesis, están los efectos de la notocorda, estructura mesodérmica localizada ventralmente al tubo neural, sobre la regulación de la expresión de los genes *Pax3* y *Pax6*: en el neuroepitelio indiferenciado de la médula espinal existe un gradiente de expresión dorso-ventral de *Pax3* y *Pax6*, el cual puede ser alterado si se remueve la notocorda o, al transplantar una notocorda adicional en la región dorsal<sup>84</sup>.

### C) Proliferación y diferenciación.

El control de la proliferación es de suma importancia durante el desarrollo. En muchos sistemas se ha descrito una relación inversa entre la proliferación y la diferenciación (i.e. células miogénicas<sup>188</sup>, epiteliales<sup>253</sup> y adipogénicas<sup>69</sup>). En particular los precursores neurales, al ser determinados para diferenciar a neuronas, pierden la capacidad de proliferar, por lo que al salir del último ciclo de división reciben el nombre de neuronas post-mitóticas. Lo anterior hace a este sistema un excelente modelo para estudiar los mecanismos que controlan la proliferación en el momento de dar origen a los fenotipos terminales. Durante el desarrollo es necesario generar la cantidad suficiente de células que integren las diferentes estructuras y, por otro, establecer en los tiempos adecuados a los diferentes fenotipos neuronales y gliales. De esta manera, debe existir un control preciso entre la proliferación celular y la diferenciación durante el desarrollo del SN.

Una de las moléculas que podría ser clave en este proceso es el producto del gen de Retinoblastoma (*Rb*), cuya función a su cargo es la de impedir la progresión a la fase S del ciclo celular<sup>210</sup>. Este supresor oncogénico es activo en su forma hipofosforilada<sup>27</sup>, condición bajo la cual secuestra a un factor transcripcional que modula positivamente los niveles de expresión de genes involucrados en el inicio de la fase S. Su relación

en el control de la proliferación y la diferenciación ha encontrado fundamento con el uso de oncogenes inmortalizadores (eg. antígeno T, del virus SV-40), muchos de ellos interactúan con Rb impidiendo su acción inhibitoria sobre el ciclo celular, y bloquean la diferenciación manteniendo a las células en un estado proliferativo. Existen líneas neurales que han sido derivadas por acción del oncogen antígeno T (AgT) de SV40 (ver Capítulo II, Sección B), en las cuales, la inactivación de AgT favorece que las células diferencien. De acuerdo con su posible papel en proliferación y diferenciación, la diferenciación neuronal inducida por NGF sobre células PC12 esta asociada a la defosforilación de Rb<sup>116</sup>. La relevancia que puede tener Rb en neurogénesis, se ha puesto en evidencia con la generación de ratones mutantes homocigotos para esta molécula. Estos ratones mueren poco después de la organogénesis (edades 12-13 días *post-coitum*), detectándose una muerte celular masiva en el SN, acompañada de un incremento importante en la proliferación del prosencéfalo y en la médula espinal, que se localiza en la zona intermedia del neuroepitelio, lugar donde solo deben hallarse neuronas post-mitóticas<sup>112,139</sup>. Así entonces, se ha propuesto que la actividad de Rb pudiera ser necesaria para inhibir la proliferación de precursores neurales, y/o al inicio de la diferenciación terminal de las neuronas. En vista que la actividad de Rb parece requerirse en poblaciones celulares específicas del sistema nervioso, es posible que otros miembros de la familia de Rb participen en el control de la proliferación de otras poblaciones del SN.

El control de la proliferación puede darse a muchos niveles, en los cuales la transcripción podría tener un papel importante. En este sentido se han descrito dos factores transcripcionales que podrían dirigir la proliferación de zonas particulares dentro SN. Uno de ellos es el producto del gen homólogo de *achaeta-scute* de *Drosophila* (Mash-1), el cual se expresa en forma preferente en zonas que experimentan proliferación activa durante el desarrollo del SN<sup>88</sup>. Cuando se muta esta proteína, los ratones homocigotos para esta mutación no muestran desarrollo de las neuronas simpáticas y neuronas olfatorias, probablemente por verse afectado el desarrollo de los precursores neurales de estas regiones<sup>89</sup>. Por otro lado, en el telencéfalo y en el tallo óptico se expresa en forma restringida, un factor transcripcional de la familia "winged helix", conocido con el nombre de factor cerebral-1 (BF-1). La pérdida de su función, redujo dramáticamente la división celular en la región ventral del telencéfalo, además favoreció la diferenciación prematura de neuronas en el telencéfalo, generando

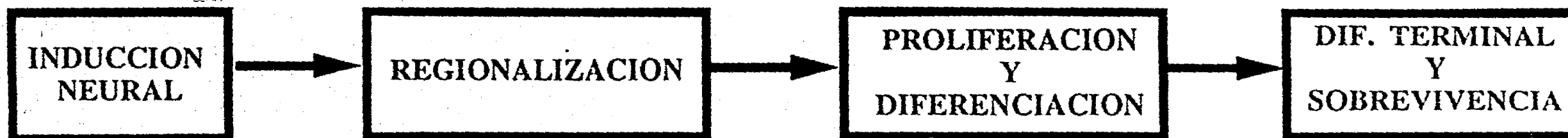
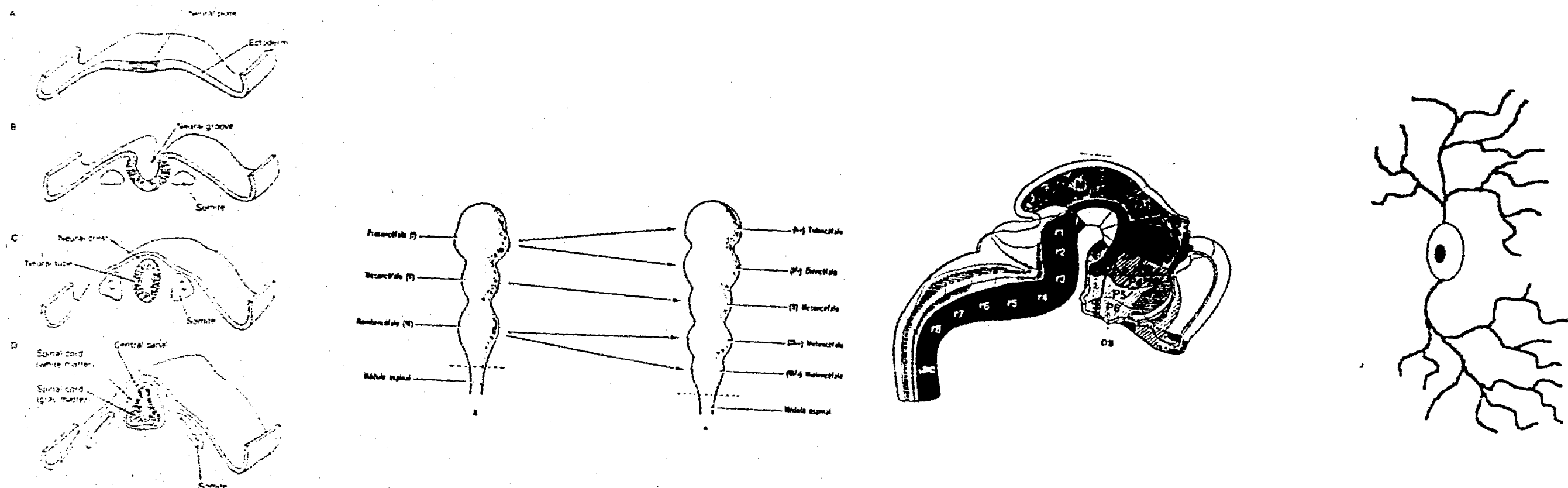
así una disminución dramática en el tamaño de los hemisferios cerebrales<sup>247</sup>. Estos últimos resultados apoyan la relación estrecha entre moléculas que controlan la proliferación celular y la diferenciación celular en el SN.

Dentro del evento de diferenciación en el SN es necesario, en primer lugar, establecer los dos principales linajes, neuronas o células gliales. Aunque se ha descrito la presencia de precursores comprometidos para cada uno de estos linajes (ver Capítulos II y IV), no se conoce cuales son las moléculas que determinan su existencia. Existen datos experimentales que sugieren que factores transcripcionales como N-Myc<sup>16</sup> y Gtx (gen con caja homeótica que se expresa en forma específica principalmente en oligodendrocitos)<sup>142</sup>, podrían participar en el establecimiento de las células gliales, mientras que L-Myc<sup>16</sup> y NeuroD<sup>140</sup> podrían participar en la determinación neuronal. Otro gen relevante en el control de la especificación glial se ha descrito en *Drosophila melanogaster*, llamado *glial cell missing* (gcm)<sup>102,114</sup>. Este gen codifica para un nuevo factor nuclear, cuya pérdida de función impide que se genere la mayor parte de células gliales, tanto del sistema nervioso central (SNC) como del sistema nervioso periférico (SNP) y, cuando se expresa ectópicamente, muchas neuronas se transforman en células gliales. Este es el primer reporte en el cual se demuestra la existencia de una molécula determinante en la especificación de linaje glial dentro del SN. Aunque no se ha encontrado, es posible que exista una molécula con una función similar en mamíferos.

Hay moléculas que tienen un papel clave en la diferenciación celular de varios fenotipos, como es el caso del homólogo en vertebrados de Sonic hedgehog (Shh, gen involucrado en la polaridad de segmentos en el desarrollo de *Drosophila*). Esta molécula, se expresa en la zona con actividad polarizante durante el desarrollo de los miembros, en la notocorda y en la placa del piso; en esta última región, determina el establecimiento de las motoneuronas en la médula espinal<sup>203</sup> y, en las regiones más rostrales del tubo neural, participa en la determinación de las neuronas ventrales del mesencéfalo<sup>108</sup>, del telencéfalo y del diencéfalo<sup>59</sup>. De esta forma, un efector único establece diferentes fenotipos, que diferencian de acuerdo con la información posicional presente en el eje antero-posterior del tubo neural.

El establecimiento del fenotipo terminal depende de información adicional, en la cual se han involucrado una serie de estímulos externos, que podrían regular la sobrevivencia y/o la maduración funcional de los fenotipos. Como ejemplo, se describirá con mayor detalle los fenotipos dopaminérgico y GABAérgico en los capítulos V y VI respectivamente.





NOGGIN

FOLISTATINA

bFGF

Wnt-1

En-1

En-2

Otx

Dlx

Gbx

Hox

Pax

bFGF

EGF

NGF

Mash-1

Rb

BF-1

CNTF

LIF

BDNF

Figura I.3. Moléculas que participan en el desarrollo del sistema nervioso. Se subrayan los factores de crecimiento.

## II) ESTRATEGIAS PARA ESTUDIAR A LOS PRECURSORES NEURALES.

Durante el desarrollo del SN poco se conoce a nivel molecular de los factores que controlan las diferentes respuestas celulares de los precursores neurales. Su estudio se ha limitado por la carencia de poblaciones homogéneas que faciliten su análisis. Como alternativas se han empleado líneas celulares en las cuales se puede favorecer la diferenciación neural. Recientemente, con el uso de agentes inmortalizantes o de factores de crecimiento, se han empezado a caracterizar precursores de diferentes regiones del SNC. En ambos casos, una de las incógnitas que se ha tratado de solucionar es conocer si existen células precursoras comprometidas hacia alguno de los dos principales linajes del SN, o si poseen la capacidad de generar a los dos. En vista de la gran diversidad de fenotipos que se deben de generar, y la cantidad de células a las que se da origen durante el desarrollo del SN, es muy posible que en las etapas tempranas se cuente con una célula "tallo", capaz de generar a los diferentes linajes, que pudiera mantener la capacidad proliferativa. De esta forma, las diferentes estrategias tratan de analizar los diferentes caminos que podrían tener las células en las diferentes fases de la diferenciación neural.

### A) Líneas neurales tumorales.

La línea celular más utilizada para estudiar la diferenciación neuronal ha sido la denominada PC12. Esta línea celular se derivó de un tumor de la médula adrenal, que mantiene la capacidad de diferenciar *in vitro* a neuronas simpáticas bajo el efecto del factor de crecimiento neural (NGF). Este sistema celular se ha utilizado para estudiar los factores extracelulares y los componentes intracelulares que participan en el evento de diferenciación neuronal<sup>211,230,243</sup>, así como los elementos que controlan la proliferación en el momento de determinarse hacia neurona simpática<sup>206,250</sup>. Líneas celular con propiedades similares se han obtenido a partir del neuroblastoma, tumor derivado de la cresta neural, las cuales puede diferenciar a neuronas después del estímulo con ésteres de forbol o ácido retinoico<sup>190</sup>. Utilizando varias de estas líneas celulares, se han identificado diferentes efectores extracelulares, vías de transducción intracelular y factores transcripcionales que están involucrados en el control de la diferenciación neuronal<sup>30,251</sup>. Si bien, es posible detectar múltiples

marcadores neuronales en estos sistemas, no se ha generado un fenotipo terminal bien diferenciado, además, estas líneas no ofrecen la posibilidad de analizar características particulares de cada uno de los fenotipos específicos del SN.

Una estrategia que se ha utilizado para generar líneas neuronales específicas es la fusión celular entre células primarias y células tumorales. Esta técnica se basa en el procedimiento utilizado con buenos resultados en la generación de hibridomas. Utilizando esta estrategia se generaron líneas neuronales del mesencéfalo<sup>40</sup> y septum<sup>39</sup>, las cuales han sido empleadas para el estudio de algunas características bioquímicas y estructurales de las células neurales. Aunque muchas de las propiedades fenotípicas se conservan y pueden ser analizadas, el fenotipo de las células híbridas es a menudo una mezcla compleja de factores citoplásmicos y nucleares de los tipos celulares empleados, de tal forma que las respuestas que se pueden generar en un sistema con estas características no reflejan fielmente lo que sucede en la célula normal.

A pesar de que los sistemas mencionados anteriormente han facilitado el avance en el conocimiento de los eventos que controlan la diferenciación neuronal, los resultados deben ser tomados con reserva, principalmente por que estas líneas al ser originadas de tejido tumoral, mantienen su condición de tejido transformado, proceso que en la mayoría de las ocasiones se relaciona con alteraciones cromosómicas presentes en los tumores. Actualmente se sabe que muchos de los requerimientos para la transformación, involucran alteraciones en las vías de transducción que controlan la proliferación, e inclusive, en algunos casos, es posible identificar alteraciones en las funciones de moléculas que gobiernan el ciclo celular. Estas consideraciones son importantes de tenerse en cuenta, ya que durante la diferenciación es necesario un control preciso de la capacidad proliferativa de las células en diferenciación. En favor de lo anterior, existen evidencias experimentales que demuestran que algunas de las moléculas claves del ciclo celular, como ciclinas, Rb y p53 (otro supresor oncogénico), pueden participar en la diferenciación celular<sup>194,215,254</sup>. De esta forma, es necesario contar con sistemas que permitan estudiar la diferenciación neuronal sobre tejido no transformado.

## B) Líneas neurales inmortalizadas.

Una estrategia experimental que ha solucionado en parte los problemas que presentan las líneas transformadas, es el uso de agentes inmortalizantes, que permiten generar líneas celulares sin las características de los tejidos transformados. Estas moléculas son oncogenes, capaces de desregular el ciclo celular, favoreciendo la proliferación celular. Dos estrategias han sido empleadas para la generación de líneas celulares con estas proteínas. La primera utiliza la generación de ratones transgénicos en donde se dirige la expresión del agente inmortalizador con un promotor específico hacia el tipo celular de interés<sup>32</sup>; esta estrategia ha generado pocas líneas celulares, las cuales se obtienen *in vivo* a partir de los tumores generados en los tejidos donde se expresa el oncogen, presentando así las mismas desventajas mencionadas anteriormente para las líneas tumorales. La segunda estrategia, utiliza la infección con vectores retrovirales para integrar al agente inmortalizador en el genoma de la célula que se desea estudiar, donde el requerimiento único, es que la célula a inmortalizar realice al menos una división mitótica, ya que el retrovirus necesita para su inserción estable en el genoma celular que la célula pase por la fase S del ciclo celular<sup>38</sup>. Con este procedimiento ha sido posible obtener *in vitro* una diversidad de líneas celulares generadas de diferentes regiones, durante el período en que los precursores neurales aún se encuentran en fase de proliferación activa. Las líneas obtenidas han sido generadas con Myc<sup>17,207</sup>, AgT<sup>62,72,154</sup> o Src<sup>24</sup>, entre otros: Myc es un factor transcripcional que participa en el inicio de la fase S del ciclo celular<sup>20</sup>, AgT interactúa con Rb (ver Capítulo I, Sección C), y Src es una tirosin cinasa con efectos diversos, algunos de los cuales pueden afectar el control de la proliferación<sup>192</sup>. Muy útiles han sido los oncogenes termosensibles, con lo que se hace posible controlar el estímulo que favorece la proliferación, permitiendo en muchos casos la diferenciación cuando se cultiva en la temperatura no permisiva, condición en la que no hay actividad de la proteína inmortalizante. Uno de los oncogenes termosensibles más utilizados es el alelo de AgT tsA58, molécula mutante que es inestable a 39 °C (temperatura no permisiva), mientras que a la de 33 °C es activa. De esta forma, la línea celular se puede producir y manipular a la temperatura permisiva (33 °C), y cuando se cultivan las células inmortalizadas a la temperatura de 39 °C, la actividad que favorece la proliferación se pierde, y las células diferencian. Esta propiedad ha sido de utilidad para estudiar el potencial diferenciativo de estas líneas *in vivo*, ya que al ser transplantadas en roedores, la

temperatura corporal inactiva a la proteína inmortalizante, facilitando su diferenciación.

Las líneas generadas con los agentes inmortalizadores han sido útiles para conocer el compromiso que presentan los precursores neurales al momento de dar inicio la neurogénesis. La mayoría de ellas tienen la capacidad de dar origen tanto a neuronas como a células gliales en implantes *in vivo*<sup>222</sup> o en ensayos *in vitro*<sup>63,72,182</sup>; lo anterior ha sido una evidencia importante de la capacidad bipotente de los precursores neurales. Así entonces, los precursores neurales poseen la capacidad de dar origen a una variedad de tipos celulares, que se establecerán de acuerdo a la información posicional recibida de su entorno.

De esta manera, es posible que las líneas inmortalizadas sean un modelo que represente a la posible célula "tallo" del tejido neural en desarrollo, con la capacidad de dar origen a la diversidad celular que integra al SN. Por otro lado, es posible que mediante la inmortalización se aislen precursores neurales en vías de diferenciación dentro de los diferentes linajes. Al respecto, se ha reportado que es posible generar diferentes líneas celulares que expresan distintos marcadores de superficie, receptores o enzimas, que se encuentran presentes *in vivo* durante la neurogénesis<sup>172,207</sup>.

A pesar de carecer de las características de los tejidos transformados, estas líneas pueden perder propiedades importantes presentes en los precursores neurales. En este sentido, se ha demostrado que precursores inmortalizados del cerebelo de la capa germinativa externa, pierden el control de los mecanismos que restringen su destino, lo cual favorece la generación *in vivo* de un mayor número de fenotipos (neuronas granulares, células estrelladas, células de Golgi, glia de Bergmann y astrocitos), con respecto a la capacidad que presenta el precursor intacto de esta región (solo neuronas granulares)<sup>79</sup>. De este modo, es posible que la presencia del oncogen y/o las alteraciones funcionales causadas por su inserción en el genoma, generen alteraciones en el programa de diferenciación. Es importante entonces establecer modelos experimentales que no sufran ninguna alteración genómica.

### C) Expansión de precursores neurales con factores de crecimiento.

En los últimos años se ha descrito cada vez con mayor frecuencia, la participación de factores de crecimiento en la proliferación de precursores neurales. Así, efectos del factor de crecimiento epidérmico (EGF), del factor de crecimiento transformante- $\alpha$  (TGF- $\alpha$ ) y/o del bFGF se han reportado en cultivos primarios del cerebelo<sup>77</sup>, bulbo olfatorio<sup>181</sup>, médula espinal<sup>198</sup>, mesencéfalo<sup>159,178</sup>, estriado<sup>37</sup> y retina<sup>6</sup>. En forma interesante, en ausencia de un substrato adherente y en presencia de EGF, se han podido expandir células precursoras del estriado de adulto<sup>202</sup> y del embrión<sup>201</sup>, y en presencia de bFGF, del neuroepitelio<sup>173</sup> e hipocampo<sup>199</sup>. La diferenciación de las células responsivas a EGF del estriado a neuronas o glia, se ve favorecida cuando se retira el factor de crecimiento y si se cultivan sobre un substrato adherente<sup>201,202</sup>. En algunos casos, es necesaria la presencia de medios condicionados<sup>124,173</sup>, o de otros factores de crecimiento<sup>2,80,238</sup> para favorecer la diferenciación. EGF o bFGF permiten mantener a estas células en cultivo por tiempo prolongado, congelarlas y recultivarlas, sin que, al parecer, pierdan su potencialidad caracterizada originalmente<sup>199,201</sup>.

Una de las incógnitas que se han intentado solucionar con estos sistemas, es conocer si los precursores neurales tienen compromisos establecidos para los diferentes linajes a generarse en el sistema nervioso central. Con EGF y bFGF se han aislado tanto precursores bipotentes, como comprometidos hacia neuronas o glia<sup>123,237</sup>. Estas diferencias probablemente se fundamentan en distintos requerimientos necesarios para diferenciar de los precursores neurales responsivos a EGF o bFGF, y/o a las etapas o regiones de desarrollo empleadas (i.e. precursores ya comprometidos). Así entonces, la capacidad de los precursores neurales expandidos con factores de crecimiento, para regenerarse así mismos, y de conservar la capacidad de diferenciar hacia los dos linajes del SN, los definen como probables células "tallos".

#### D) Análisis *in vivo* de precursores neurales.

El primer acercamiento que se ha realizado para estudiar el desarrollo del SN *in vivo*, ha sido identificar los fenotipos generados por los precursores neurales del SN. Para ello, se han empleado diferentes estrategias para evaluar los compromisos que presentan estos precursores neurales a diferentes tiempos durante el desarrollo del SN. Una de las estrategias que ha ayudado a identificar la mayor parte de los linajes en el SNP, ha sido el uso de tejidos quiméricos entre pollo y codorniz (ver detalles en el Capítulo IV, Sección A). Esta metodología, se auxilia de la diferente estructuración que presenta la heterocromatina en el núcleo de las células de codorniz, lo cual permite distinguir las fácilmente de las de pollo<sup>13</sup>. La distribución de la heterocromatina no se puede utilizar como único elemento de referencia, ya que solo permite identificar los núcleos celulares. En particular, en el SN es fundamental usar otros procedimientos que permitan observar a la célula completa, incluyendo sus proyecciones citoplásmicas para determinar, principalmente con qué células se entabla contacto sináptico. Para este fin, se han empleado marcadores de superficie especie específicos y colorantes vitales lipofílicos que permiten distinguir a la membrana celular<sup>138</sup>. El uso de estos procedimientos ha incrementado la versatilidad en el estudio de los precursores neurales *in vivo*, y ha extendido su aplicación al desarrollo del SN de los mamíferos.

Con las técnicas descritas previamente no es posible evaluar la relación clonal entre células diferenciadas, ya que por lo regular involucran el transplante de poblaciones celulares. Una de las técnicas que si contribuye a realizar este tipo de análisis es el marcaje con vectores retrovirales, que permite expresar en los precursores neurales marcadores enzimáticos como fosfatasa alcalina o beta-galactosidasa. Este procedimiento aprovecha que los retrovirus requieren que la célula a infectar esté proliferando, de tal forma que si se realiza la infección con una solución diluída del vector, el evento de infección se efectúa lo suficientemente aislado para que el análisis subsiguiente permita identificar el compromiso que presentan *in vivo* células precursoras únicas. Además, tiene la ventaja de que el marcador se hereda a todas las células descendientes, eludiendo el problema de dilución de los colorantes vitales. Experimentos utilizando esta técnica, realizados en la retina<sup>233</sup> y en la corteza<sup>241</sup>, llevando a cabo la detección del marcador retroviral y de proteínas de diferenciación específicas de

linaje, han demostrado que existen precursores neuronales con la capacidad de dar origen tanto a células gliales como a neuronas, en el caso de la retina aún en etapas tardías de la neurogénesis. Así mismo, en la corteza se ha descrito la presencia de precursores neurales con un compromiso predefinido para dar origen solo a neuronas o, a células gliales<sup>152,235</sup>. Estos resultados están de acuerdo con que existen precursores bipotentes que darían origen a poblaciones proliferantes con potencial diferenciativo restringido.

En los últimos años, se ha hecho posible transplantar precursores neurales *in vivo*. La mayoría de estos estudios han empleado líneas neurales inmortalizadas previamente caracterizadas *in vitro*, lo cual ha abierto la posibilidad de estudiar la influencia del ambiente circundante en la diferenciación neural. En este sentido, se ha demostrado que el ambiente que rodea a los precursores es determinante en la generación de los fenotipos. Así, se ha demostrado que precursores del cerebelo pueden incorporarse y diferenciarse adecuadamente en la corteza cerebral adquiriendo fenotipos presentes en esta última región<sup>224</sup>. Otros experimentos han permitido demostrar que es posible encontrar aún en el cerebro adulto señales que permitan el establecimiento adecuado de fenotipos terminales. Recientemente, se demostró que células precursoras de embriones porcinos implantadas en el mesencéfalo de roedores pueden diferenciarse a neuronas dopaminérgicas y establecer contactos sinápticos adecuados<sup>110</sup>.

La variedad de metodologías descritas facilitan de diferente forma el análisis de los precursores neurales, de tal modo que es posible apreciar que en la mayoría de los casos son complementarias. El conjunto de resultados obtenido con estos procedimientos, dan un panorama más claro del comportamiento de los precursores neurales.



### III) PARTICIPACION DE LOS FACTORES DE CRECIMIENTO EN EL DESARROLLO DEL SISTEMA NERVIOSO.

Durante el desarrollo, se debe generar por una parte, la masa celular suficiente para integrar cada región del organismo, y por otra, dar origen a los diferentes tipos celulares que lo integran. En el transcurso de este proceso, y en particular en el sistema nervioso, es necesario un control preciso de la proliferación celular, sobre todo teniendo en cuenta que las neuronas al diferenciar pierden la capacidad de proliferar. En favor de estos requerimientos, recientemente se reportó que variaciones en la actividad mitótica del neuroepitelio podrían contribuir, en etapas tardías del desarrollo, a las diferencias en el número de neuronas presentes en la corteza cerebral<sup>53</sup>. Por otro lado, desde hace varios años se ha determinado que la sobrevivencia neuronal depende del contacto con sus células blanco. En los últimos años los factores de crecimiento han adquirido gran importancia como efectores extracelulares, participando en diferentes fases del desarrollo del sistema nervioso (ver Capítulos I, IV, V, VI), dentro de las cuales el control de la proliferación, sobrevivencia y diferenciación debe ser fundamental (fig. III.1). Estas proteínas se han agrupado en familias o subfamilias de acuerdo a homologías en su secuencia y/o estructura, entre las que destacan las familias de factores relacionados con el EGF<sup>68</sup>, bFGF<sup>31</sup>, factor de crecimiento transformante- $\beta$  (TGF- $\beta$ )<sup>157</sup> y las neurotrofinas<sup>149</sup>. Cada una de estas familias se encuentra integrada por varios miembros, los cuales varían en su selectividad por las células blanco, y/o en las respuesta celulares que generan.

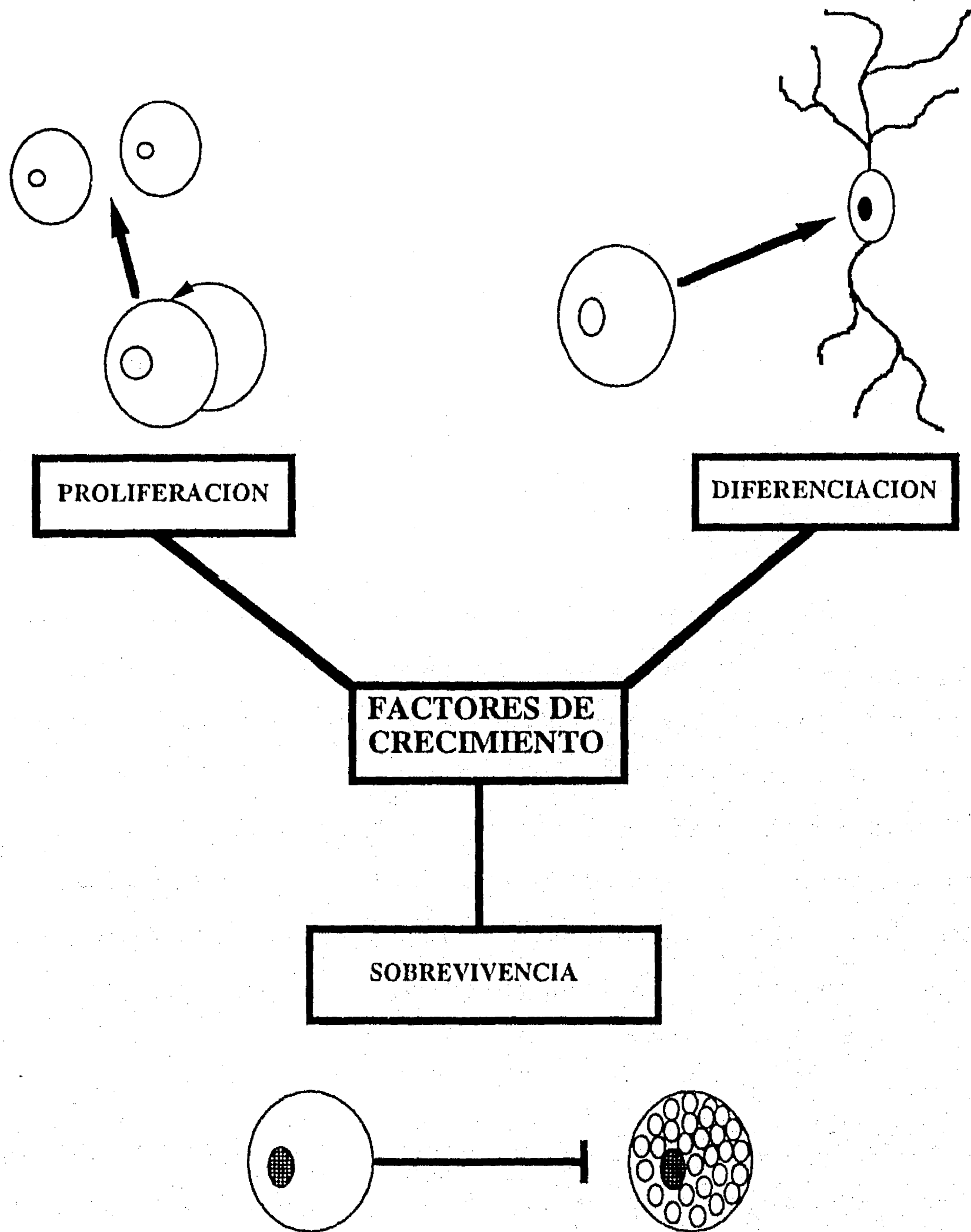


Figura III.1. Principales respuestas celulares generadas por los factores de crecimiento.

### A) Proliferación.

La capacidad de regular la división celular es una de las propiedades más documentadas de los factores de crecimiento. Actualmente se ha descrito que muchas poblaciones celulares responden a ellos<sup>128,164</sup>. En forma interesante, en el SNC en desarrollo se pueden detectar factores de crecimiento capaces de activar la proliferación de tejidos tanto de tipo epitelial como mesodérmico (e.g. EGF<sup>64</sup>, TGF- $\alpha$ <sup>136</sup>, bFGF<sup>131</sup>). Así mismo, los receptores para bFGF y EGF se encuentran presentes en etapas importantes del desarrollo neural. El receptor de bFGF se localiza en el neuroepitelio desde mE10<sup>200</sup>, etapa durante la cual hay una importante actividad mitótica. En el caso del receptor de EGF, éste se detecta desde mE15<sup>1</sup> en el cerebro, etapa en la cual correlaciona con la neurogénesis. De este modo, factores de crecimiento típicamente mitogénicos podrían participar también en la histogénesis del SN (ver adelante).

Los primeros efectos documentados de factores de crecimiento *in vitro* sobre células del SN fueron: la estimulación de la proliferación de astrocitos en respuesta a la presencia de EGF<sup>143</sup>, y la de oligodendrocitos por bFGF<sup>57</sup>. Más recientemente se ha documentado el efecto de los factores de crecimiento sobre precursores neurales, como es el caso de EGF y bFGF en la proliferación de precursores neurales bipotentes que ha quedado bien sustentada en varias regiones del SNC (ver Capítulo II, Sección C). En ocasiones es posible identificar que una misma población prolifera en respuesta a diferentes factores de crecimiento. Así por ejemplo, se identificó, en cultivos primarios del cerebelo, que las células precursoras de la capa germinativa externa incrementan la incorporación de timidina tritiada bajo el efecto del EGF, del factor de crecimiento semejante a insulina-I (IGF-I) o bFGF<sup>77</sup>.

La necesidad de más de un factor de crecimiento para estimular proliferación se ha demostrado en múltiples ocasiones. En realidad, la primera vez que se documentó la inducción de la proliferación de precursores neurales que dan origen a neuronas fue por la acción combinada de NGF y bFGF<sup>37</sup>. Dentro del linaje glial, PDGF en combinación con bFGF favorece la proliferación de los precursores de las células de Schwann<sup>113</sup>, mientras que, IGF-I en asociación de altas concentraciones de AMPc favorece la proliferación de

las células de Schwann ya diferenciadas<sup>213</sup>.

El mecanismo de acción por el que los factores de crecimiento favorecen la proliferación, debe incluir el facilitar la actividad de proteínas que gobiernan positivamente el ciclo celular. Principalmente durante el período G1, la célula recibe la información externa que determina, ya sea su salida del ciclo celular, o bien el compromiso para dividirse. En fibroblastos se ha determinado que PDGF, EGF y IGF-I (factores de crecimiento que favorecen su proliferación) controlan el progreso por la fase de G1 para que la célula se divida<sup>191</sup>. De manera similar se demostró, en cultivos primarios de precursores de bulbo olfatorio, que bFGF requiere actuar en la primera mitad de la fase G1 para favorecer la proliferación<sup>52</sup>. El tránsito por las diferentes etapas del ciclo celular (G1-S-G2-M), se encuentra controlado por ciclinas (proteínas cuya concentración fluctúa a través del ciclo celular)<sup>125,219</sup> y las proteincinasas dependientes de ciclinas (CDKs)<sup>234</sup>. La actividad del complejo ciclinas-CDK, específicamente los de la fase G1, puede ser controlado por proteínas como p53, quizá a través de inhibidores de CDK como p21<sup>90,246</sup>. Así entonces, es probable que los factores de crecimiento controlen la progresión del ciclo celular, a través de modular la actividad de los complejos ciclina-CDKs relevantes para el progreso de la fase G1.

## B) Supervivencia.

La capacidad de los factores de crecimiento para favorecer la supervivencia neuronal fue uno de los primeros efectos descritos, siendo las neurotrofinas (el factor de crecimiento neural (NGF), el factor de crecimiento derivado de cerebro (BDNF), la NT-3 y la NT-4/5) los ejemplos clásicos. El NGF fue el primero de los factores de crecimiento en ser caracterizado, el cual es importante para la supervivencia de las neuronas simpáticas y sensoriales<sup>144</sup>; BDNF<sup>141</sup> y NT-3<sup>204</sup> también incrementan la supervivencia de las neuronas sensoriales *in vitro*. Las neurotrofinas también participan en la supervivencia de neuronas del SNC; el NGF favorece la supervivencia de las neuronas colinérgicas del telencéfalo basal<sup>95</sup>, el BDNF y NT-3 la de las neuronas motoras<sup>103</sup>, dopaminérgicas del mesencéfalo<sup>105</sup> y colinérgicas del septum<sup>3</sup> e hipocampo<sup>183</sup>.

La relevancia *in vivo* de las neurotrofinas se ha fundamentado con la generación de mutantes para cada uno de estos factores o, de sus receptores. Con esto se ha corroborado que NGF y su receptor son necesarios para la sobrevivencia de las neuronas simpáticas y las del ganglio de la hasta dorsal<sup>47,220</sup>, mientras que BDNF lo es para las neuronas sensoriales<sup>115</sup> y NT-3 para las neuronas propioceptivas<sup>231</sup>. De esta forma, se ha postulado que diferentes poblaciones de neuronas muestran selectividad para las diferentes neurotrofinas. No obstante lo anterior, dichas mutaciones no afectan en la misma magnitud la sobrevivencia de las neuronas responsivas del SNC, a pesar de encontrar receptores para las neurotrofinas en algunas poblaciones celulares de este sistema.

Las neurotrofinas, si bien son los factores de sobrevivencia neural mejor caracterizados, no son los únicos. El factor inhibidor de leucemia (LIF), un factor inicialmente caracterizado como un factor de diferenciación en el sistema hematocitopoyético, favorece la sobrevivencia de las neuronas sensoriales, siendo sus efectos sobre poblaciones no responsivas a NGF<sup>174</sup>. El factor neurotrófico ciliar (CNTF), por otro lado, en pollo favorece también la sobrevivencia de neuronas simpáticas<sup>155</sup> y motoras<sup>10</sup>. El bFGF o miembros de esta familia pudieran encontrarse dentro de los más relevantes, puesto que su presencia ha mostrado ser efectiva en la sobrevivencia de diferentes tipos celulares del SNC<sup>11</sup>; por ejemplo, su actividad se ha relacionado con la sobrevivencia de fenotipos como el dopaminérgico<sup>66,160</sup> y colinérgico<sup>130</sup>. Recientemente, con la disponibilidad de distintos factores de crecimiento purificados o producidos mediante la tecnología del ADN recombinante, se ha podido demostrar la participación de múltiples factores de crecimiento en la sobrevivencia de fenotipos particulares del SNC (i.e. dopaminérgico y GABAérgico ver Capítulos V y VI).

El mecanismo de acción más común de los factores de sobrevivencia es probablemente de tipo parácrino. En general en el SNP, los factores parecen ser secretados por el organo blanco, de tal forma que, si se incrementa la cantidad de células blanco es posible evitar la muerte en un número proporcional de neuronas, de manera similar al efecto que se produce si se incrementa la concentración del factor *in vivo*. También se ha encontrado que las células gliales son una fuente importante de factores de crecimiento que actuarían igualmente de manera parácrina<sup>96</sup>. En forma interesante, se ha sugerido que en algunas neuronas los factores de

crecimiento pudieran actuar de manera autócrina. Lo anterior se fundamentó con la colocalización, en neuronas del telencéfalo, del ARNm de NGF, BDNF y NT-3 con la de sus receptores (trkA, trkB, y trkC, respectivamente)<sup>168</sup>.

Recientemente se ha demostrado que los efectos en sobrevivencia pueden participar en forma coordinada con la proliferación de células indiferenciadas. Durante el desarrollo de las neuronas simpáticas, es posible identificar que el neuroblasto pasa por dos períodos, en los cuales su responsividad a dos neurotrofinas cambia en forma dramática. Células obtenidas de ganglios simpáticos a los 14.5 días de desarrollo embrionario de la rata (rE14.5), sobreviven solo en respuesta a NT-3, mientras que en la etapa postnatal su sobrevivencia depende de NGF. Durante este proceso existe un cambio en el patrón de expresión de los receptores específicos para NT-3 (trkC) y el de NGF (trkA) que correlaciona con los períodos de responsividad para cada uno de estos factores<sup>18</sup>. En forma interesante, las células que sobreviven en respuesta a NT-3 pudieran tener la capacidad intrínseca de continuar proliferando<sup>55</sup>. De esta manera, además de verse estrechamente regulada la proliferación con la sobrevivencia, es posible apreciar un cambio secuencial de responsividad a diferentes factores durante el desarrollo. Un evento similar se describió para las neuronas motoras, en el cual durante el período embrionario la responsividad es mayor para BDNF, siendo la sobrevivencia en la etapa postnatal dependiente de CNTF<sup>49</sup>. De esta manera, es posible que la variedad de factores que muestran efectos sobre un mismo fenotipo participen en forma coordinada sobre diferentes períodos de su desarrollo.

La muerte neuronal durante el desarrollo, así como la que ocurre en algunas enfermedades neurodegenerativas, se sucede mediante el proceso conocido comúnmente como apoptosis. Por lo tanto, los factores de sobrevivencia debieran de actuar impidiendo que se active dicho proceso. Este tipo de muerte es controlada por una maquinaria endógena, y aparentemente latente durante la vida de todas las células, de tal forma que casi todas las células requieren de factores de sobrevivencia. El efecto de los factores de sobrevivencia puede darse a dos niveles: en la cascada de transducción que activa la maquinaria de muerte, o directamente impidiendo la acción de los componentes intrínsecos de este proceso. En la vía de transducción, incrementos en las especies reactivas de oxígeno pudieran ser importantes; recientemente se demostró que el

retiro de NGF a neuronas simpáticas, conduce a un incremento en las especies reactivas de oxígeno, y que la muerte causada por la privación de este factor, se puede bloquear mediante la expresión de la superóxido dismutasa<sup>85</sup>. Proteínas pertenecientes a la familia de BCL-2 (un agente antiapoptótico) o ICE (promotor de la apoptosis), dos componentes fundamentales de la maquinaria de muerte, pudieran también ser blanco de los factores de supervivencia que actúan en células del SN. En este sentido, BCL-2 puede reemplazar el efecto de NGF en la supervivencia de las neuronas sensoriales<sup>5</sup> y, por otro lado, en forma interesante, algunas de estas moléculas se expresan en el SN de embriones<sup>166</sup>, postulando así su posible participación durante el desarrollo.

### C) Diferenciación.

El primer fenotipo para el cual se demostró la participación de los factores de crecimiento en su diferenciación fue el fenotipo colinérgico (neuronas productoras de acetil colina), siendo este el modelo de diferenciación mejor documentado del SNP. La diferenciación de las neuronas simpáticas colinérgicas se favorece por el factor de diferenciación colinérgico (CDF), también conocido con el nombre de LIF<sup>249</sup>. Su efecto se ha relacionado con la regulación positiva de la expresión de diferentes marcadores que determinan el fenotipo colinérgico, y la pérdida de la tirosina hidroxilasa, enzima presente regularmente en la célula precursora del linaje simpático y en las neuronas adrenérgicas. El CDF es además capaz de inducir la diferenciación colinérgica de precursores que diferenciarían naturalmente a neuronas adrenérgicas<sup>75</sup>. La conversión de las neuronas adrenérgicas a colinérgicas es un evento que se puede reproducir *in vivo* si los axones adrenérgicos se ponen en contacto con glándulas salivales<sup>134</sup>, tejido normalmente innervado por neuronas colinérgicas. No obstante, este último efecto no parece ser generado por CDF sino por una proteína unida a membrana, relacionada con el factor neurotrófico ciliar<sup>197</sup>, el cual también regula de manera similar la expresión del mismo conjunto de genes en las neuronas simpáticas<sup>208</sup>.

En los últimos años, al poderse propagar precursores neurales con factores de crecimiento, se ha abierto la posibilidad de estudiar las moléculas que modulan la diferenciación de las células precursoras del SNC. En este sentido, *in vitro* NT-3 favorece la diferenciación neuronal de precursores derivados de la corteza<sup>80</sup>,

mientras que BDNF la de los obtenidos del hipocampo<sup>2,238</sup>. En el establecimiento de estas neuronas es posible que existan factores adicionales, en vista de que mutantes nulos de NT-3<sup>231</sup> y BDNF<sup>115</sup> no muestran ningún efecto relevante en la diferenciación neuronal. De este modo, al igual que en la proliferación y sobrevivencia, es probable que en la diferenciación neuronal participen varios efectores de forma coordinada, que regulen adecuadamente la expresión de las moléculas participantes en la determinación y función del fenotipo terminal (i.e. procesos de síntesis, recaptura y degradación específicos para el neurotransmisor, formación de neuritas y establecimiento de sinápsis adecuado con el organo blanco). En este sentido, en los últimos años se han incrementado las evidencias *in vitro* que indican que múltiples factores de crecimiento participan en el desarrollo de diferentes fenotipos; como ejemplos, se describirán los factores que participan en el desarrollo de los fenotipos dopaminérgico (Capítulo V) y GABAérgico (Capítulo VI).

#### D) El precursor O2A.

Como se puede apreciar de los incisos anteriores, un solo factor puede tener una variedad de actividades, afectar a una diversidad de tipos celulares, en los que se incluyen tanto células gliales como neuronas y, en ocasiones, incluir acciones sobrelapadas con otros factores. Sin embargo, a pesar del pleiotropismo, el desarrollo de los diferentes fenotipos terminales se realiza de una manera muy precisa, probablemente involucrando cambios temporales en la expresión y/o responsabilidad a los diferentes efectores.

Uno de los modelos *in vitro* en el que se han estudiado con cierto detalle las interacciones que se presentan durante el desarrollo de fenotipos terminales, es la diferenciación del precursor O2A el cual da origen a oligodendrocitos y astrocitos tipo-2. El estudio de este tipo celular se ha facilitado por la simplicidad con que se pueden aislar poblaciones enriquecidas a partir del nervio óptico de la rata. En este sistema, se ha demostrado que el PDGF y el bFGF favorecen la proliferación del precursor<sup>22,185</sup>, mientras que la diferenciación hacia astrocitos tipo 2 es mediada por el CNTF<sup>104</sup> y, la de oligodendrocitos depende de un reloj interno<sup>67</sup>, el cual pudiera controlar la producción de TGF- $\beta$ <sup>161</sup>. Así mismo, se ha descrito la participación de células accesorias, como astrocitos tipo I o células del mesénquima, las cuales secretan componentes de la matriz extracelular que



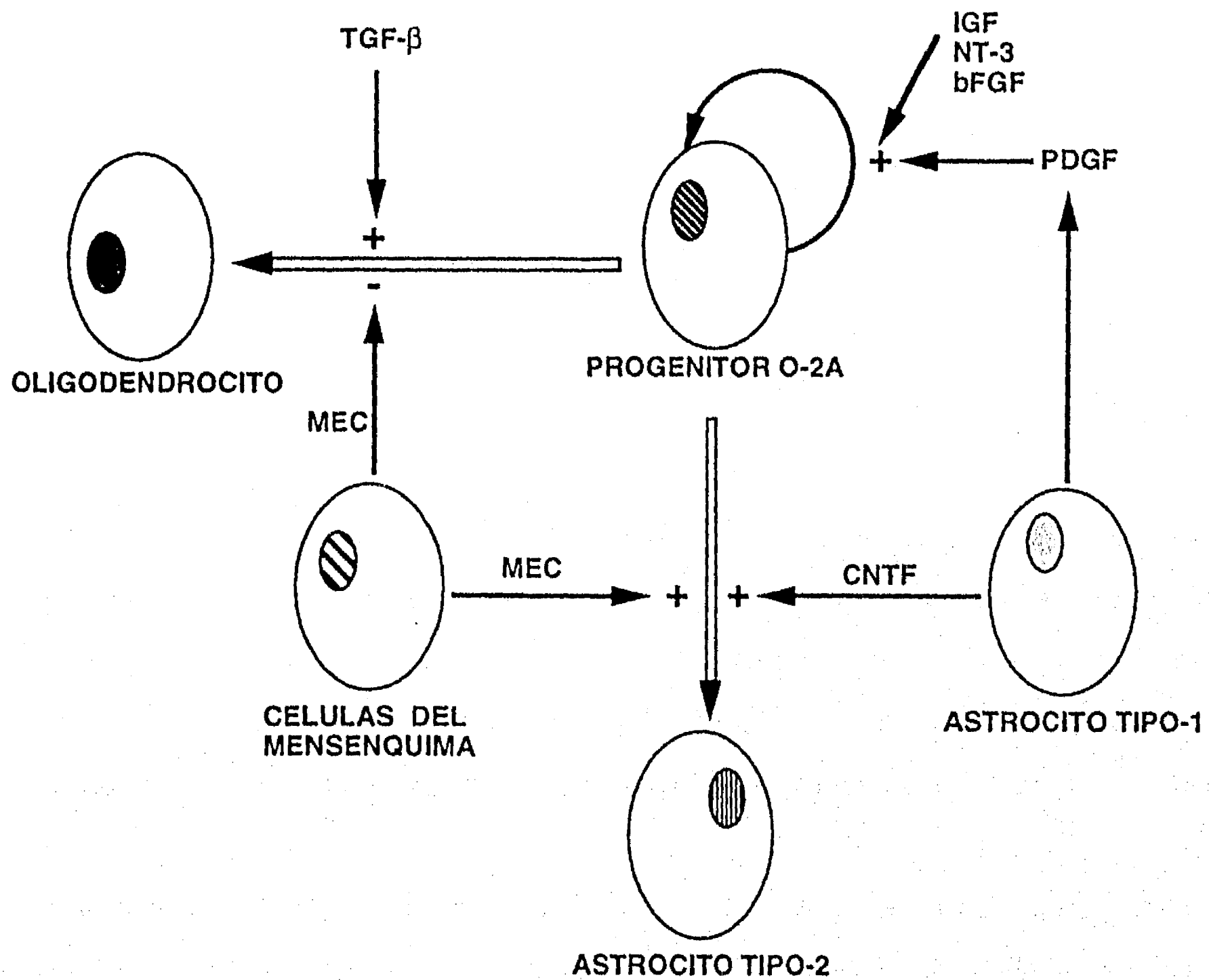


Figura III.2. Células y señales que participan *in vitro* en el control de la proliferación y diferenciación del progenitor O-2A. La capacidad proliferativa del precursor O-2A es regulada por IGF-I, NT-3, bFGF y PDGF. Mientras que su diferenciación es modulada por células accesorias del mesénquima y por astrocitos tipo-1. MEC = matriz extracelular.

regulan en forma concertada los eventos de proliferación o diferenciación<sup>83,148</sup> (Fig. III.2).

El contar con precursores comprometidos hacia fenotipos particulares pudiera permitir, de manera análoga al precursor O2A, estudiar las interacciones de los diferentes factores que participan en su establecimiento y maduración funcional.

#### **E) Mediación intracelular.**

De manera similar a otras señales extracelulares, los factores de crecimiento realizan sus efectos activando receptores proteicos, que desencadenan una cascada de eventos intracelulares que en algunos casos, culminan en la activación de factores transcripcionales. Para el caso de los receptores con actividad de tirosin cinasa, una vez que el efector interactúa con su receptor se favorece la homodimerización que activa la fosforilación intermolecular en residuos de tirosina. Lo anterior lleva a la activación de la vía de c-Ras (protooncogen cuya actividad depende de GTP) y, aunque no se ha mostrado en todos los casos, también a la generación de segundos mensajeros típicos de los receptores que activan proteínas G, como diacilglicerol y fosfoinosítidos. Finalmente, a través de terceros mensajeros, como c-Fos, se activan transcripcionalmente diferentes genes que participan en la respuesta celular. Es también posible que en fases intermedias de la cascada transduccional se module directamente la actividad de algunas proteínas<sup>43,97</sup>.

De lo descrito anteriormente, la vía de transducción mejor caracterizada es la que involucra c-Ras (Fig. III.3). Como se mencionó, ésta da inicio con la autofosforilación del receptor en residuos de tirosina, lo cual permite la unión de proteínas que presentan motivos de homología de src (SH-2, un dominio que se une a fosfotirosinas) conocidas con las siglas Shc. Dichas proteínas son a su vez fosforiladas en residuos de tirosina, activando así una cascada de eventos intracelulares que desembocan en la activación de c-Ras. Esta proteína está unida a la membrana plasmática, y requiere intercambiar GDP por GTP para activarse, evento que se encuentra modulado por una molécula que estimula el recambio de GDP por GTP (SOS). Este evento se favorece mediante GRB2, una proteína conectora que tiene dominios SH-2, que le permiten su unión al receptor

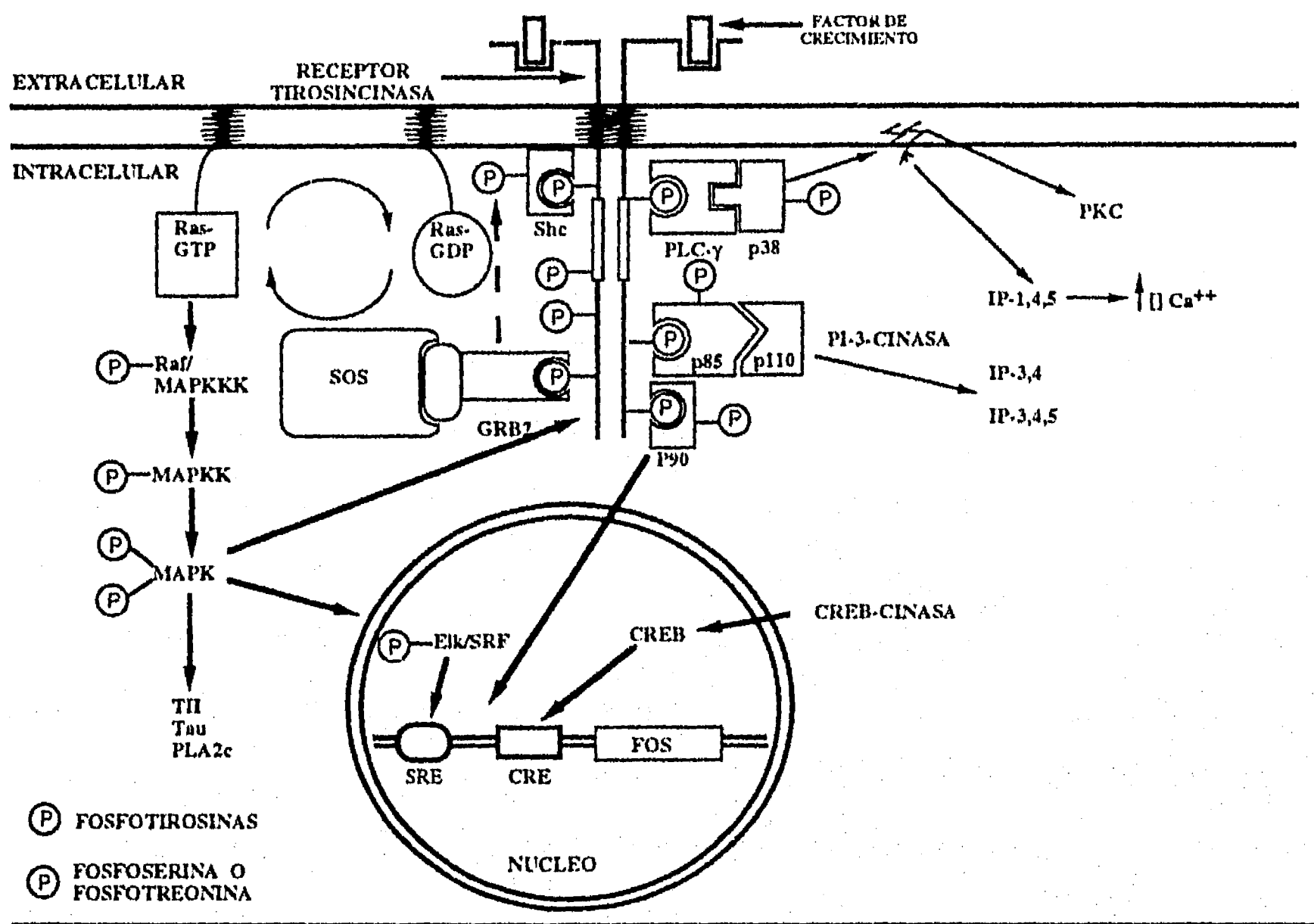


Figura III.3. Modelo de la mediación intracelular por factores de crecimiento. El factor de crecimiento interactúa con su receptor tipo tirosincinasa, induciendo la dimerización del receptor y su autofosforilación. Esto es seguido por el reclutamiento a la membrana de diferentes moléculas, que participan en la transducción de la señal inducida por el factor de crecimiento. La vía más extensamente estudiada conduce a la activación de la MAPK. La transcripción del gen c-fos se activa a través de varios complejos transcripcionales como Elk/SRF y CREB, los cuales se fosforilan por un mecanismo dependiente de p21Ras. SRE, elemento responsivo a suero; SRF, factor de respuesta a suero; SNT, proteína blanco asociada a *suc* fosforilada en tirosina por factores de crecimiento; PLC- $\gamma$ , fosfolipasa C  $\gamma$ ; PI-3 K, fosfatidil inositol 3 kinasa. Modificada de la referencia 101.

fosforilado, y SH-3, que permite la formación de complejos con proteínas que poseen regiones ricas en prolina, como es el caso de SOS. Así entonces, una vez activado el receptor, el complejo GRB-2/SOS se une directamente, o a través de otra proteína conectora denominada de manera genérica Shc, con lo que se promueve el reclutamiento de SOS a una posición contigua a la membrana celular con la consiguiente activación de c-Ras. Una vez que c-Ras libera GDP y une GTP, este estimula la fosforilación de raf, la cual fosforila en residuos de serina o treonina a la MAP-KKK (fosforilasa de la fosforilasa de la proteincinasa activada por mitógenos). Esta última, a su vez fosforila MAP-KK, que finalmente activará a la MAP-K (también conocida como cinasa activada por señales extracelulares ERK). Actualmente se han descrito al menos dos cinasas relacionadas, ERK1 y ERK2, que varían en los blancos celulares sobre los que actúan. En células no neuronales se ha demostrado que ERK-1 fosforila c-myc y, ERK-2, un complejo proteico que incluye al factor responsivo a suero<sup>43</sup>, que activa la transcripción de c-FOS, a través de su elemento responsivo al suero en la región promotora. c-FOS es un protooncogen que participa en el control de la proliferación celular, entre muchos otros procesos y es parte básica del complejo transcripcional AP-1<sup>218</sup>.

Vías de transducción alternativas a la de c-Ras son posibles a través de segundos mensajeros clásicos como diacilglicerol y los fosfoinosítidos. Estos segundos mensajeros son generados por la actividad de la fosfolipasa C-gamma (PLC- $\gamma$ ) y de la fosfatidil-inositol-3-cinasa (PI-3K). Ambas proteínas presentan un dominio SH-2 que les permite interactuar directamente con los receptores tirosin cinasas, y consecuentemente activarse por fosforilación en sus residuos de tirosina.

La activación transcripcional mediada por factores de crecimiento está regulada, además de complejo AP-1, por al menos otros dos tipos de moléculas que incluyen a p91 y un conjunto de proteínas denominadas Stat. El complejo AP-1 se encuentra constituido por las proteínas c-Fos y c-Jun, siendo su actividad quizá necesaria en las diferentes respuestas celulares (proliferación, diferenciación, sobrevivencia). p91 es un factor que puede ser activado por fosforilación en forma directa por el receptor, ya que posee un dominio SH-2; la forma activa se transloca al núcleo, donde ha demostrado ser pieza importante en la activación transcripcional mediada por citocinas y EGF<sup>209</sup>. Las Stat son una familia de factores transcripcionales que se activan bajo el

efecto de diferentes citocinas y CNTF, a través de fosforilación en residuos de tirosina. En general, los receptores para citocinas no poseen en forma intrínseca alguna actividad conocida; sin embargo, al interactuar las citocinas con su receptor, se le unen y activan proteínas que poseen la actividad de tirosincinasas, entre las que destacan Jaks, Fyn, Lyn y Syk<sup>228</sup>.

En la mayor parte de receptores del tipo tirosincinasas, se ha demostrado la participación de las moléculas descritas anteriormente, incluyendo al de EGF, neurotrofinas, insulina y bFGF. Otros tipos de receptores como los que unen TGF- $\beta$ , muestran actividad intrínseca de serin-treonincinasas<sup>244</sup>, sin embargo poco se conoce de las moléculas transductoras que participan en la mediación de sus efectos.

A pesar del avance logrado en la identificación de los componentes que participan en la transducción de señales por los receptores de factores de crecimiento, no se ha identificado cual es el mecanismo por el que se favorecen las diferentes respuestas celulares. Lo anterior es particularmente relevante dada la multitud de respuestas que se generan a través de un mismo mecanismo transductor.

#### IV) CARACTERISTICAS GENERALES DE LOS PRECURSORES DEL SISTEMA NERVIOSO.

El sistema nervioso está integrado por dos grandes componentes el central y el periférico. Las células precursoras que dan origen a los diferentes fenotipos en estos sistemas divergen desde temprano en el desarrollo. Todos los fenotipos que integran al sistema nervioso central (SNC) se originan de los precursores neurales que constituyen el neuroepitelio. Por otro lado, el sistema nervioso periférico (SNP) se genera de la cresta neural, estructura especializada formada por una población celular originada de los márgenes laterales de la placa neural, que al momento del cierre del tubo neural, migra e invade a prácticamente a todo el embrión; estas células además del SNP, dan lugar a una variedad de tipos celulares no neuronales, entre los que se incluyen a los melanocitos, a las células cromafines de la médula adrenal, y derivados del mesénquima de la cabeza, que incluye condrocitos y tejido conectivo, entre otros.

##### A) El sistema nervioso periférico.

El sistema nervioso periférico, constituido por las neuronas entéricas, los ganglios sensoriales, simpáticos y parasimpáticos, es uno de los modelos experimentales donde se ha podido caracterizar finamente el desarrollo de sus diferentes componentes celulares. En forma particular, su estudio ha avanzado notablemente por la facilidad con la que es posible aislar células de la cresta neural, así como por el desarrollo de tejidos quiméricos entre codorniz y pollo. Esto ha permitido analizar las rutas de migración de las células precursoras, e identificar a los diferentes tipos celulares que se generan a partir de la cresta neural<sup>13</sup>. El análisis de los fenotipos celulares generados *in vivo* ha establecido la existencia de células pluripotentes desde antes de iniciarse la migración, que darán origen a fenotipos tan variados como neuronas simpáticas, melanocitos y condrocitos<sup>25</sup>. Cuando se examinan los diferentes linajes generados por cada una de las regiones en el eje rostro caudal, es posible identificar que hay una regionalización de los fenotipos generados. Por ejemplo, células de la cresta neural ubicadas en la región sacra, muestran preferencia para generar ganglios parasimpáticos, mientras que componentes del tronco, dan origen a ganglios simpáticos y sensoriales.

Experimentos *in vivo* donde se transplantaron células de la región sacra en el tronco, o viceversa, demostraron que es posible dar origen a fenotipos terminales de acuerdo al sitio del implante<sup>137</sup>. Lo anterior reafirmó la existencia de un precursor pluripotente, y sugirió, que el medio que rodea al precursor tiene un papel importante en la determinación de los fenotipos. Además permitió a Anderson proponer que los linajes generados de la cresta neural, se derivan de manera similar a los del sistema hematopoyético<sup>7</sup>.

Conforme las células de la cresta neural avanzan en el desarrollo, se ha propuesto que se va restringiendo la variedad de tipos celulares a los que se puede dar origen. En los últimos años, se han acumulado evidencias experimentales que postulan la existencia de células precursoras que tienen el compromiso de generar tanto a células cromafines como a neuronas simpáticas, denominándose a esta célula precursor simpatoadrenal<sup>8</sup>. Experimentos *in vitro* con células precursoras de la cresta neural o con precursores inmortalizados, demostraron la capacidad de estas células para diferenciar a células cromafines y a neuronas simpáticas, eventos en los que se necesitó de diferentes factores ambientales. La presencia de glucocorticoides por ejemplo, favorece la diferenciación hacia células cromafines, mientras que la diferenciación a neuronas simpáticas se facilita por el factor de crecimiento neural (NGF)<sup>9</sup>. El establecimiento *in vitro* de las neuronas simpáticas requiere además de la presencia de bFGF y de CNTF<sup>109</sup>, y condiciones despolarizantes<sup>19</sup>.

La diferenciación *in vitro* de neuronas simpáticas a partir de las células cromafines o de líneas inmortalizadas de precursores de la cresta neural, se acompaña de cambios en la expresión de marcadores de superficie, y de enzimas intracelulares que participan en la síntesis del neurotransmisor. Hay evidencias experimentales que proponen la presencia de precursores con potencial restringido durante el desarrollo de los derivados de la cresta neural, hacia otros fenotipos, entre los que destacan el melanocítico, colinérgico o glial.

En la restricción del potencial diferenciativo del precursor de la cresta neural también participan diferentes factores ambientales, modulando diferentes respuestas celulares como: la proliferación, diferenciación y/o sobrevivencia. En este sentido, los factores de crecimiento son de los estímulos externos que más efectos han presentado. Por ejemplo: se ha descrito que la proliferación de las células de Schwann se

favorece en la presencia de bFGF y TGF- $\beta$ <sup>212</sup>; los precursores de los melanocitos requieren para su desarrollo de la actividad del LIF<sup>177</sup>, además, como se comentó anteriormente este mismo factor es necesario para la diferenciación de las neuronas colinérgicas<sup>175</sup> y sensoriales<sup>176</sup>. El precursor de la cresta neural que da origen a las estructuras craneofaciales requiere de la actividad del receptor tipo- $\alpha$  para el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF)<sup>169</sup>. Por otro lado, la proliferación de los neuroblastos simpáticos se facilita por neurotrofina-3 (NT-3) al incrementar su sobrevivencia<sup>55</sup> y, la diferenciación de las neuronas sensoriales es favorecida por insulina y el IGF-I<sup>65,248</sup>, mientras que su sobrevivencia se incrementa por el BDNF<sup>28</sup>. Esta diversidad de efectos permiten sugerir, que durante el desarrollo es necesario una variedad de estímulos, requeridos en tiempos particulares para el desarrollo adecuado de cada uno de los diferentes tipos celulares.

La hipótesis de que los precursores pluripotentes pueden restringir su potencial por modulación de estímulos externos, se ha reforzado con el reciente aislamiento de una célula precursora de la cresta neural, capaz de dar origen a neuronas y glías *in vitro*<sup>226</sup>. Esta célula mantiene la capacidad bipotente a través de varios pases, y además es posible identificar células proliferantes comprometidas a dar solo neuronas o glías. En forma relevante, si se cultiva en presencia del factor de crecimiento glial, la mayor proporción de células que diferencian lo hacen en forma preferente hacia el fenotipo glial<sup>217</sup>. De esta forma, un precursor, al menos bipotente, recibe información externa que restringe su diferenciación terminal.

## **B) El sistema nervioso central.**

El neuroepitelio es un epitelio pseudoestratificado, constituido por células en proliferación activa, las cuales permanecen confinadas durante la etapa embrionaria en la zona ventricular o zona germinativa, que en el adulto formará a la zona subventricular, (una excepción a esta regla se encuentra en el cerebelo, donde el precursor de las neuronas granulares deja la zona ventricular, y migra a la superficie externa del cerebelo en desarrollo, y forma la capa germinativa externa). Durante la fase S del ciclo celular, los núcleos se encuentran en la región más externa del tubo neural, mientras que en la fase de mitosis se encuentran en la capa más interna (zona ventricular); una vez que la célula precursora realiza su última mitosis, migra hacia la periferia del tubo



neural, donde finalmente diferencia terminalmente, generando la zona del manto (Fig. IV.1). Durante el desarrollo de los fenotipos del SNC, es posible identificar etapas claramente definidas, que comprenden las siguientes: proliferación celular, migración, diferenciación y formación de neuritas con el consiguiente establecimiento de sinápsis. Los precursores neurales proliferan bajo un control estricto, de manera que las neuronas postmitóticas se generan en días específicos del desarrollo. De esta forma, en la médula espinal de la rata se experimenta neurogénesis durante los días rE11 a rE16<sup>73</sup>, y en la corteza se lleva a cabo entre rE16 y rE21; así mismo, es posible distinguir un gradiente ventro-dorsal en la proliferación durante la diferenciación neuronal en la médula espinal<sup>186</sup>. En vista de las diferencias que se presentan en los ejes antero-posterior y dorso-ventral, es posible que las moléculas involucradas en la regionalización regulen señales que controlan la proliferación celular.

Al dar inicio la neurogénesis se identifican en el neuroepitelio dos poblaciones con morfologías diferentes, la glia radial y las neuronas postmitóticas. Se han realizado esfuerzos importantes para estudiar a la célula precursora que da origen a las neuronas en el SNC. El primer acercamiento, fue estudiar el compromiso que tienen los precursores en el momento de dar inicio la neurogénesis. Así, analizando *in vivo* los linajes generados por clonas de precursores marcados con retrovirus en la retina<sup>233</sup> y tectum óptico<sup>76</sup>, se apoya la existencia de precursores bipotentes durante la etapa de neurogénesis, con la capacidad de dar origen tanto al linaje neuronal como glial.

En la corteza, desde que da inicio la neurogénesis, es posible identificar la presencia de precursores comprometidos hacia alguno de los dos principales linajes (neuronal o glial)<sup>151</sup>, sin embargo, experimentos *in vitro* donde se analizó la descendencia de precursores aislados únicos de esta región, demuestran la coexistencia tanto de precursores bipotentes como comprometidos al linaje glial o neuronal<sup>50,229</sup>. En el mismo sentido, se ha demostrado *in vivo*, con marcajes retrovirales, la existencia en un porcentaje reducido de precursores no comprometidos durante todo el desarrollo de la corteza embrionaria<sup>241</sup>, los cuales pudieran mantenerse en forma quiescente en la etapa adulta y mantener la misma capacidad bipotente<sup>170</sup>. Estas células podrían ser las mismas que responden al EGF, para las cuales se ha descrito que tienen la propiedad de dar origen a

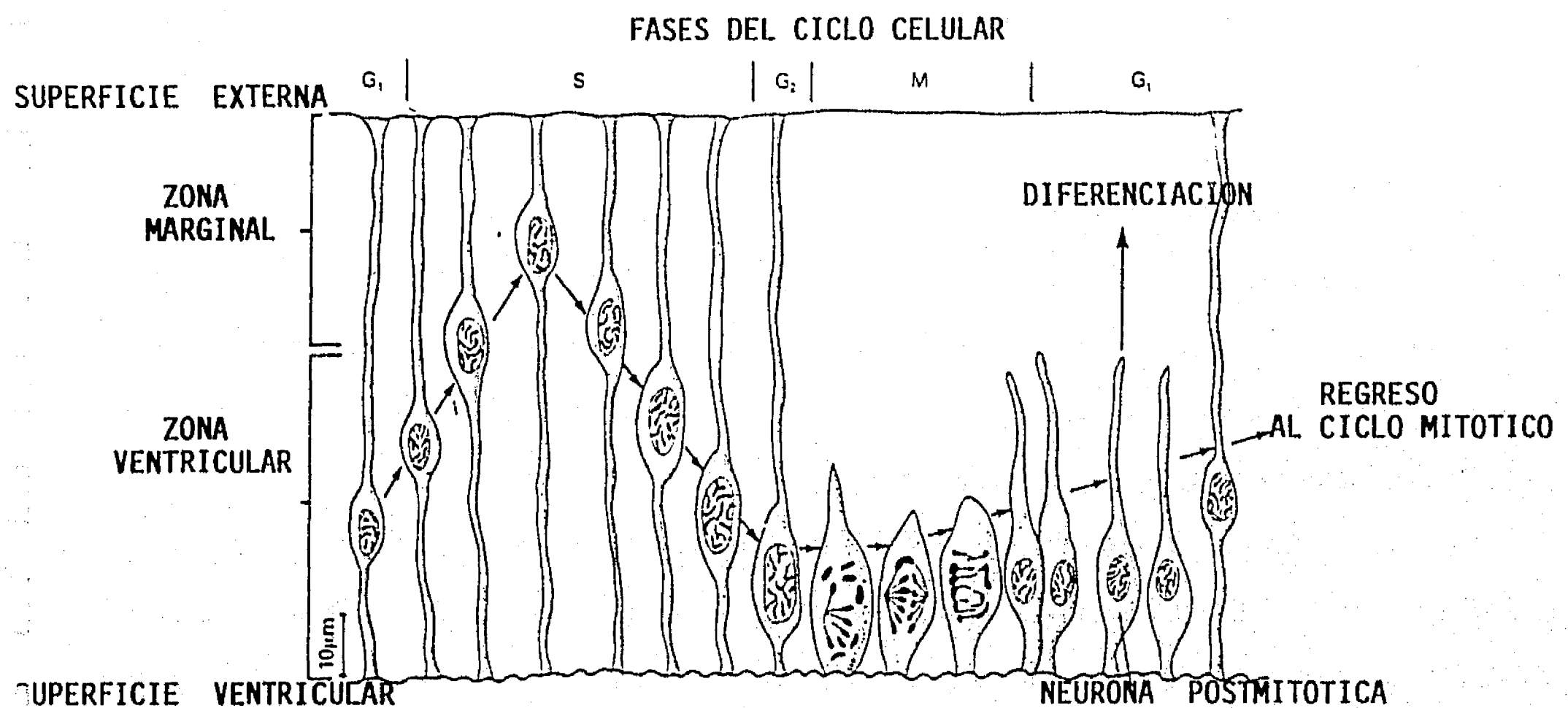


Figura IV.1. Neurogénesis en el neuroepitelio. Las células que se dividen activamente en la zona germinativa, muestran movimientos característicos del núcleo, que pueden ser identificados en terminos de las 4 fases del ciclo celular: G<sub>1</sub>, S, G<sub>2</sub> y M. Los núcleos se encuentran en la zona ventricular durante la fase G<sub>1</sub>. Durante la síntesis de ADN (fase S), los núcleos se ubican en la zona marginal. Durante la fase G<sub>2</sub> los núcleos migran nuevamente hacia la superficie ventricular, donde retraen su proceso citoplásmico, y experimentan mitosis (fase M). Las células hijas pueden reingresar al ciclo y entrar a la fase G<sub>1</sub> ó, migrar a la zona marginal en donde diferenciarán terminalmente.

precursores bipotentes o comprometidos al linaje neuronal bajo el efecto de bFGF<sup>237</sup>.

La bipotencialidad ha sido analizada *in vitro* de una mejor manera en líneas inmortales generadas del estriado<sup>184</sup>, telencéfalo<sup>63</sup>, cerebelo<sup>24</sup>, mesencéfalo<sup>182</sup>. La mayoría de estas líneas expresan nestina, proteína de filamentos intermedios que se localiza en forma preferente en células proliferantes del neuroepitelio, previo al inicio de la neurogénesis<sup>73</sup>, por lo que se ha utilizado como un marcador de células precursoras neurales. La expresión de esta proteína se pierde en condiciones donde se favorece la diferenciación, adquiriéndose la de marcadores de células gliales o neuronales tanto *in vitro*<sup>72,207</sup> como *in vivo*<sup>223</sup>. Lo anterior permite sugerir que los precursores presentes en el SNC durante el período de neurogénesis, tienen la capacidad de dar origen a los dos principales linajes que lo integran.

Por otro lado, una línea celular generada del cerebelo ha sido transplantada en regiones diferentes a la de su origen, logrando diferenciar hacia los tipos celulares presentes en el sitio del implante<sup>224</sup>. Lo cual sugiere que al igual que en el SNP, la información que los precursores neurales reciben de su medio ambiente local, participa en forma decisiva en la determinación de los fenotipos terminales. Marcajes retrovirales durante el desarrollo de la retina también favorecen esta hipótesis<sup>233</sup>.

Muy recientemente, se ha abierto la posibilidad de reintegrar precursores neurales durante el desarrollo del SNC de mamíferos. Este nuevo procedimiento, utiliza una técnica quirúrgica que hace posible reimplantar células indiferenciadas obtenidas de embriones en los ventrículos cerebrales de roedores en desarrollo. A partir de esta cavidad es posible que se implanten en el neuroepitelio, migren y diferencien. Las células transplantadas se pueden identificar utilizando marcadores neuronales, gliales y especie específicos de rata y ratón<sup>34</sup>. Utilizando ésta técnica se ha mostrado que es posible que algunos precursores del telencéfalo se implanten en otras regiones y diferencien<sup>26</sup>. De esta forma, se apoya nuevamente la relevancia del entorno en la diferenciación neuronal. Esta nueva estrategia ayudará a identificar los diferentes compromisos adquiridos por las células indiferenciadas durante las diferentes etapas del desarrollo por las que atraviezan y, por otro lado, conocer la relevancia de las señales de regionalización en el establecimiento de los fenotipos terminales.

## V) EL FENOTIPO DOPAMINERGICO.

La dopamina es uno de los neurotransmisores que más atención ha despertado en el SN debido, principalmente, a su relación con un gran número de funciones neurológicas (i.e. control del movimiento voluntario, comportamiento emocional y cognositivo) y enfermedades (i.e. esquizofrenia, alcoholismo, Parkinson), además de participar en algunas funciones endócrinas, como el control de la liberación de prolactina. El estudio de las neuronas que sintetizan dopamina (dopaminérgicas) se ha concentrado en la región del mesencéfalo, en la cual se encuentra la más alta densidad de células que producen dopamina. A continuación, se describirán brevemente algunas características generales del sistema dopaminérgico, y posteriormente con más detalle el desarrollo de las neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo, así como los factores que influyen en su maduración funcional y morfológica.

### A) Generalidades del sistema dopaminérgico.

La dopamina es el primer metabolito neuroactivo en la vía biosintética de las catecolaminas. Todas ellas se generan a partir de la tirosina, la cual sufre dos modificaciones para dar origen a la dopamina, la primera catalizada por la tirosina hidroxilasa (TH) y, la segunda por la dopa-descarboxilasa o aminoácido-descarboxilasa (DDC o AADC) (Fig. V.1). La dopamina a su vez puede ser metabolizada a noradrenalina o adrenalina, a través de la actividad de la dopamina- $\beta$ -hidroxilasa (DBH) y de la feniletanolamina-N-metiltransferasa (PNMT), respectivamente. La TH es la enzima limitante en la vía biosintética, siendo blanco de diferentes agentes regulatorios; en forma particular, su actividad se modula positivamente por fosforilación, evento en el que se encuentran involucradas principalmente la proteincinasa-A (PK-A) dependiente de adenosin monofosfato cíclico (AMPc), PK-II dependiente de calmodulina<sup>255</sup> y la MAP-K<sup>97</sup>. Por otro lado, la síntesis del ARNm de la TH se regula en forma positiva por múltiples estímulos externos, entre los que destacan, EGF<sup>145</sup>, bFGF<sup>196</sup>, PDGF-BB<sup>189</sup>, glucocorticoides<sup>146</sup> y estímulos despolarizantes<sup>122</sup>. Los genes de la TH en ratón<sup>111</sup>, rata<sup>180</sup> y humano<sup>127</sup> están clonados, y el análisis de la secuencia nucleotídica de su región promotora ha permitido identificar regiones de homología con elementos responsivos a diferentes factores transcripcionales,

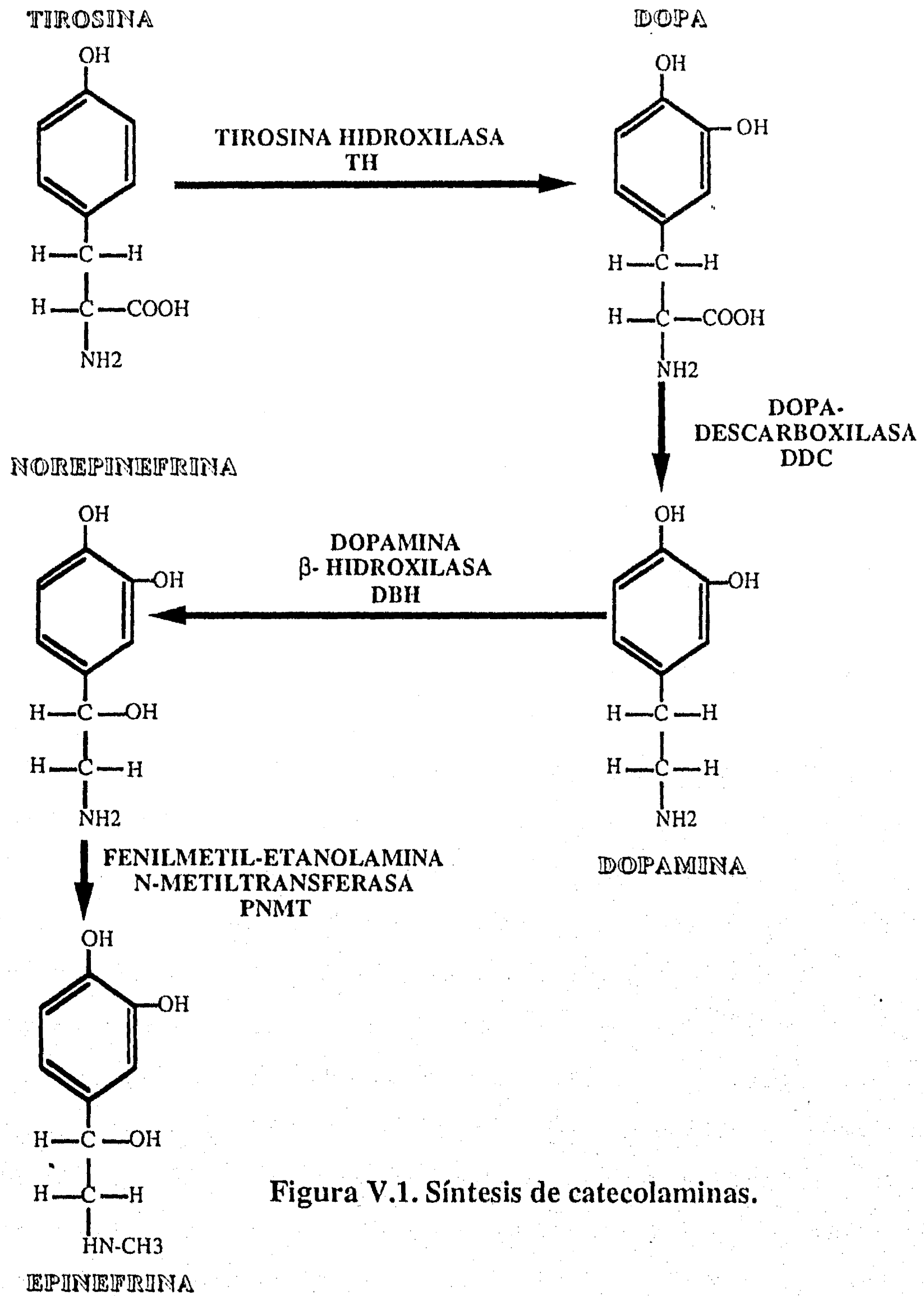


Figura V.1. Síntesis de catecolaminas.

entre los que destacan: AP1, AP2, POU/OCT, SP1 y CRE<sup>33,111</sup>. Para el caso de CRE (elemento responsivo para el AMPc), se ha demostrado que es relevante en el control transcripcional positivo del gen de la TH<sup>132</sup>. Estudios en líneas celulares han identificado una región de aproximadamente 300 pares de bases del extremo 5' del gen que parece determinar la expresión tejido específica<sup>94</sup>; dentro de esta región, se identificó una secuencia con simetría dial (caja "E"), que sobrelapa con un motivo de reconocimiento para el factor transcripcional AP-1, ambas secuencias necesarias para controlar la expresión específica de tejido<sup>252</sup>.

Todas las enzimas involucradas en la síntesis de la dopamina se encuentran localizadas en la terminal nerviosa, en donde se almacena el producto final en las vesículas presinápticas. A partir de estas, el neurotransmisor es liberado al espacio sináptico bajo un estímulo despolarizante, utilizando un mecanismo dependiente de calcio. La remoción de este neurotransmisor del espacio sináptico se lleva a cabo fundamentalmente por un mecanismo de recaptura en la terminal nerviosa, el cual es dependiente de sodio. Una vez dentro de la terminal presináptica puede seguir dos rutas, entrar nuevamente en las vesículas sinápticas, o ser inactivado por la monoamino oxidasa (MAO) mitocondrial. Una vez liberada, la dopamina interactúa con receptores de tipo proteico ubicados en la membrana post-sináptica, cuya actividad regula los niveles intracelulares de AMPc, y otros mecanismos de transducción que incluyen la modulación de corrientes de potasio.

#### **B) Neurogénesis y ontogenia de neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo.**

Experimentos de incorporación con timidina tritiada han permitido identificar el día de nacimiento de las primeras neuronas post-mitóticas del mesencéfalo. En la rata se inicia a partir del rE11 y, termina su establecimiento con un pico de neurogénesis entre rE14 y rE15, mientras que el establecimiento de las células gliales que inicia en rE11 se prolonga hasta etapas post-natales<sup>92</sup>. Por otro lado, la detección más temprana de dopamina, descrita por un método de histofluorescencia, es a los 13 días de desarrollo embrionario tanto en ratón como en rata<sup>12,82</sup>, que correlaciona muy bien con la síntesis previa de la TH, la cual se detecta por inmunohistoquímica a partir de los rE12<sup>71</sup>, y que correlaciona bien con los incrementos observados en la

actividad de la TH<sup>45</sup>. Es interesante comentar que estos estudios reportan un pico de expresión que coincide con el de neurogénesis descrito en el estudio autoradiográfico, de tal forma que, la diferenciación neuronal dopaminérgica concluye entre las edades de 14 y 16 días de desarrollo embrionario de la rata. Teniendo en consideración los datos anteriores, la mayoría de los estudios sobre el fenotipo dopaminérgico, han empleado como uno de los marcadores de diferenciación la expresión de la TH.

Si bien la aparición de marcadores celulares aparece entre rE12 a rE16, parece ser que los elementos que gobiernan el establecimiento del fenotipo dopaminérgico actúan en etapas previas. Cuando se expone la región que va dar origen al mesencéfalo obtenido de rE9, con tejido obtenido de la placa del piso de la médula espinal, se facilita la diferenciación de las neuronas dopaminérgicas, mientras que el proceso inductivo no se genera si se utiliza mesencéfalo de rE12<sup>108</sup>. De esta forma, la responsividad a factores que controlan la determinación dopaminérgica se presenta por lo menos 3 días antes que aparezca el primer marcador de diferenciación detectable. Se ha sugerido que Sonic hedgehog, molécula secretable que se expresa en la placa del piso, pudiera ser la señal inductiva predominante en este proceso<sup>107</sup>.

### **C) Efectos *in vitro* sobre la maduración del fenotipo dopaminérgico.**

El estudio de los factores involucrados en los eventos de diferenciación son difíciles de llevar a cabo *in vivo*, por tal motivo ha sido necesario el desarrollo de cultivos primarios, donde se pueden aplicar distintos factores al medio y determinar cuales afectan el proceso de diferenciación. En un intento por encontrar los factores que participan en la determinación del fenotipo dopaminérgico, se realizaron co-cultivos de células de la región mesencefálica y cultivos primarios del estriado (una de sus regiones blanco). En esos experimentos, se demostró la capacidad del estriado en estimular la maduración funcional de las neuronas dopaminérgicas, evaluando la síntesis y la recaptura de dopamina<sup>54,195</sup> y, la formación de la trama dendrítica<sup>100</sup>. Experimentos posteriores, demostraron la participación de moléculas solubles, al describirse efectos similares solo con medio condicionado proveniente de cultivos primarios del estriado<sup>232</sup>. Los efectos tróficos sobre las neuronas dopaminérgicas no solo se generan de la región blanco; se ha demostrado un incremento en la sobrevivencia de

neuronas dopaminérgicas mediado por astrocitos tipo I del mismo mesencéfalo<sup>187</sup> o por medios de cultivo condicionados por microglia cortical<sup>179</sup>.

Teniendo los resultados anteriores como antecedente, se incrementó el interés por ensayar la capacidad de diferentes factores solubles para influir el desarrollo de las neuronas dopaminérgicas. En la medida que fue factible contar con factores de crecimiento en forma aislada, se hizo posible evaluar su efecto sobre la maduración dopaminérgica en cultivos libres de suero. Se ha descrito el efecto sobre neuronas dopaminérgicas del bFGF<sup>66,159</sup>, EGF<sup>35</sup>, interleucina-6 (IL-6)<sup>91</sup>, BDNF<sup>105,126</sup>, PDGF<sup>81,189</sup>, TGF- $\alpha$ <sup>4</sup>, TGF- $\beta$ <sup>129</sup>, IGF-I<sup>4,14</sup>, NT-3 y neurotrofina-4/5 (NT-4/5)<sup>106</sup>. En general, la mayoría de estos factores de crecimiento centran sus efectos sobre dos características principales de las neuronas dopaminérgicas: la presencia de la TH y/o la capacidad de síntesis o recaptura de dopamina. Estas dos propiedades reflejan en forma general, la capacidad de diferenciar, sobrevivir o proliferar de las células precursoras dentro del linaje dopaminérgico. Hay pocos reportes en los cuales se puede especificar con certeza el mecanismo de acción de estos factores. Para el caso de los efectos de bFGF, EGF y TGF- $\alpha$ , ha sido posible determinar que son mediados, en alguna medida, por estimular positivamente la proliferación celular; por ejemplo, los incrementos generados por EGF y TGF- $\alpha$  en la captura de dopamina, y en el número de neuronas inmunopositivas para TH, se pierden en presencia de agentes que matan a las células que se encuentran proliferando<sup>4,35</sup>. Estos resultados se utilizaron como argumento para sugerir que los efectos de EGF y TGF- $\alpha$ , se encontraban mediados por células gliales que proliferaron en respuesta al factor de crecimiento; sin embargo, no se analizó la posibilidad de que se influyera la proliferación de células precursoras, elemento a considerar dado que para estos dos factores se han descrito efectos sobre precursores neurales en retina<sup>6</sup>. Hasta el momento, bFGF es el único factor para el que se ha sugerido que en etapas tempranas de desarrollo (mE12), sus efectos son una consecuencia de favorecer la proliferación de precursores que diferencian a neuronas que sintetizan la TH<sup>159</sup>.

Para el resto de los factores de crecimiento mencionados anteriormente, se ha demostrado claramente un incremento en el número de neuronas inmunopositivas para la TH, sin embargo, es difícil determinar si se estimuló la diferenciación celular o se favoreció la sobrevivencia. Un caso notable es NT-4/5, el cual incrementa



en un 700 % la población inmunopositiva para la TH, sin tener ningún efecto sobre la captura de dopamina<sup>106</sup>. De este modo, es probable que existan efectores adicionales que regulen en forma concertada otras características funcionales del fenotipo dopaminérgico. Por otro lado, hay datos experimentales en los cuales BDNF<sup>105</sup> y TGF- $\beta$ <sup>129</sup>, protegen del efecto tóxico de MPP+ (agente farmacológico que selectivamente mata neuronas dopaminérgicas), lo cual podría apoyar la hipótesis de que estos factores de crecimiento favorezcan la sobrevivencia de células dopaminérgicas. Recientemente, se ha descrito un factor de crecimiento derivado de una línea glial (GDNF), miembro de la familia de los TGF- $\beta$ , el cual muestra *in vitro* un efecto de sobrevivencia importante sobre las neuronas dopaminérgicas, ya que en su presencia permite que el número de neuronas dopaminérgicas se mantenga hasta por 21 días, mientras que en su ausencia se pierde más del 75%<sup>44</sup>. A diferencia de bFGF, EGF e IGF-I, este factor no estimula la recaptura de GABA, motivo por lo que se reportó como un factor específico para el fenotipo dopaminérgico. Sin embargo, es posible detectar el ARNm de este factor en varias regiones durante el desarrollo embrionario (i.e. telencéfalo, diencéfalo, cerebelo, estriado, médula espinal, riñón, intestino y en el primordio de las extremidades)<sup>41</sup>, de tal forma que puede estar involucrado en el desarrollo de otros fenotipos. La hipótesis anterior se ha reforzado al describirse, efectos del GDNF en la sobrevivencia de las neuronas motoras<sup>147</sup> y, en las neuronas sensoriales y simpáticas<sup>29</sup>.

## VI) EL FENOTIPO GABAERGICO.

Otro de los neurotransmisores presente en el mesencéfalo es el ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA). Este es el neurotransmisor inhibitorio más abundante en el sistema nervioso, el cual controla la excitabilidad neuronal, a través de interneuronas o de circuitos neuronales inhibitorios. El GABA es un aminoácido modificado, que se sintetiza a partir del ácido glutámico por medio de la descarboxilasa del ácido glutámico (GAD), enzima limitante en la vía biosintética de GABA. El metabolismo del GABA se encuentra íntimamente relacionado con el de la glucosa, siendo el  $\alpha$ -cetoglutarato un elemento de suma importancia como precursor del ácido glutámico (Fig. VI.1). Lo anterior permite establecer la existencia de dos compartimientos: el metabólico y el de neurotransmisor. En la siguiente descripción solo se considerará su función como neurotransmisor.

### A) Generalidades del sistema GABAérgico.

Actualmente se conocen al menos dos isoenzimas de la GAD, las cuales son sintetizadas por dos genes diferentes<sup>60</sup>; estas son la GAD<sub>65</sub> y GAD<sub>67</sub>, donde el subíndice corresponde al peso molecular de la proteína madura. Ambas isoenzimas presentan diferentes características bioquímicas, de ubicación intracelular y abundancia regional, lo que pudiera ser relevante para su función. La GAD<sub>65</sub> se encuentra en un alto porcentaje como enzima inactiva (apoGAD), localizada fundamentalmente en la terminal nerviosa, y requiere para su activación de la unión al fosfato de piridoxal<sup>118</sup>; este último evento pudiera ser facilitado por el impulso nervioso<sup>61</sup>. La GAD<sub>67</sub> se ubica en forma homogénea en el citoplasma de las neuronas, y se presenta preferentemente como una holoenzima activa, unida al fosfato de piridoxal; esta enzima también puede estar en forma de apoenzima pero en mucho menor grado, dada su alta afinidad por el cofactor<sup>118,156</sup>. Ambas isoenzimas se expresan en las mismas regiones del SNC, pero con diferentes niveles de expresión. La GAD<sub>65</sub> es especialmente abundante en el tubérculo olfatorio, núcleo geniculado lateral, colículo superior y núcleo olivar pretectal, mientras que la GAD<sub>67</sub> lo es en corteza cerebral, septum, colículo inferior y cerebelo. Sus diferencias en distribución y requerimientos en su activación, pueden favorecer una mayor flexibilidad para el control de la síntesis de GABA. Durante el desarrollo el ARNm de la GAD<sub>67</sub> puede sufrir un procesamiento alternativo, que

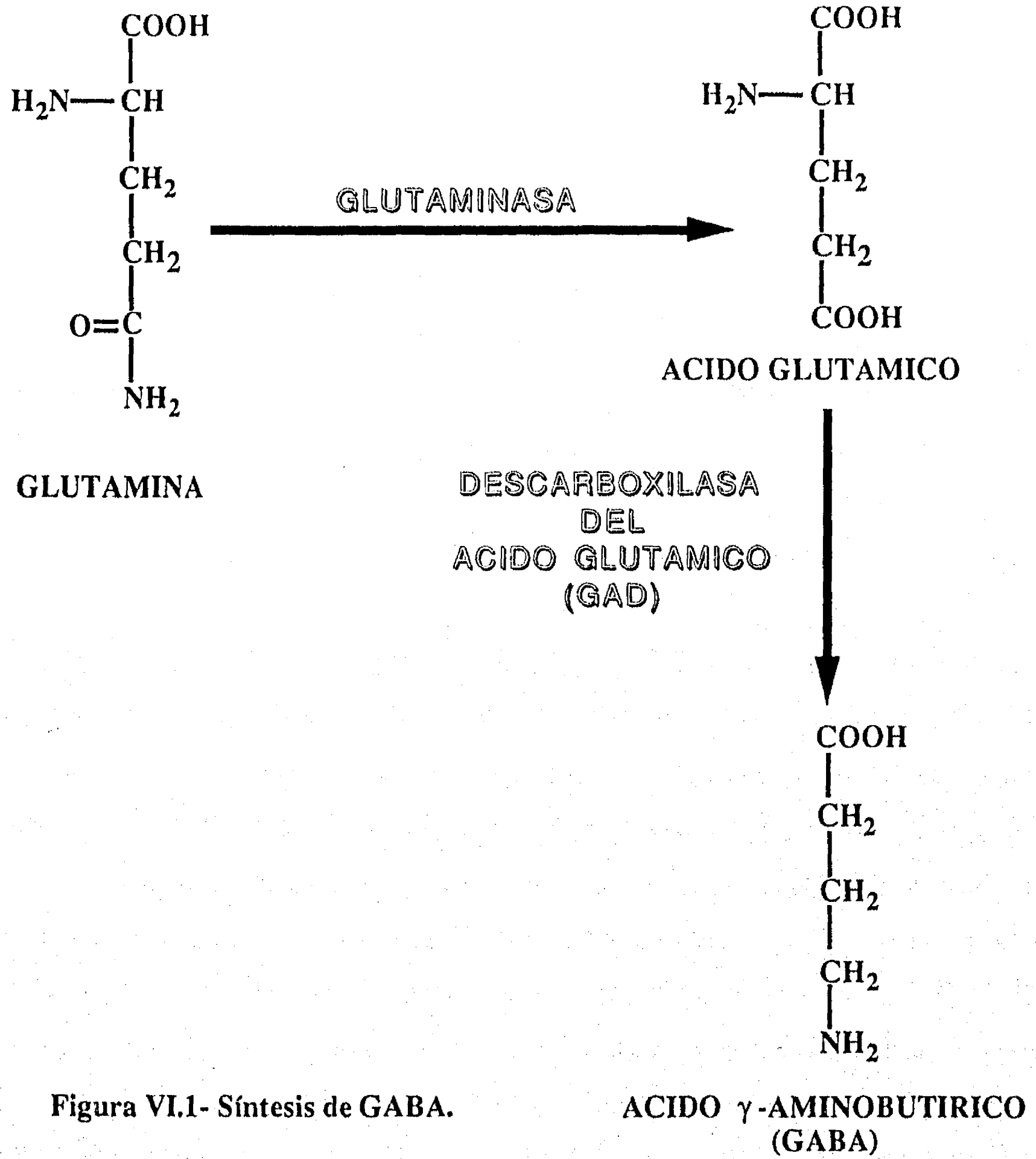


Figura VI.1- Síntesis de GABA.

incluye un exon adicional de 86 pares de bases, en el que se encuentra un codón de terminación; este transcrito esta ausente en tejido adulto, y quizá codifique para una proteína no activa truncada en su extremo carboxilo<sup>21</sup>.

Pocos estudios han evaluado los mecanismos que controlan la expresión de los genes de las GADs. Uno de ellos, generando lesiones en la vía nigro estriatal, encuentra un incremento en los niveles de expresión del ARNm de la GAD<sub>67</sub> y en su actividad en el estriado<sup>214</sup>, de tal forma que se sugiere que el impulso nervioso puede participar en su regulación. En el hipocampo se ha reportado que estradiol incrementa los niveles de expresión del ARNm de la GAD<sub>67</sub><sup>239</sup>. El análisis de la secuencia de aminoácidos de la GAD<sub>65</sub> y GAD<sub>67</sub>, no identificó motivos consenso para la fosforilación por proteincinasas<sup>60,117</sup>, lo cual descartaría la posible modulación de su actividad por fosforilación directa de la enzima. Tanto las GADs, como el GABA se han detectado fuera del sistema nervioso, donde podrían modular múltiples efectores endócrinos o exócrinos<sup>58</sup>.

Durante la ontogenia, la GAD<sub>67</sub> es la primera en aparecer, detectándose la proteína en etapas tan tempranas como rE11 en la médula espinal; sin embargo, en las células inmunopositivas para GAD<sub>67</sub> no fue posible detectar GABA<sup>153</sup>. La forma embrionaria del ARNm de la GAD<sub>67</sub> se ha detectado preferentemente en las zonas de alta proliferación y, aunque se detecta en neuronas post-mitóticas, es sustituido poco después por la expresión de la forma madura<sup>15</sup>. En el caso de la GAD<sub>65</sub>, su detección es más tardía y, en el estriado, parece corresponder al momento de entablar contacto sináptico con la *substantia nigra*<sup>86</sup>, por lo que se postula que el establecimiento de su expresión se regula por el estímulo neural.

#### B) Efectos *in vitro* sobre la maduración GABAérgica.

En los últimos años, se ha identificado un número importante de factores de crecimiento que intervienen en la maduración funcional de las neuronas GABAérgicas. En forma particular se han documentado efectos de EGF<sup>36</sup>, bFGF<sup>14,66</sup>, IGF-I<sup>14</sup>, BDNF<sup>14,106</sup>, NT-3<sup>106</sup> y de NT-4/5<sup>106</sup> sobre neuronas GABAérgicas del mesencéfalo. En la mayoría de los casos, como un reflejo de la maduración funcional, se reportó incrementos en la capacidad de síntesis y captura de GABA. bFGF y EGF incrementan la captura de GABA hasta en 4 veces

con relación a la condición basal, mientras que, BDNF y NT-3 duplican o triplican, respectivamente, el contenido de GABA, lo cual correlaciona con un incremento en la misma proporción en la actividad enzimática de GAD<sup>106</sup>. En forma interesante, solo NT-3 incrementa el número de células inmunopositivas para GAD<sub>67</sub><sup>106</sup>. Efectos similares se han descrito en el estriado, donde se ha evaluado el efecto de BDNF<sup>236</sup>, NT-3<sup>236</sup> y NT-4/5<sup>240</sup>; en estos estudios se han descrito incrementos en la cantidad de células inmunopositivas para GAD, en la concentración intracelular de GABA, en la incorporación de GABA y en la actividad de GAD. En el caso particular de NT-4/5 se ha demostrado que en su mecanismo de acción no participa la proliferación<sup>240</sup>, de tal forma que, el incremento en el número de neuronas GABAérgicas, podría deberse a sobrevivencia o diferenciación. Todos estos estudios se han realizado en cultivos primarios, por lo que se desconoce si el efecto es directo, o mediado por interacciones generadas en el cultivo bajo la presencia de los factores empleados.

## VII) JUSTIFICACION Y OBJETIVO.

Durante el desarrollo embrionario, la adquisición de un fenotipo particular se genera como consecuencia de una serie de eventos que se regulan en forma coordinada a través del tiempo y el espacio. En este proceso, las células precursoras deben responder en forma adecuada a un conjunto de estímulos que reciben de su entorno para llegar, finalmente, al estado de diferenciación terminal. Algunas de estas respuestas (i.e. proliferación, diferenciación y sobrevivencia celular) pueden ser moduladas por factores de crecimiento. En la ontogenia del sistema nervioso del mamífero se han detectado diferentes factores de crecimiento, así como sus receptores. En forma particular, para algunos de ellos se ha documentado que facilitan la proliferación de precursores neurales, o favorecen la diferenciación y/o sobrevivencia de fenotipos específicos (e.g. dopaminérgico o GABAérgico)(véase cap. III, V y VI).

La línea central de investigación en el laboratorio donde se realizó el presente trabajo tiene como principal objetivo, estudiar los mecanismos que regulan las diferentes respuestas celulares durante el desarrollo embrionario. El abordaje de este problema se dificulta por la carencia de poblaciones enriquecidas en células indiferenciadas que faciliten su análisis. En este contexto, una de las alternativas que facilitaría su estudio es la generación de líneas celulares de precursores. Trabajos recientes permiten proponer que las células precursoras del SN podrían ser propagadas con el uso de factores de crecimiento. De hacer realidad esta propuesta, permitiría contar en el SN con un excelente modelo de estudio, superando a las líneas neuronales existentes (inmortalizadas o transformadas), en las cuales no se puede descartar la posible desregulación de algún elemento importante en las funciones celulares.

En vista de que existen factores de crecimiento que favorecen la proliferación de precursores neurales (EGF, bFGF) presentes en el mesencéfalo, y que en experimentos *in vitro*, pudieran participar en la maduración funcional de fenotipos terminales presentes en esta región, se propone como hipótesis de trabajo que alguno de estos factores de crecimiento estimulan la proliferación, sobrevivencia y/o diferenciación de precursores neurales del mesencéfalo.

El objetivo general de este trabajo fue determinar si existen precursores neurales en el mesencéfalo del ratón que respondan a factores de crecimiento. En forma particular, investigar si es posible regular su capacidad proliferativa *in vitro*. De existir respuesta positiva, establecer si el efecto es directo sobre las células precursoras, o mediado por interacciones presentes en el cultivo primario. Por otro lado determinar, si bajo el efecto de factores de crecimiento, es posible modular la diferenciación o sobrevivencia de precursores que puedan dar origen a fenotipos específicos.

Para llevar a cabo este trabajo, se estudió el efecto de diferentes factores de crecimiento sobre cultivos primarios del mesencéfalo embrionario del ratón a los 13.5 d. *pc.*, etapa en la cual aún es posible encontrar precursores neurales. Como un reflejo del incremento de la proliferación celular, se evaluó el número de colonias generadas en cultivos primarios. Así mismo, se investigó si los factores de crecimiento influyen en el fenotipo dopaminérgico y GABAérgico, evaluando los niveles de expresión del ARNm de la TH o GADs, por medio de un procedimiento de RT-PCR.

## VIII MATERIALES Y METODOS.

### A) Cultivo de células.

El procedimiento fue realizado como se describe por Lauder et al<sup>135</sup>. Brevemente, ratonas CD-1 embarazadas fueron sacrificadas por dislocación cervical, los embriones (13.5 días *post coitum*; d.pc) fueron removidos y colocados en solución fría de PBS-glucosa (cloruro de potasio 5.4 mM, cloruro de sodio 138 mM, glucosa 22 mM, fosfatos-potasio-sodio 2 mM, pH 7.2); el sistema nervioso central de los embriones fue disectado en la misma solución. Las regiones a ser cultivadas fueron expuestas a tripsina 0.25 % durante 15 min., inactivada al adicionar medio fresco con 10 % de suero fetal bovino (1:1 v/v), y mecánicamente disociadas con una pipeta de 5 ml y una pipeta Pasteur a la cual previamente se le redondeó su borde. Las células fueron recolectadas por centrifugación a 800 g durante 5 min y resuspendidas en medio libre de suero el cual se encuentra compuesto de: Medio de Eagle Modificado por Dulbecco con alta glucosa (D-MEM) y Ham F12 (1:1 v/v) suplementado con : glutamina (2.92 mg/ml); penicilina-estreptomocina (0.5 U/ml y 0.5 µg/ml, respectivamente); insulina (25 µg/ml); transferrina (100 µg/ml); putresina (60 µM); progesterona (20 nM); selenita de sodio (30 nM). Las células fueron contadas en un hemocitómetro y ajustadas a una densidad de  $1 \times 10^6$  células/ml; la viabilidad celular fue valorada por exclusión de azul de tripano. Alícuotas de esta suspensión (250,000 células) fueron cultivadas en pozos de 16 mm de diámetro previamente impregnados con Poli-D-lisina (10 µg/ml por 2 hrs) en 0.5 ml de medio definido. Los cultivos fueron mantenidos a 37 °C en una atmósfera de 5 % CO<sub>2</sub> - 95 % aire atmosférico. Los factores de crecimiento fueron agregados 1 hr después del sembrado. Todos los factores fueron comprados de GIBCO-BRL (Grand Island, N.Y.).

### B) Purificación de ARN, síntesis de ADNc y procedimiento de reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR).

El ARNm total fue purificado de cultivos utilizando una versión modificada del método publicado por Chomczynski and Sacchi<sup>42</sup>. Brevemente, los cultivos fueron lavados con PBS-glucosa, las células lisadas directamente en las cajas de cultivo al adicionar 0.5 ml de una solución 6 M Urea/ 3 M LiCl, incubadas por una noche a -20 °C, centrifugadas a 10,000 g durante 10 min y la pastilla resuspendida en 500 µl de una solución de isotiocianato de guanidino (solución GuSCN: 4 M tiocianato de guanidino, 25 mM de citrato de sodio pH7.0, Sarcosyl 0.5%, 2-mercaptoetanol 0.1 M, 2 M de acetato de sodio (pH 4), fenol y cloroformo fueron agregados en las siguientes proporciones 1/10, 1/1, 1/20 respectivamente; el cloroformo es una mezcla de 24:1 de cloroformo y alcohol isoamílico. La suspensión fue mezclada 1 min, mantenida en hielo durante 15 min y centrifugada a 10,000 g por 20 Min. La fase acuosa fue colectada y precipitada con un volumen igual de isopropanol a -20 °C. La pastilla fue resuspendida en 150 µl de GusCN y reprecipitada. El ARN fue lavado con 75 % de etanol y resuspendido en 20 µl de agua. 10 µl fueron utilizados para la síntesis de ADNc utilizando M-MLV reverse Transcriptasa (BRL) en 30 µl de volumen final de reacción bajo las condiciones recomendadas por el proveedor. Rutinariamente 6 µl de la reacción de ADNc fueron utilizadas en la reacción de PCR conteniendo 2.5 U de Taq DNA polimerasa (Boehringer-Mannheim), 200 µM de deoxinucleótidos 5'-trifosfatos, 1.86 mM de MgCl<sub>2</sub>, en el amortiguador proporcionado y 30 picomolas de cada uno de los iniciadores; todas las reacciones fueron realizadas en un termoblock programable (Hybaid). Los protocolos de PCR fueron: para Hipoxantin Fosforibosil Transferasa (HPRT; una enzima constitutiva) y Tirosin Hidroxilasa (TH): 93 °C 1 min, 57 °C 1 min, 72 °C 1 min, 35 ciclos; para nestina: 95 °C 1 min, 57 °C, 72 °C 1 min, 35 ciclos; para neurofilamento M (NF-M) y Proteína Ácida Fibrilar Glial (GFAP): 95 °C 1 min, 67 °C 1 min, 72 °C 1 min, 35 ciclos; en todos los casos, PCR fue finalizado con 10 min a 72 °C. Los oligonucleótidos iniciadores fueron: HPRT: sentido CCTGCTGGATTACATTAAAGCACTG, antisentido GTCAAGGG-CATATCCAACAACAAAC; nestina: sentido CTACCAGGAGCGCGTGGC, antisentido TCCACAGCCA-G(intron)CTGGAAGTT; NF-M: sentido GCCGAGCAGAACAAGGAGGCCATT, antisentido CTGGATGGTGTC(intron)CTGGTAGCTGCT; GFAP: sentido TTGCAGACC-TCACAGACGCTGCGT, antisentido CGGTTTTCTTCGCCCTCCAGCAAT; TH: sentido TACGCCACGCTGAAGGGCCTCTAT, antisentido AGGTGAGGAGGCATGACGGA-TGTA. Cada uno de los productos de PCR fueron del tamaño esperado y su identidad fue confirmada por digestión con varias endonucleasas de restricción.



**C) Inmunocitoquímica.**

Las células se fijaron en metanol a  $-20^{\circ}\text{C}$  por 30 min y lavadas dos veces en PBS-glucosa. Las células se incubaron 1 hr con un anticuerpo de conejo para neurofilamento de rata 150 kD (CHEMICON), o con un anticuerpo de conejo contra GFAP de conejo (DAKO) diluidos 1:400 o 1:250 en 0.1 M TBS (0.1 M tris, 24.9 mM de cloruro de sodio, pH 7.6), 5 % de leche descremada y 1 % de triton (TBS/M-T). Los siguientes lavados e incubaciones fueron realizados: 3 lavados (10 min cada uno) con TBS/M-T, 30 min de incubación con el anticuerpo anticonejo biotinilado diluido 1:300 del kit Vectastain elite ABC (vector laboratories), 3 lavados (10 min cada uno) con TBS/M-T, 30 min incubación con el complejo avidina-biotina, 3 lavados (10 min cada uno) con TBS y, finalmente, revelado con tetrahidrocloruro 3,3'-diaminobenzidina (0.5 mg/ml) durante 8 min. Las células positivas fueron analizadas con microscopía en campo claro.

**D) Análisis estadístico.**

Comparaciones estadísticas fueron realizadas utilizando la prueba t de Students llevadas a cabo con el programa Microsoft Excel versión 4.0 (Soft-Art, Inc.). Valores de P 0.05 fueron considerados no significativos.

## IX) RESULTADOS.

### A) Interacciones de factores de crecimiento en la generación de colonias de precursores neurales.

**EGF, bFGF y TGF- $\alpha$  inducen la formación de colonias a partir de cultivos primarios de mesencéfalo.**

La capacidad de modular la proliferación de células precursoras por factores de crecimiento se encuentra bien documentada; por otro lado, se ha descrito la presencia de diferentes factores de crecimiento, o de sus receptores, en el mesencéfalo, entre los que destacan EGF<sup>1,216</sup>, bFGF<sup>200</sup> y TGF- $\beta$ <sup>70</sup>. Teniendo en consideración lo anterior, se evaluó si estos factores tenían la capacidad de estimular la proliferación de precursores neurales en esta región a los mE13.5. Durante el tratamiento de cultivos primarios con EGF, bFGF y el factor de crecimiento transformante- $\alpha$  (TGF- $\alpha$ ) pero no en aquellos que se cultivaron en presencia de TGF- $\beta$  o NGF, se observó inicialmente un aumento importante en la proliferación celular, que a los 8 días de cultivo, condujo a la formación de colonias (Fig. 1, Artículo 1). Estas colonias, aparentemente de origen clonal, sobresalen de la monocapa y tienen, al llegar a la madurez (que depende del efecto proliferativo del factor), morfología esférica con una débil adherencia al plato. El número de colonias formadas se encuentra estrechamente relacionada con la dosis del factor de crecimiento empleada (Fig. 2, Artículo 1).

**EGF, bFGF y TGF- $\alpha$  actúan sobre una célula blanco común.**

Dado que dos de los factores de crecimiento que generan colonias utilizan diferente receptor, fue necesario investigar la posible existencia de poblaciones independientes responsivas a los factores de crecimiento empleados. Para tal fin, se efectuaron cultivos primarios bajo la presencia de los factores de crecimiento solos o en combinación, empleando la concentración de factor de crecimiento que permite la máxima respuesta en la generación de colonias. En este experimento se demostró que hay un número similar de

colonias generadas con los factores empleados o en las asociaciones con TGF- $\alpha$ , no obstante, existe un incremento significativo, pero no aditivo, en la generación de colonias cuando se utiliza EGF + bFGF (Fig. 3, Artículo 1). Estos datos, sugieren que existe principalmente una población celular, capaz de generar colonias, que responde indistintamente a EGF, TGF- $\alpha$  o bFGF.

**La capacidad para generar colonias de bFGF requiere de la presencia de insulina.**

Por otro lado, la insulina (una hormona empleada regularmente como un componente en los medios definidos), se ha implicado también como un agente que favorece la proliferación celular, por lo que se investigó su participación en la generación de colonias. Se realizaron cultivos en ausencia de insulina, bajo el efecto de EGF, bFGF, TGF- $\alpha$  o combinaciones entre ellos. En estas condiciones se encontró que bFGF necesita la presencia de insulina para la generación de colonias, mientras que EGF o TGF- $\alpha$  no requieren de esta hormona (Fig. 3, Artículo 1).

**En el mesencéfalo embrionario del ratón existen dos poblaciones celulares responsivas a factores de crecimiento.**

Para caracterizar mejor a la población celular responsiva a los factores de crecimiento, y evaluar la posible existencia de una población que respondiera a la combinación de EGF + bFGF, se llevaron a cabo por separado, cultivos primarios de la región ventral y dorsal del mesencéfalo, bajo la presencia de EGF, bFGF o ambos. Con este experimento, fue posible demostrar la existencia de una población celular, presente en la región dorsal del mesencéfalo, la cual responde solo en la presencia de ambos factores de crecimiento (Fig. 4, Artículo 1). Por otro lado, cuando se cultivó el mesencéfalo ventral en presencia de ambos factores no hubo ningún aumento significativo en el número de colonias generado. De esta forma, el incremento que se observó en cultivos del mesencéfalo completo en la presencia de EGF + bFGF, se debió probablemente a la aparición de la población responsiva de la región dorsal.

**bFGF participa en forma indirecta en la formación de la colonia.**

Los cultivos primarios están constituidos por una diversidad celular, por lo que era posible que el efecto de los factores de crecimiento fuera mediado por alguno de sus componentes. Por tal motivo, se evaluó si el efecto de los factores de crecimiento era directo sobre las células capaces de generar colonias. Para cumplir con este objetivo, se tomaron colonias individuales generadas con cada una de las condiciones analizadas (EGF, bFGF y EGF + bFGF), se disgregaron y subcultivaron cada una de estas colonias en las tres condiciones; 11 días después se evaluó la presencia de colonias. Bajo estas condiciones, EGF es capaz de regenerar colonias al igual que EGF + bFGF, sin embargo, los subcultivos en presencia de bFGF no producen colonias, independientemente del origen de la colonia. Este experimento, demostró que la capacidad de generar colonias de EGF es un efecto directo, mientras que para bFGF pudiera ser mediada a través de otra población celular, ya que no fue posible regenerar colonias con este factor, a pesar de haberse subcultivado en la presencia de insulina (Tabla I, Artículo 1).

**bFGF se requiere solo al inicio de cultivos de la región dorsal para que EGF genere colonias.**

En vista de que se contaba con una población que respondía a la presencia de EGF + bFGF, y que el mecanismo por el que se generan las colonias con bFGF en la región ventral, mostraba cierta complejidad, fue interesante analizar como se estaba dando la interacción entre EGF y bFGF en la región dorsal. Para tal fin, se evaluó si era necesaria la permanencia continua de ambos factores para la generación de la colonia. Cultivos de la región dorsal se expusieron a EGF, bFGF o ningún factor durante tres días, después de este período se lavó el pozo de cultivo, y se siguió en presencia del otro factor; a los 8 días se contaron las colonias generadas. Como control otros pozos fueron expuestos en forma continua a EGF, bFGF o EGF + bFGF (Fig. IX.1). Como puede observarse, cuando bFGF se colocó al inicio del tratamiento, seguido de la exposición de solo EGF, se generó una cantidad similar de colonias a las obtenidas con la asociación. Si se realiza un protocolo en el que se invierte el orden de exposición a los factores no se generan colonias. Estos datos demostraron, que no

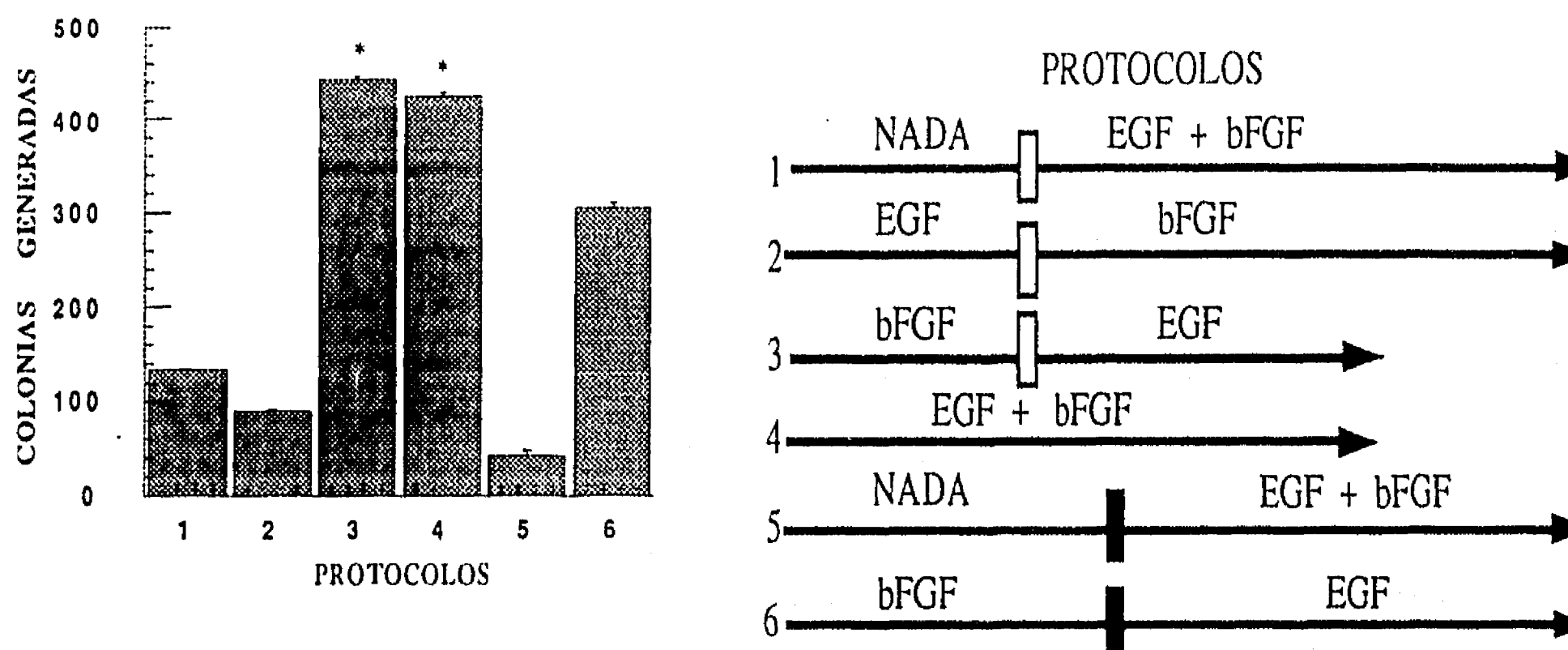


Figura IX.1. Cultivos primarios de la región dorsal del mesencéfalo se sometieron al efecto de EGF y bFGF en forma secuencial (100 ng/ml), bajo los protocolos indicados. Rectángulo vacío, lavado y cambio de condición a los 3 días. Rectángulo relleno lavado y cambio de condición a los 6 días. Se grafica la media  $\pm$  SEM (3 exp. N=12) del número de colonias generado a los 9 (\*) y 14 días de cultivo.

es necesaria la presencia de ambos factores para la generación de colonias, y que se requiere de una exposición previa de bFGF para que EGF genere la colonia. Por otro lado, cuando se extendió el período inicial en ausencia de factor, de 3 a 6 días, y posteriormente se agregan los dos factores se observó una caída dramática en la capacidad generadora de colonia del cultivo, evento que se evitó en la presencia continua de bFGF. Este resultado sugiere que pudiera existir un efecto sobre la sobrevivencia de la población responsiva a EGF, modulado por bFGF, aunque no descarta la posibilidad de que el efecto de bFGF sea inducir la diferenciación hacia una población responsiva a EGF.

#### **bFGF favorece la sobrevivencia de células responsivas a EGF de la región ventral.**

En vista que el resultado anterior no representa una tácita demostración de un efecto en sobrevivencia, y dado lo complicado de llevar a cabo estudios en una población heterogénea, como lo es el cultivo primario, se decidió evaluar si bFGF pudiera presentar efectos similares en subcultivos de colonias generadas de la región

ventral. Previamente, se demostró que bFGF es incapaz de continuar la proliferación de células que integran a las colonias generadas en su presencia; sin embargo, células que forman parte de la colonia proliferan en respuesta a EGF (Tabla 1, Artículo 1). Para demostrar, que bFGF modula la sobrevivencia de células que responden a EGF, se realizó un subcultivo de colonias generadas con bFGF en presencia de EGF, bFGF o ningún factor por 13 días, en estas condiciones solo los cultivos en presencia de EGF generaron colonias (Fig. IX.2A). Cuando colonias generadas con bFGF se subcultivan por 13 días en bFGF, y luego se mantienen en la presencia de ambos factores de crecimiento por 6 días más, es posible regenerar colonias con una morfología muy similar a las obtenidas en subcultivos con EGF. Si se da el tratamiento sobre pozos en los cuales no se agregó ningún factor durante los primeros 13 días, no hay formación de colonias (Fig. IX.2B). Estos datos sugieren, la existencia de un efecto directo de bFGF que favorece la sobrevivencia de células que responden a EGF. De acuerdo con esta hipótesis, cuando se transfirieron colonias íntegras generadas con EGF, bFGF o EGF + bFGF a un nuevo pozo en la presencia de EGF o EGF + bFGF, se observó una migración de células desde la colonia, y 14 días después la formación de nuevas colonias. Bajo esta condición experimental, EGF + bFGF originó un incremento de 3 veces en el número de colonias con respecto a solo EGF (Tabla II, Artículo 1). Así entonces los datos indican que EGF favorece la proliferación, mientras que bFGF incrementa la sobrevivencia celular.

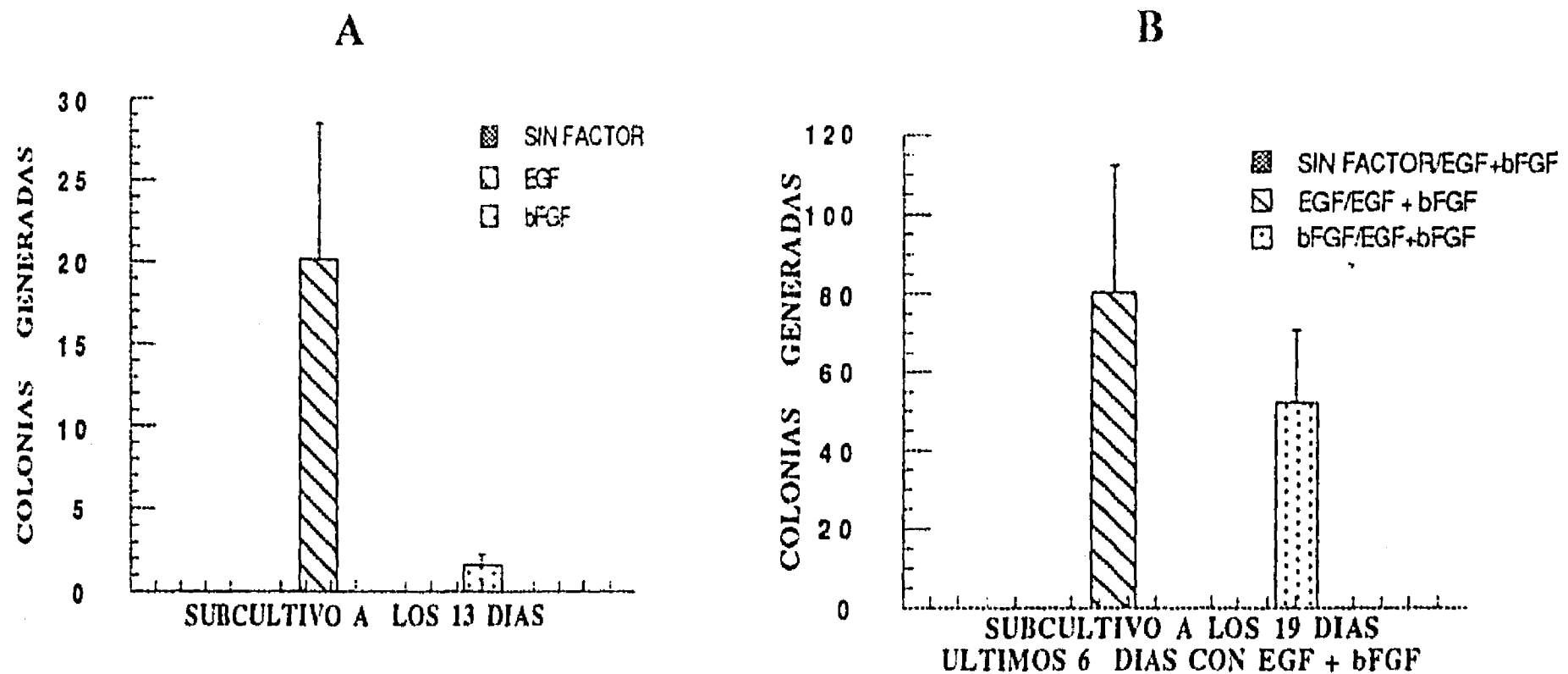


Figura IX.2. Colonias individuales de la región ventral, generadas con EGF se disgregaron enzimáticamente y se subcultivaron en la presencia de EGF, bFGF (100 ng/ml) o sin factor. Se muestra la media  $\pm$  SEM del número de colonias generadas en pozos individuales (N=6).

**Las colonias contienen células que expresan marcadores neurales.**

Tanto en experimentos de transferencia como en subcultivos fue posible observar células con morfología neuronal o glial; de esta forma se postuló que las células que responden a los factores de crecimiento fueron precursores neurales. Para comprobar esta hipótesis, se diseñaron pares de oligonucleótidos para detectar, por medio de una reacción en cadena de la polimerización de ácidos nucleicos (RT-PCR; Reverse Transcriptase-Polimerase Chain Reaction), el ARNm de Nestina (proteína de filamentos intermedios que se encuentra preferentemente en precursores neurales), Neurofilamento-M (proteína presente en neuronas) y la Proteína Ácida Fibrilar Glial (GFAP, marcador de astrocitos). El análisis se realizó tanto en grupos de colonias (todo el pozo de un subcultivo, aproximadamente 20 colonias) (Fig. 7A, Artículo 1), como en colonias secundarias individuales (Fig. 7B, Artículo 1). En ambos casos fue posible detectar el ARNm de nestina en la mayoría de las condiciones, al igual que el ARNm de NF-M en los grupos de colonias, lo que no sucedió

cuando se analizaron colonias individuales. Lo anterior pudo deberse a que la mayoría de las células diferenciadas se encuentren adheridas al plato y cuando se analizan colonias individuales solo se tomó la colonia. Por otro lado, fue infrecuente la detección de GFAP. De acuerdo con estos datos fue posible detectar por inmunocitoquímica NF-M (Fig. 8, Artículo 1), no detectando células inmunopositivas para GFAP. Este último procedimiento, hizo posible notar algunas diferencias morfológicas entre las neuronas generadas de colonias obtenidas con EGF y las de bFGF. Las colonias de bFGF generaron en subcultivos neuronas que muestran un mejor desarrollo dendrítico, evento que se apreció de una mejor manera cuando colonias generadas con bFGF se subcultivaron en la asociación (Fig. 8H, Artículo 1). En conjunto, estos datos sugieren que la colonia contiene precursores neurales capaces de diferenciar a neuronas, y que bFGF participa en la maduración morfológica.



**B) Efecto de factores de crecimiento sobre el establecimiento de fenotipos específicos.**

**EGF, bFGF, NGF y TGF- $\beta$  no afectan la expresión del ARNm de la TH en cultivos primarios de células mesencefálicas.**

Para evaluar si los factores de crecimiento modulan la adquisición de fenotipos particulares en el SNC, se estudio su efecto sobre cultivos primarios del mesencéfalo embrionario de ratón de 13.5 *dpc*. Esta región se encuentra enriquecida en neuronas dopaminérgicas, siendo este uno de los fenotipos más estudiados. En vista de que el establecimiento de la población dopaminérgica en el mesencéfalo se genera durante el período que comprende 13.5 a 15.5 *dpc*, es posible que al inicio de este lapso, aún se encuentren precursores neurales susceptibles de ser influidos bajo condiciones experimentales.

Los factores de crecimiento utilizados fueron: bFGF, EGF, TGF- $\beta$  y NGF. Los factores de crecimiento ensayados están dentro de los mejor caracterizados por sus efectos proliferativos o diferenciativos. Cada uno de los factores fueron colocados en medio libre de suero, solos o en combinación entre ellos desde el primer día de cultivo. Para investigar su efecto sobre el linaje dopaminérgico se evaluó por RT-PCR los niveles de expresión del ARNm de la TH (enzima limitante en la vía biosintética de las catecolaminas), lo cual reflejaría las variaciones en el nivel de expresión del gen de la TH o en el número de células que diferenciaron al fenotipo catecolaminérgico. Para determinar variaciones importantes de la cantidad del ARNm de la TH, se recolectaron muestras de la misma reacción de amplificación después de 20, 25 y 30 ciclos. La cantidad de ARNm utilizado en cada RT-PCR se evaluó detectando el ARNm de la Hipoxantina Fosforribosil Transferasa (HPRT), enzima que se encuentra presente en todos los tipos celulares<sup>165</sup>. Como puede observarse en la Fig. IX.3, si bien pueden detectarse ligeras variaciones, estas no son lo suficientemente importantes para considerarlas un efecto específico del factor sobre la población TH-érgica. De estos experimentos se puede concluir que los factores ensayados no tienen un efecto significativo en los niveles de expresión de TH y que, probablemente, tampoco tengan un papel en inducir la diferenciación de precursores hacia el fenotipo catecolaminérgico.

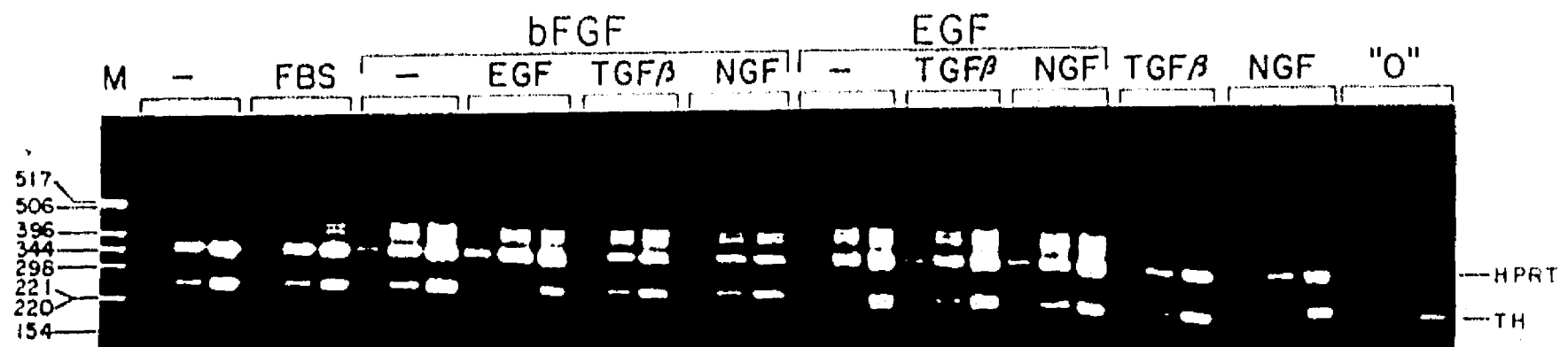


Figura IX.3. Efecto de EGF, bFGF, NGF y TGF- $\beta$  en la expresión del ARNm de la TH en cultivos primarios del mesencéfalo embrionario a los 8 días. Los experimentos fueron llevados a cabo en medio libre de suero y tratados como se indica. Las dosis usadas fueron: suero fetal bovino (FBS) 10 %, EGF 100 ng/ml, bFGF 100 ng/ml, TGF- $\beta$  0.5 ng/ml, NGF 100 ng/ml. Para cada una de las condiciones se realizó una reacción de RT-PCR para HPRT y TH, una fracción de la reacción fue recolectada a los 20, 25 y 30 ciclos. Las células fueron colectadas al octavo día de cultivo. Resultados similares fueron obtenidos con muestras a los 2 y 4 días de cultivo. (M) marcador de peso molecular pBR322 digerido con HinfI.

Los precursores neurales expandidos con factores de crecimiento tienen la capacidad de generar células que expresan las enzimas necesarias para sintetizar dopamina y GABA.

En vista que las colonias generadas con factores de crecimiento expresaron marcadores neuronales, se investigó si eran capaces de dar origen a células que expresaran el ARNm de la TH. Para este fin, una colonia obtenida con EGF se transfirió en presencia del mismo factor. Después de 15 días esta colonia generó 4 colonias secundarias de morfología similar. La colonia "madre" y sus 4 "hijas" fueron analizadas por RT-PCR. Como puede observarse, la colonia primaria no expresó el ARNm de la TH, sin embargo, 2 de las colonias secundarias mostraron niveles significativos de este ARNm (Fig. 2, Artículo 2). Estos resultados demostraron que EGF induce la proliferación de precursores neurales que tienen la capacidad de dar origen a células que expresan la TH. Cuando se realizó un análisis en grupos de colonias secundarias (Fig. 3A, Artículo 2) o colonias individuales (Fig. 3B, Artículo 2), fue posible observar que se pueden obtener colonias que tienen la capacidad de expresar la TH de manera aleatoria.

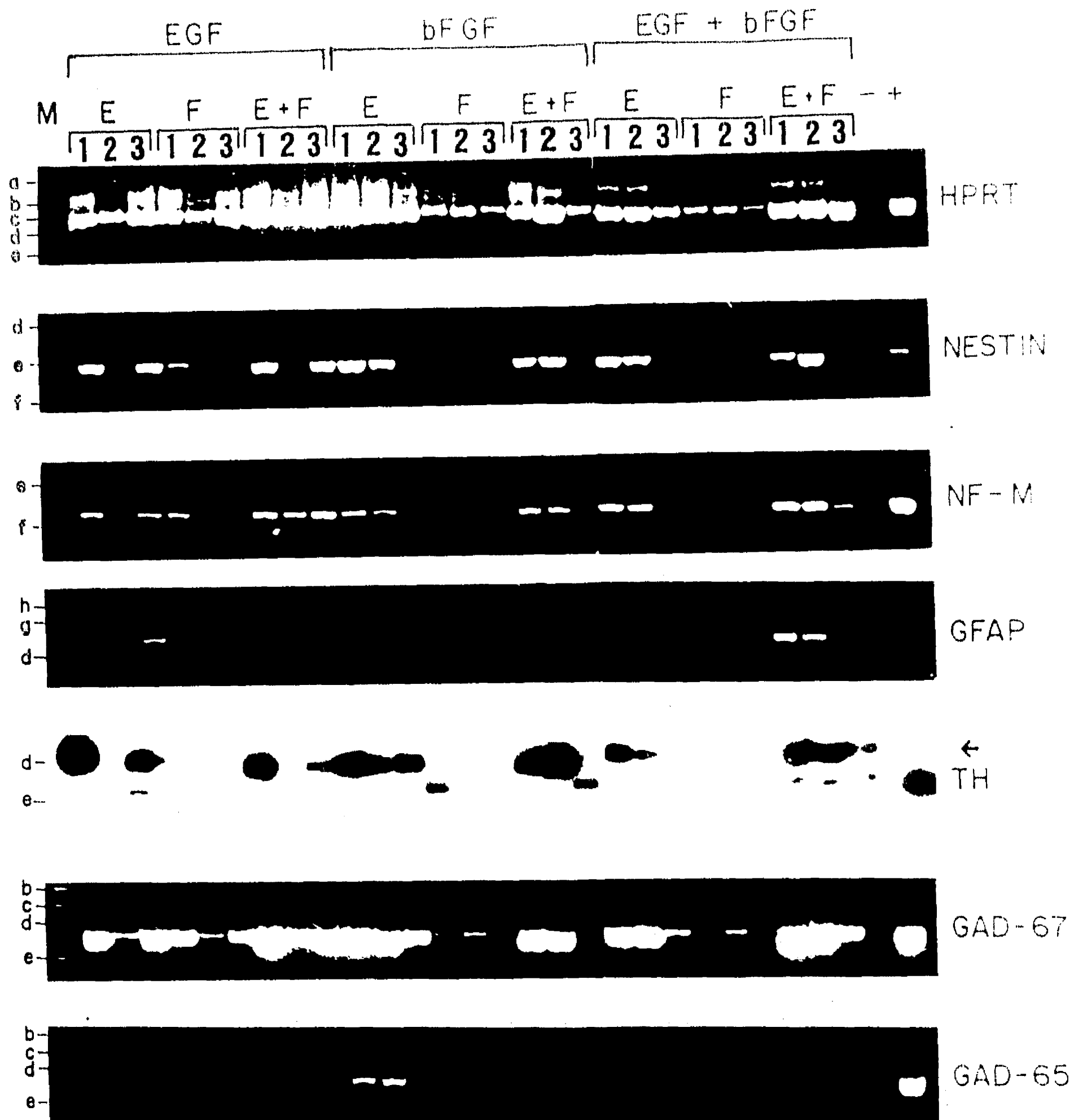


Figura IX.4 Subcultivos de colonias de precursores neurales del mesencéfalo. Colonias generadas bajo las condiciones indicadas fueron subcultivadas en la presencia de 100 ng/ml de EGF (E), bFGF (F), o ambos (E + F). La misma colonia (numeración) fue subcultivada bajo las diferentes condiciones analizadas. Se realizó RT-PCR específico para HPRT (indicativo de la cantidad de muestra), nestina, GFAP, NF-M, TH, GAD65 y GAD67, del conjunto de colonias secundarias generado a los 11 días de cultivo. Los productos de PCR fueron del tamaño esperado (HPRT=326 pb; NF-M= 186 pb; GFAP= 346 pb; nestina= 222 pb; TH=254 pb; GAD<sub>65</sub>= 367 pb; GAD<sub>67</sub>= 274 pb) y corroborada su identidad por mapeo con enzimas de restricción; productos de PCR obtenidos con ADN contaminante fueron de un tamaño mayor (HPRT= 579 pb y GFAP= 554 pb) o no amplificables (nestina, NF-M, GAD<sub>65</sub> y GAD<sub>67</sub>). El marcador de peso molecular fue pBR322 digerido con Hinf-I ( a=506 pb; b= 394 pb; c= 344 pb; d= 298 pb; e= 220 pb; f= 154 pb; g= 394 pb; h= 453 pb). La flecha indica al producto de la TH obtenido de ADN genómico.

Para evaluar si existía alguna preferencia para diferenciar hacia alguno de los diferentes fenotipos del linaje catecolaminérgico, se investigó por RT-PCR en subcultivos de colonias la presencia de la dopamina- $\beta$ -hidroxilasa (DBH) y de la feniletanolamina-N-metiltransferasa (PNMT), enzimas que determinan la síntesis de noradrenalina y adrenalina respectivamente. Con ese procedimiento no fue posible detectar DBH y PNMT en subcultivos de colonias generadas con EGF (Tabla 1, Artículo 2), ni en subcultivos de colonias de bFGF y EGF + bFGF (datos no mostrados). Lo anterior, favorece la interpretación de que los precursores que responden a los factores de crecimiento, presentan una tendencia a generar neuronas dopaminérgicas.

Para investigar si los precursores neurales expandidos con factores de crecimiento pudieran dar origen a otros fenotipos, se investigó la presencia de los ARNm de la GAD<sub>65</sub> y GAD<sub>67</sub>, enzimas que sintetizan GABA (Fig. IX.4). La GAD<sub>67</sub> se expresa en todas las condiciones y, presenta un nivel de expresión similar al de nestina y NF-M. Para el caso del ARNm de la GAD<sub>65</sub>, su expresión fue muy escasa en subcultivos de colonias de EGF y de EGF + bFGF, siendo favorecida en células generadas de colonias de bFGF. Para determinar si la aparición de GAD<sub>65</sub> era relevante en el establecimiento del fenotipo GABAérgico, se investigó por un procedimiento de HPLC la presencia de GABA en subcultivos y en cultivos primarios expuestos a EGF o bFGF (Tabla 1). Así, se demostró que la única condición en la cual fue posible detectar GABA es en subcultivos de colonias de bFGF. En forma interesante, se encontró además un incremento en la concentración de GABA en cultivos primarios expuestos a bFGF, lo cual apoya un efecto positivo de bFGF sobre la maduración funcional del fenotipo GABAérgico. La correlación de GAD<sub>65</sub> y GABA resulta interesante, en vista de que todas las colonias son capaces de expresar la GAD<sub>67</sub>, lo cual permite postular que la maduración del fenotipo GABAérgico en el mesencéfalo parece relacionarse estrechamente con la expresión de la GAD<sub>65</sub>.

TABLA 1  
NIVELES DE GABA

INDUCTOR DE COLONIA PRIMARIA	CULTIVO PRIMARIO	CONDICIONES DEL SUBCULTIVO		
		EGF	bFGF	EGF + bFGF
EGF	46	ND	ND	ND
bFGF	182	8	ND	293
EGF + bFGF	27	ND	ND	ND
CONTROL	100			

Tabla 1. Una suspensión fue preparada a partir de colonias individuales obtenidas con EGF, bFGF y EGF + bFGF, y subcultivadas en las condiciones indicadas. Después de 12 días todas las colonias fueron recogidas, lisadas para purificar el ARNm. El sobrenadante fue utilizado para la detección por HPLC de GABA. Se presentan también los valores de los cultivos primarios a los 8 días de cultivo bajo las condiciones indicadas. Los valores representan ng/ $\mu$ g de proteína total. ND= No detectado.

# Epidermal Growth Factor (EGF), Transforming Growth Factor- $\alpha$ (TGF- $\alpha$ ), and Basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) Differentially Influence Neural Precursor Cells of Mouse Embryonic Mesencephalon

J. Santa-Olalla and L. Covarrubias

Departamento de Biología Molecular, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos, México

Growth factors are key elements in the process of neural cell differentiation. We examined the effects of classical mitogens on neural precursor cells, by culturing mouse cells of the embryonic (13.5 days post-coitum) mesencephalon and treating them with epidermal growth factor (EGF), transforming growth factor- $\alpha$  (TGF- $\alpha$ ), basic fibroblast growth factor (bFGF), nerve growth factor (NGF), and transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ). Our initial results show that EGF, TGF- $\alpha$ , or bFGF, but not NGF or TGF- $\beta$ , induced general proliferation of the cultured cells, followed by formation of colonies. Combinations of these three growth factors suggest that most cells with the capacity to form colonies responded to EGF, TGF- $\alpha$ , or bFGF. The number of colonies increased significantly when EGF, but not TGF- $\alpha$ , was used in combination with bFGF. Furthermore, a population responding only to EGF + bFGF was detected in the dorsal mesencephalon. The colony-forming activity of bFGF was dependent on insulin, but bFGF and insulin cooperation was indirect since we could not observe colony formation in subcultures of cells derived from colonies, even in the presence of insulin. Cells obtained from our colonies displayed neuronal and glial morphology and expressed markers of both neurons and astrocytes; nestin, a marker of neural precursor cells, was also expressed in the majority of colonies. Growth factors also influenced neuronal maturation; the best neurite outgrowth was obtained from cells derived from bFGF-induced colonies cultured in the presence of EGF + bFGF. These data indicate the existence of neural precursor cells in the embryonic mesencephalon that respond differentially to growth factors. © 1995 Wiley-Liss, Inc.

**Key words:** insulin, neural precursor cells, embryonic mesencephalon, neuronal maturation, proliferation

## INTRODUCTION

During vertebrate neural development, cells are exposed to a series of influences such that proliferation, survival, and differentiation occur in an orderly sequence both in space and time. Nerve growth factor (NGF) has the ability to elicit neuronal differentiation (Aloe and Levi-Montalcini, 1979), enhance survival (Barde, 1989), and, under certain conditions, participate in activation of cell proliferation (Cattaneo and McKay, 1990). Recently, interest in growth factors in the central nervous system (CNS) has increased due to the discovery of new neurotrophic factors, as well as to the localization and activity of classical mitogens (Korsching, 1983; Patterson and Nawa, 1993). Stimulation of proliferation by epidermal growth factor (EGF) has been observed in cells of the retinal neuroepithelium (Anchan et al., 1991), the embryonic mesencephalon (Mytilineou et al., 1992), and the adult striatum (Reynolds et al., 1992). In addition, EGF may have a role in neuronal survival and maturation (Casper et al., 1991). Basic fibroblast growth factor (bFGF) seems to have a broader spectrum of action, promoting proliferation and enhancing survival and neurite outgrowth of neural precursors (Murphy et al., 1990; Vescovi et al., 1993) at different stages during development (Mayer et al., 1993) and in various CNS regions (Unsicker et al., 1987; Ferrari et al., 1989). An increasing number of hematopoietic growth factors have demonstrated activity in the CNS, especially in neuronal survival and maturation (Patterson, 1992; Patterson and Nawa, 1993).

Received August 24, 1994; revised December 9, 1994; accepted January 10, 1995.

Address reprint requests to Luis Covarrubias, Departamento de Biología Molecular, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apdo. Postal 510-3, Cuernavaca, Morelos 62271, México.

Neural precursors originate in the neuroepithelium, from which they have to proliferate, migrate, and differentiate. Although neurons and glial cells, the major cell types of the CNS, arise at different times during development, common precursors may exist during neurogenesis (Frederiksen et al., 1988; Ryder et al., 1989; Turner et al., 1990). Due to the complex cell interactions present during development, studies related to the phenotypic establishment of neural cells are facilitated by the isolation and expansion of precursors. Immortalization, using a variety of oncogenes, has produced homogeneous populations of presumed precursor cells (Cepko, 1988; Frederiksen et al., 1988). These cell lines are able to differentiate *in vitro* and *in vivo*, generating neural cells (Ryder et al., 1989; Birren and Anderson, 1990). Alternatively, addition of growth factors to the culture medium could promote the proliferation of precursor cells. EGF and bFGF induce the proliferation of cells which can differentiate to neurons and astrocytes (Reynolds and Weiss, 1992; Reynolds et al., 1992; Kilpatrick and Bartlett, 1993).

To establish the ability of neural cells to respond to known growth factors, we cultured primary mouse embryonic mesencephalic cells and assayed their effect on proliferation, survival, and differentiation. Here we report that EGF, transforming growth factor- $\alpha$  (TGF- $\alpha$ ), and bFGF induce colony formation in these cultures. Colony-forming activity of bFGF depends on insulin, and our data suggest that bFGF enhances cell survival. Combinations of EGF, TGF- $\alpha$ , and bFGF indicate that, although these factors share the same target cells, a specific population exclusively responds to EGF + bFGF. We show that colony formation is the result of active cell proliferation as inferred by colony cells' renewal capability. Cells derived from these colonies expressed neurofilaments and nestin, a marker of neural precursor cells. The growth factors tested also had a differential effect on neuronal maturation.

## MATERIALS AND METHODS

### Cell Cultures

The procedure was carried out as described by Lauder et al. (1989). Briefly, pregnant CD-1 mice were sacrificed by cervical dislocation, and the embryos (13.5 days postcoitum; dpc) were removed and collected into cold PBS-glucose (5.4 mM potassium chloride, 138 mM sodium chloride, 22 mM glucose, 2 mM sodium-potassium phosphate, pH 7.2); the brains of the embryos were dissected in the same solution. The ventral mesencephalon dissected was the one-third most ventral region of the mesencephalon, and the remainder was considered the dorsal mesencephalon. The regions to be cultured were exposed to 0.25% trypsin for 15 min, inactivated

by adding fresh medium with 10% serum (1:1 v/v), and mechanically dissociated with a 5-ml pipette and a fire-polished Pasteur pipette. Cells were collected by centrifugation at 800g for 5 min and resuspended in serum-free medium which was composed of high-glucose Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) and Ham's F12 (1:1 v/v), supplemented with glutamine (2.92 mg/ml), penicillin-streptomycin (0.5 U/ml and 0.5  $\mu$ g/ml, respectively), insulin (25  $\mu$ g/ml), transferrin (100  $\mu$ g/ml), putrescine (60  $\mu$ M), progesterone (20 nM), and selenium (30 nM). Cells were counted in a hemocytometer and adjusted to  $1 \times 10^6$  cells/ml; trypan blue exclusion was carried out to verify cell viability. Aliquots of this suspension (250,000 cells) were cultured in 16-mm-diameter wells (precoated with poly-D-lysine for 2 hr) with 0.5 ml of serum-free medium; aliquots of the same suspension were utilized to evaluate growth factors, individually and in combination. Cultures were maintained at 37°C in humidified 5% CO<sub>2</sub>-95% atmospheric air. Growth factors were added 1 hr after seeding. All growth factors were purchased from GIBCO-BRL (Grand Island, NY).

### RNA Purification, cDNA Synthesis, and Polymerase Chain Reaction (PCR) Procedure

RNA was purified from cultures using a modified version of the method of Chomczynski and Sacchi (1987). Briefly, cultures were washed with PBS-glucose, and cells were lysed directly on the cell culture plates by the addition of 0.5 ml of 6 M urea/3 M LiCl solution, incubated at -20°C overnight, and centrifuged at 10,000g for 10 min; the pellet was resuspended in 500  $\mu$ l of guanidinium isothiocyanate solution (GuSCN solution: 4 M guanidinium thiocyanate, 25 mM sodium citrate, pH 7.0, 0.5% sarcosyl, 0.1 M 2-mercaptoethanol). Two M sodium acetate pH 4, phenol, and chloroform were then added in the following ratios: 1/10, 1/1, and 1/20, respectively. Chloroform was a 24:1 mixture of chloroform and isoamyl alcohol. The suspension was vortexed 1 min, kept on ice for 15 min, and centrifuged at 10,000g for 20 min. The aqueous phase was collected and precipitated with an equal volume of isopropanol at -20°C. The pellet was resuspended in 150  $\mu$ l GuSCN and reprecipitated. The RNA was washed with 75% ethanol and resuspended in 20  $\mu$ l of water. Ten  $\mu$ l were used for cDNA synthesis using M-MLV Reverse Transcriptase (GIBCO-BRL) in 30  $\mu$ l final reaction volume according to the manufacturer's recommendations. Routinely, 6  $\mu$ l of cDNA reaction were used in a PCR reaction containing 2.5 U Taq DNA polymerase (Boehringer-Mannheim, Mannheim, Germany), 200 mM deoxyribonucleoside-5'-triphosphates, and 1.86 mM MgCl<sub>2</sub> in the buffer provided, and 30 pmols each of forward and reverse primers; all reactions were carried out in a programmable heating block

(Hybaid, Woodbridge, NJ). PCR protocols for hypoxanthine phosphoribosyl transferase (HPRT; a housekeeping enzyme) were: 93°C for 1 min, 57°C for 1 min, 72°C for 1 min, 35 cycles; for nestin: 95°C for 1 min, 57°C for 1 min, 72°C for 1 min, 35 cycles; and for neurofilament M (NF-M) and glial fibrillary acidic protein (GFAP): 95°C for 1 min, 67°C for 1 min, 72°C for 1 min, 35 cycles; in all cases, PCR was ended with 10 min at 72°C. Oligonucleotide primers for HPRT were: forward CCTGCTG-GATTACATTAAGCACTG, reverse GTCAAGGGC-ATATCCAACAACAAAC (Melton et al., 1984); for nestin: forward CTACCAGGAGCGCGTGGC, reverse TCCACAGCCAG(intron)CTGGAAGCTT (Lendahl et al., 1990); for NF-M: forward GCCGAGCAGAACAAGGAGGCCATT, reverse CTGGATGGTGTC(intron)CTGGTAGCTGCT (Levy et al., 1987); and for GFAP: forward TTGCAGACCTCACAGACGCTGCGT, reverse CGGTTTTCTTCGCCCTCCAGCAAT (Balcarek and Cowan, 1985). All PCR products were of the expected size (Fig. 7), and their identity was confirmed by analyzing the gel electrophoresis digestion pattern produced by several restriction endonucleases.

#### Immunocytochemistry

The cells were fixed in methanol at -20°C for 30 min, and washed twice in PBS-glucose. The cells were incubated 1 hr with either a rabbit anti-150 kD rat neurofilament antibody (Chemicon, Temecula, CA) or rabbit anti-mouse GFAP antibody (Dako, Carpinteria, CA), diluted 1:400 or 1:250 in 0.1 M TBS (0.1 M Tris, 24.9 mM sodium chloride, pH 7.6), 5% nonfat milk, and 1% triton (TBS/M-T), respectively. The following rinses and incubations were performed: 3 rinses (10 min each) with TBS/M-T, 30-min incubation with biotinylated anti-rabbit antibody diluted 1:300 from the Vectastain elite ABC kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA), 3 rinses (10 min each) with TBS/M-T, 30-min incubation with avidin-biotin complex, 3 rinses (10 min each) with TBS, and, finally, cell preparation developed with 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (0.5 mg/ml) for 8 min. Positive cells were analyzed by bright field microscopy.

#### Statistical Analysis

Statistical comparisons were made using Student's *t*-test, carried out with the Microsoft Excel Version 4.0 (Microsoft Corporation, Redmond, WA). *P* values  $\geq 0.05$  were considered not significant.

## RESULTS

### Proliferative Properties of EGF, TGF- $\alpha$ , and bFGF on Primary Mesencephalic Cultures

Aiming to induce the proliferation of neural precursors from embryonic mesencephalon, we cultured dissociated 13.5 dpc mesencephalic cells in serum-free

medium and the presence of several growth factors. In the initial experiments we tested EGF, bFGF, NGF, TGF- $\alpha$ , and TGF- $\beta$ 1 at the maximum doses suggested by the supplier (1,000 ng/ml for EGF and TGF- $\alpha$ ; 100 ng/ml for NGF and bFGF; and 0.5 ng/ml for TGF- $\beta$ ). Under these conditions it was possible to observe that EGF, bFGF, and TGF- $\alpha$  independently stimulated proliferation, while NGF and TGF- $\beta$ 1 did not. After 8 days in culture with EGF, bFGF, and TGF- $\alpha$ , the formation of colonies was obvious on the top of the monolayer (Fig. 1A,B,D). Colony morphology could be classified in two types: round and large colonies (type I) emerged from the monolayer and were loosely attached to the plate, whereas flat and small colonies (type II) only appeared to define a proliferation zone. Initially, most colonies conformed to type II and, with time, most of them evolved to type I. Therefore, this morphological difference might be partly due to the growth rate as a consequence of growth factor potency on specific precursor cells. On the eighth day of culture, the majority of EGF- and TGF- $\alpha$ -derived colonies were type I, and those obtained with bFGF were type II. These colonies were similar to those described by Reynolds and Weiss (1992) and Kilpatrick and Bartlett (1993).

### Effect of Growth Factor Combinations on Colony Formation Activity

The rate of colony formation and number (i.e., type I plus type II) depended on the concentration of growth factor (Fig. 2). Optimal colony formation with bFGF required a high dose, reaching a plateau between 100–500 ng/ml (data not shown). The maximum number of colonies obtained with EGF, bFGF, or TGF- $\alpha$  was similar, suggesting that they acted on common cellular targets (Fig. 3). To test this possibility, we treated our primary cultures with combinations of these three growth factors. Figure 3 shows that each growth factor alone or in combination gave a similar number of colonies, although, clearly, EGF + bFGF increased significantly the total number obtained with any of them alone. Therefore, a distinct population only responsive to EGF + bFGF may also be present in the mesencephalon (see below). The same increase was not observed with TGF- $\alpha$ .

### Role of Insulin in Colony Formation Activity

Insulin is a hormone usually included in serum-free medium. Our primary cultures in the absence of insulin showed a slight decrease in the total number of cells (data not shown). To test if insulin cooperates in the phenomenon of colony formation, we compared the number of colonies obtained with EGF, bFGF, TGF- $\alpha$ , and the corresponding combinations in either the presence (i.e., regular medium) or absence of insulin. As can



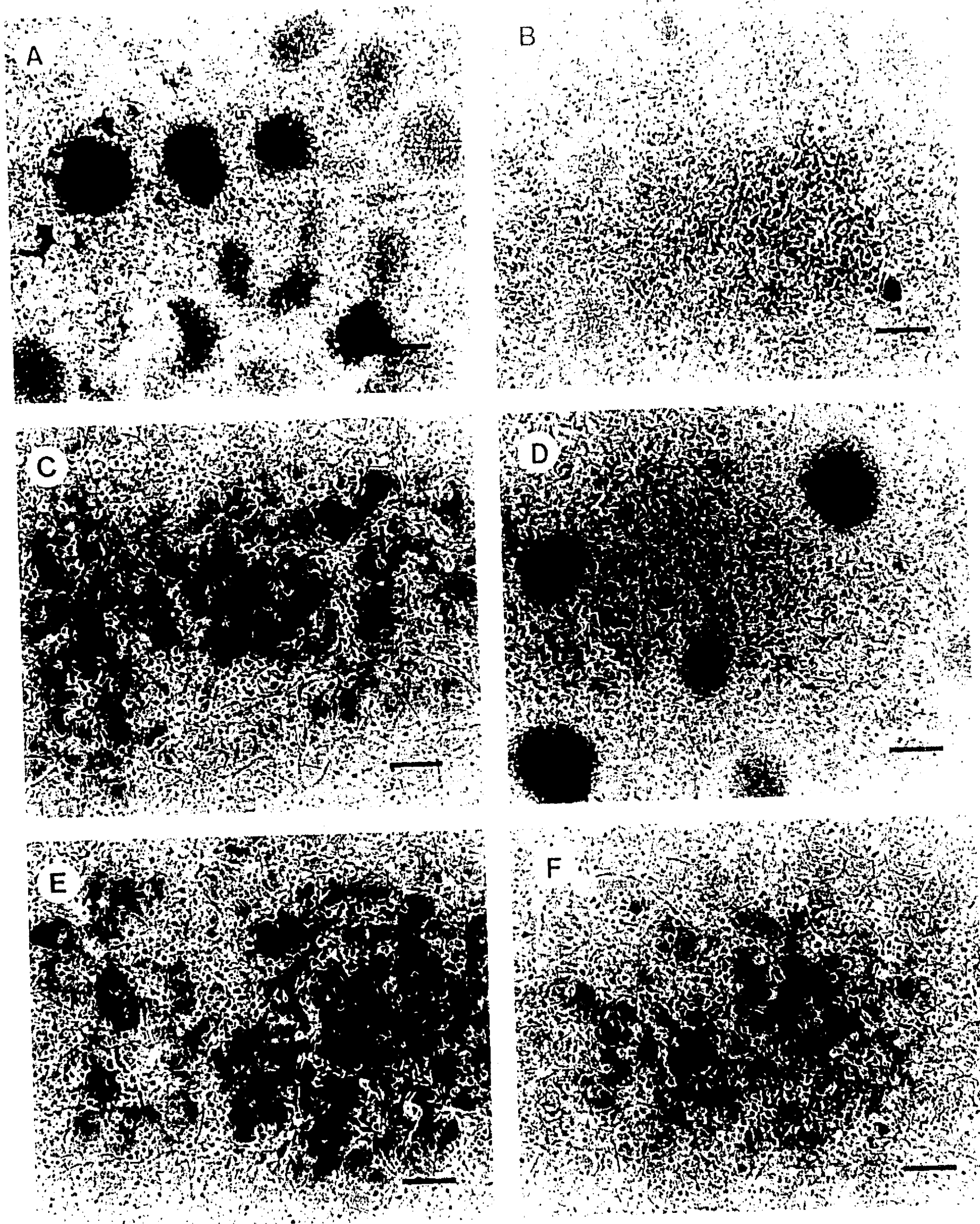


Fig. 1. EGF, bFGF, and TGF- $\alpha$  formed colonies from primary mesencephalic cell cultures. Primary cultures were prepared from 13.5-dpc embryonic mesencephalon and incubated in the presence of growth factors. Phase-contrast photomicrographs of EGF- (A), bFGF- (B), and TGF- $\alpha$  (D)-derived colonies, or NGF- (C), TGF- $\beta$ 1- (E), and serum-free medium (F)-treated primary cells after 8 days in culture, are shown. Bars, 100  $\mu$ m.

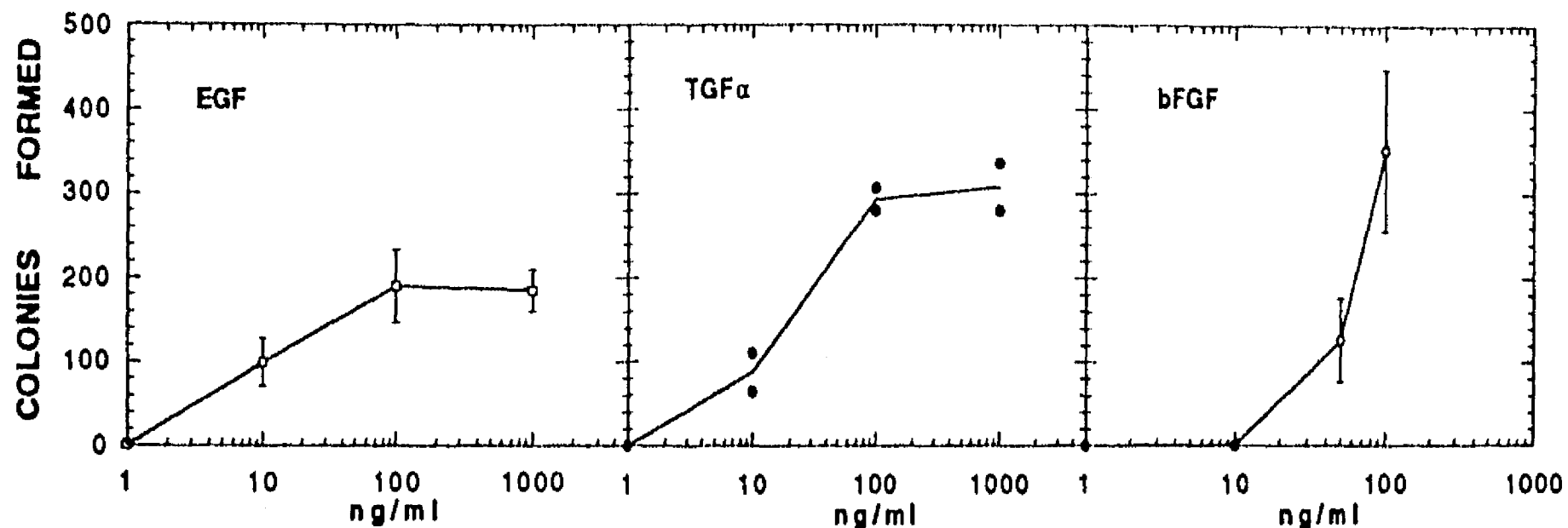


Fig. 2. Effect of growth factor dose on colony-forming activity. Primary mesencephalic cell cultures were exposed continuously to several doses of EGF, TGF- $\alpha$ , and bFGF, and the number of colonies formed was counted after 8 days in culture. Data for EGF and bFGF are expressed as the mean  $\pm$  SEM of colonies generated in 16-mm wells (EGF,  $n = 6$ ; bFGF,  $n = 4$ ) from three and two independent experiments, respectively. Although TGF- $\alpha$  data represent the mean of a single experiment ( $n = 2$ ), independent experiments with 100 ng/ml were reproducible.

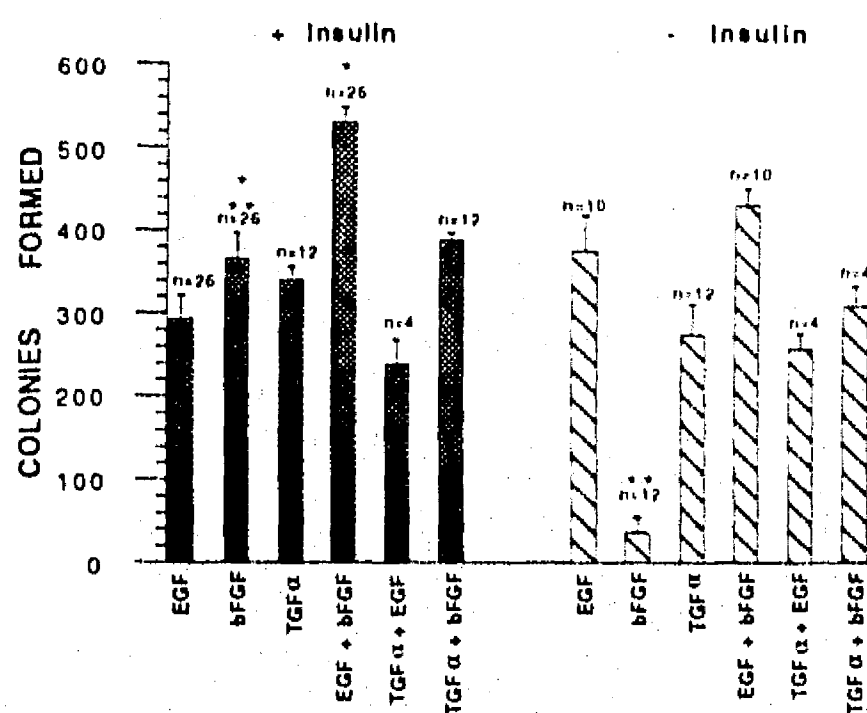


Fig. 3. Cooperation between EGF, bFGF, and TGF- $\alpha$  and insulin dependency on colony-forming activity. Colonies obtained with 100 ng/ml of EGF, bFGF, and TGF- $\alpha$ , or the association between them at the same doses, were analyzed. The same conditions were studied in the presence or absence of insulin (25  $\mu$ g/ml). The values represent the mean  $\pm$  SEM of colonies generated in individual 16-mm wells from at least two different experiments. There is a significant increase when EGF and bFGF are used together ( $*P < 0.001$ ). On the other hand, the production of colonies with bFGF was significantly reduced ( $**P < 0.001$ ) without insulin.

be observed in Figure 3, insulin has a substantial effect on colony-forming activity of bFGF but not of EGF or TGF- $\alpha$ ; general cell proliferation observed normally dur-

ing colony formation was not affected. The increase in the number of colonies observed when EGF was combined with bFGF did not occur in the absence of insulin. These results suggest that the colony-forming activity of bFGF depends on the presence of other growth factors (see below).

#### Colony Formation in Ventral and Dorsal Mesencephalon

Whole mesencephalon can be anatomically and functionally divided into ventral and dorsal regions. Ventral mesencephalon contains the substantia nigra, which is primarily dopaminergic. In an attempt to define differences among growth factor-responsive cells, we compared the colony-forming activity of EGF, bFGF, or EGF + bFGF in dorsal, ventral, and whole mesencephalic cells. Figure 4 shows that although, as we had previously observed, an overlapping cell population seemed to be the target of EGF and bFGF, a strong difference was seen in each region's mode of response to growth factors. In the dorsal region, EGF or bFGF were only able to form very few colonies; however, this number increased up to 6-fold when both were included in the culture medium. In contrast, a large number of colonies was obtained with EGF or bFGF in the ventral region, but this number decreased significantly when they were added together. The sum of colonies obtained from each region is similar to the number obtained when whole mesencephalon was used (data not shown), indicating an independent origin for the colonies from each region.

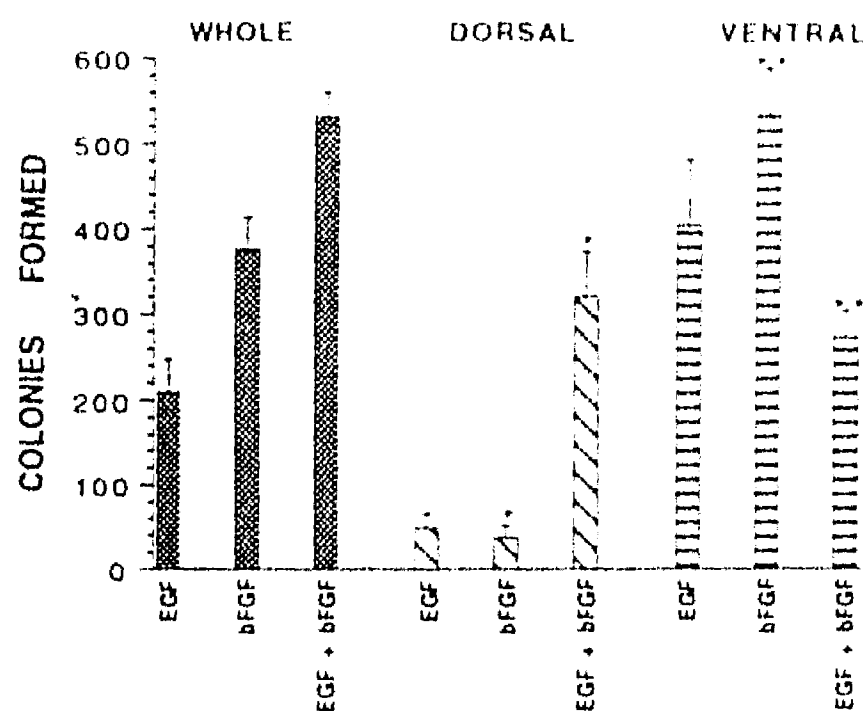


Fig. 4. Differential response of ventral and dorsal regions of mesencephalon to growth factors. Cell cultures from whole, dorsal, or ventral mesencephalon were carried out in the presence of the growth factor indicated (100 ng/ml). Each experiment was performed with embryos from the same litter. Values were obtained from four different experiments, and the mean  $\pm$  SEM of colonies formed in individual wells ( $n = 8$ ) are shown.

#### Ability of Primary Colony Cells to Respond to Growth Factors

In order to determine if at least some of the cells that formed each colony were responsive to growth factors, we cultured dissociated cells derived from single colonies obtained with EGF, bFGF, and EGF + bFGF in the presence of the same factor(s) that influenced their formation (Table I). In the presence of EGF or EGF + bFGF, all colonies were able to generate secondary colonies, independent of their origin. In general, two different morphologies were observed in secondary colonies: one ("round") had the same appearance as the parent (primary) colony, whereas the other ("flat"), although similar to type II primary colonies, grew only as a monolayer and never gave rise to type I colonies. These results establish a difference in response to each growth factor and to their combination of putative precursor cells (see Discussion). When bFGF was used in the subculture, secondary colonies were rarely formed; nonetheless, very small aggregates (i.e., groups of up to 10 cells) were observed.

Formation of secondary colonies was also observed when whole primary colonies were transferred to a new plate (Table II). Generation of secondary colonies occurred after seeding, involving colony enlargement and migration and proliferation of cells; the morphology of these colonies resembled that of the parent colony (Fig.

5). In agreement with the results in the primary cultures described above, development of secondary colonies was improved when EGF + bFGF were present.

#### Expression of Neural Markers in Colony-Derived Cells

In colony transfer experiments or serial subculture of cells derived from colonies, cells with either neuronal or glial morphology were clearly observed (Fig. 6). Generally, the number of neurons increased with the time a colony was in culture, or with the number of subcultures of cells derived from colonies. These data suggested that the action of the growth factors tested may induce the proliferation of bipotential precursors.

To confirm this hypothesis, we analyzed secondary colonies for the presence of specific astrocyte and neuronal markers (GFAP and NF-M, respectively). Specific RT-PCR for mouse NF-M performed on pools of secondary colonies showed that cells from all primary colonies were able to express NF-M (Fig. 7A); low or undetectable levels when bFGF was used in the subculture reflected the lack of proliferation described previously. Analysis of individual colonies (Fig. 7B) indicated that not all secondary colonies generated expressed NF-M, which might be due either to the lack of differentiated cells within the colony (cells attached to the plate were not taken in these experiments) or to the maturity state of the precursor cell at the time of the experiment. RT-PCR detection of GFAP mRNA was generally low and rare (Fig. 7), suggesting that the conditions required for astrocyte differentiation were not present. The mRNA of a marker of neural precursor cells, nestin, was also expressed in most conditions (Fig. 7).

Neuronal phenotype was also identified in secondary colonies by immunocytochemistry using a polyclonal antibody against NF-M. In agreement with the RT-PCR results, NF-M-positive cells were detected in the three conditions assayed, although different morphology was observed depending on the primary colony origin and subculture conditions. For example, EGF- and bFGF-derived primary colonies gave rise to different NF-M immunopositive cells in secondary colonies obtained in the presence of EGF (Fig. 8A-D,G); generally very short axons were observed in cells derived from an EGF parental colony (Fig. 8B,G), whereas longer processes were present in cells from bFGF-derived colonies (Fig. 8D). Even more ramifications were obtained if both growth factors were present in the subculture of cells from bFGF-derived colonies (Fig. 8E,F,H). In agreement with the RT-PCR results, the GFAP antibody showed very low levels of expression, and immunopositive cells were rarely seen (data not shown).

TABLE I. Secondary Colonies Form in Subcultures of Colony-Dispersed Cells\*

Inducer of primary colony	Subculture conditions					
	EGF		bFGF		EGF + bFGF	
	Flat	Round	Flat	Round	Flat	Round
EGF	10.72 ± 2.13 (N = 33)	9.69 ± 2.15 (N = 33)	1.4 ± 1.22 (N = 36)	0 (N = 36)	14.32 ± 1.98 (N = 37)	6.72 ± 7.88 (N = 37)
bFGF	8.66 ± 1.43 (N = 27)	7.07 ± 1.63 (N = 27)	0.9 ± 0.23 (N = 42)	0.47 ± 0.03 (N = 42)	11.27 ± 1.70 (N = 36)	10.08 ± 2.82 (N = 36)
EGF + bFGF	7.23 ± 1.74 (N = 26)	2.61 ± 0.87 (N = 26)	0.25 ± 0.10 (N = 36)	0 (N = 36)	12.52 ± 1.89 (N = 40)	2.624 ± 0.70 (N = 40)

\*A single-cell suspension was prepared from individual colonies obtained with EGF, bFGF, or EGF + bFGF, and subcultured in the same three conditions in three 16-mm wells. After 11 days in culture, two types of new colonies were formed and counted. Values represent the mean ± SEM of colonies generated in 16-mm wells from at least five different experiments.

TABLE II. Colonies Transferred to a New Well Generate Secondary Colonies\*

Inducer of primary colony	Transference condition	Colonies assayed	Productive colonies	Secondary colonies/productive colonies
EGF	EGF	3	2	3.5
	EGF + bFGF	3	3	9
bFGF	EGF	3	1	12
	EGF + bFGF	3	3	11
EGF + bFGF	EGF	3	2	10.5
	EGF + bFGF	3	3	37

\*Colonies formed by EGF, bFGF, or EGF + bFGF were transferred to new well and cultured with either EGF or EGF + bFGF; all colonies assayed survived. The mean ± SEM of satellite colonies generated by each colony after 11 days in culture are shown.

## DISCUSSION

Different lines of evidence have shown that growth factors are crucial during development. The biological activity of growth factors can vary, from inhibition and activation of proliferation, to differentiation and control of cell survival. Generally, activity of specific growth factors depends on the target cell type and, most likely, on the differentiation state (Mayer et al., 1993; Patterson and Nawa, 1993). Accordingly, a large number of growth factors have been found in the developing CNS, and diverse activities have been observed on neural cells. Our results show that EGF, TGF- $\alpha$ , and bFGF act on neural precursors promoting cell proliferation and influencing neuron maturation. Although the three factors seem to affect an overlapping cell population, our data suggest that each uses a different mechanism of action.

### EGF, TGF- $\alpha$ , and bFGF Induce Colony Formation by Different Mechanisms

Similar numbers of colonies were obtained with each factor, and no additive effect was observed when combinations of different growth factors were used in

culture. These results suggest an overlapping target cell population. Supporting this idea, when dorsal and ventral regions of mesencephalon were separated, EGF or bFGF gave a similar number of colonies from each region (Fig. 4). Notably, a specific cell population in the dorsal region responded only to the action of both growth factors. In addition, the fact that cells from bFGF-derived colonies were able to respond to EGF is also in agreement with this hypothesis (see below).

Both TGF- $\alpha$  and EGF were able to induce formation of colonies, but distinctive differences between them were observed. The experiments we present here using the same cell population show that, at saturating concentrations, more colonies were obtained with TGF- $\alpha$  than with EGF (Fig. 2) and, when they were combined, a decrease rather than an increase in the total number of colonies was observed (Fig. 3); these differences were also reflected in colony size (colonies from TGF- $\alpha$  were larger than those from EGF; data not shown). Remarkably, the enhancing effect of bFGF was only observed with EGF and not with TGF- $\alpha$  (Fig. 3). These data are in agreement with a series of studies showing different biological effects of EGF and TGF- $\alpha$  (Schreiber et al., 1986; Ibbotson et al., 1986; Gan et al., 1987). Although several reports have indicated that EGF and TGF- $\alpha$  share the same membrane receptor, experimental evidence indicates that the receptor site where EGF binds is not identical to the one TGF- $\alpha$  uses (Winkler et al., 1989). Distinct binding of EGF and TGF- $\alpha$  to a single receptor may activate different signal transduction pathways; however, we cannot yet discard the possibility of exclusive *in vivo* receptors for these growth factors.

Colony-forming activity of bFGF uses a mechanism different from that employed by EGF or TGF- $\alpha$ . On the one hand, bFGF produced very few colonies from primary cultures if insulin was absent in the medium (Fig. 3); on the other, even in the presence of insulin, bFGF could not generate colonies from dispersed cells of single primary colonies (Table I), independent of their

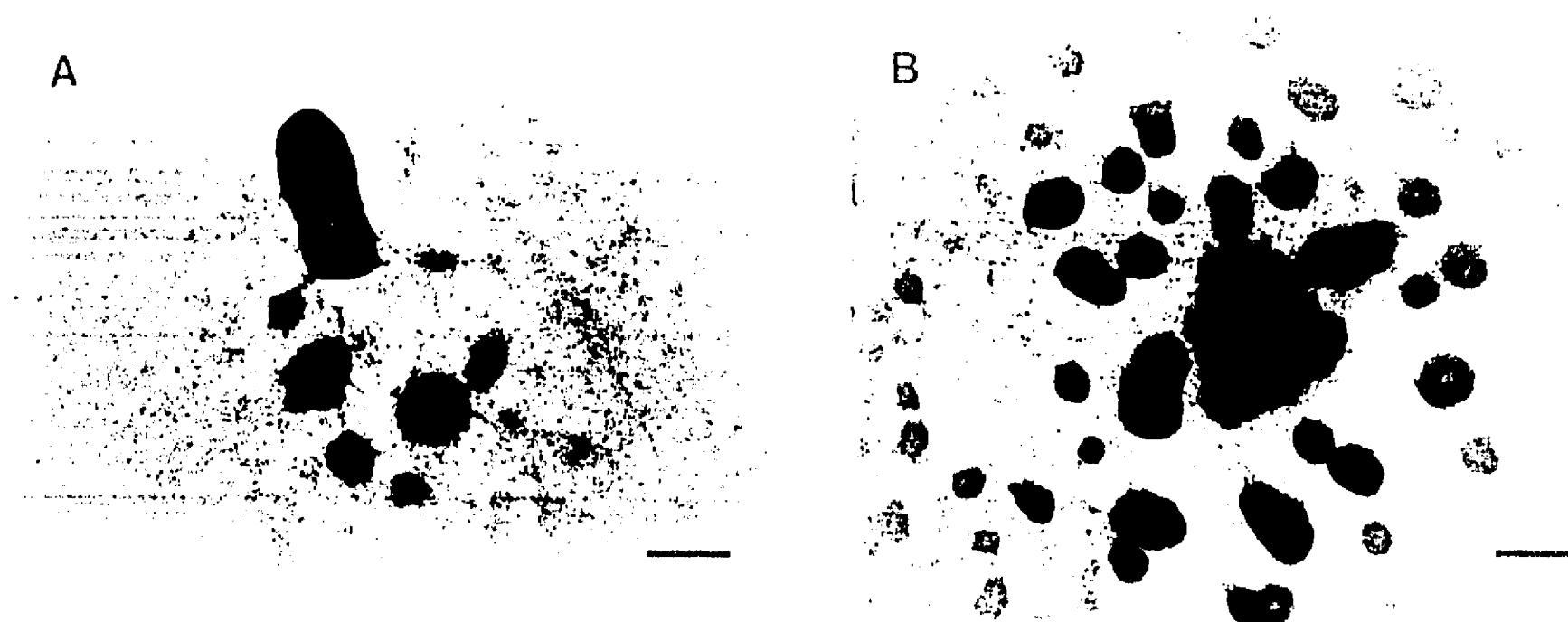


Fig. 5. Secondary colonies generated from intact primary colonies. Single colonies generated with EGF + bFGF were transferred to new plates and cultured 11 days under the presence of EGF (A) or EGF + bFGF (B). Bar, 250  $\mu$ m.

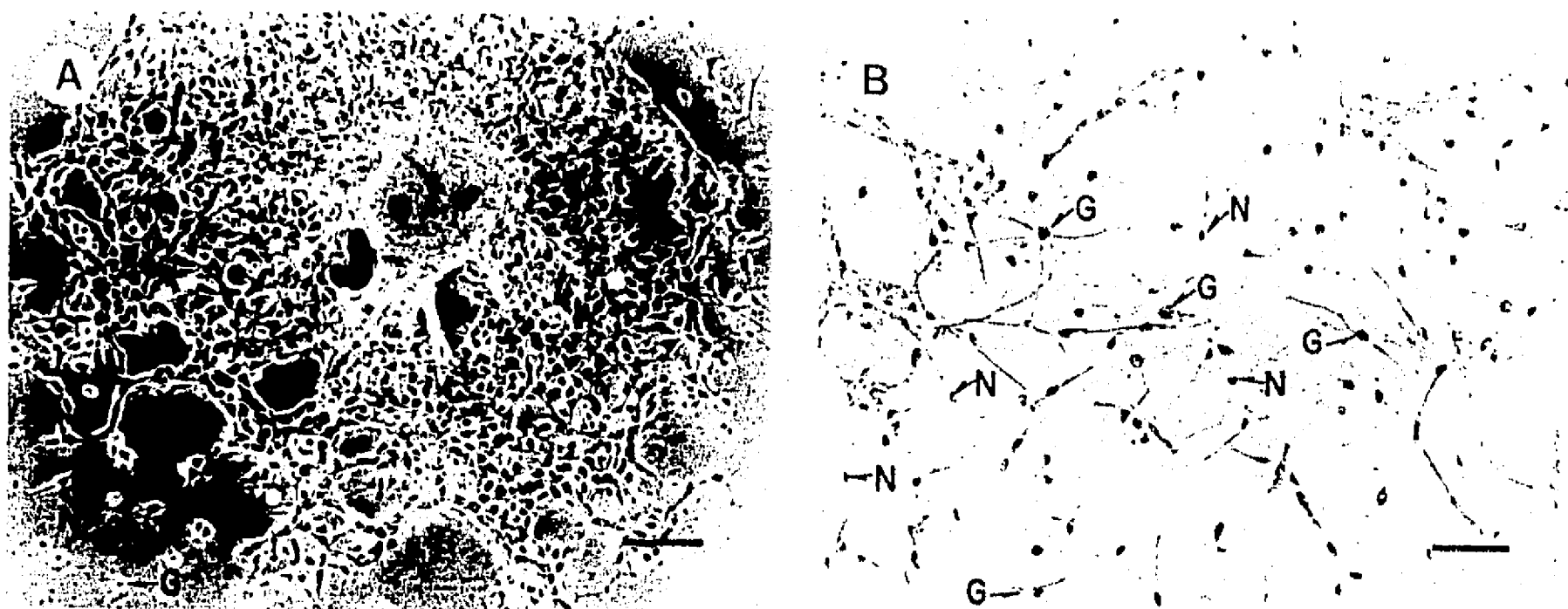


Fig. 6. Cells with glial and neuronal morphology were generated from growth factor-induced colonies. A: The bFGF-induced colony was transferred to new plate in the presence of the same growth factor and cultured 11 days. B: The EGF + bFGF colony was dispersed and subcultured under the presence of EGF + bFGF (100 ng/ml of each factor) for 11 days. Bars: A, 100  $\mu$ m; B, 50  $\mu$ m. N, neuron; G, glial cell.

origin (see below). Taking these data together, we suggest that most colony-forming activity of bFGF is a phenomenon which results from the interaction with another factor possibly produced by cells responsive to insulin. Insulin-like growth factor I has been shown to mediate the proliferative effect of bFGF on neural cells (Drago et al., 1991); therefore, it is a candidate factor that could cooperate in vivo with this factor.

Increase in the number of colonies formed with EGF + bFGF, as opposed to the number formed with EGF or bFGF alone in primary cultures, can be ex-

plained simply by the presence of a particular cell population responsive only to both growth factors together, as occurred in the dorsal region of the mesencephalon (Fig. 4). However, an enhancement was observed when we compared the number of secondary colonies generated after a primary colony was transferred and cultured in the presence of EGF or EGF + bFGF (Table II). In spite of these results, the response in primary cultures might be different since, in the ventral mesencephalon, an inhibitory effect of these two growth factors seems to occur (Fig. 4).

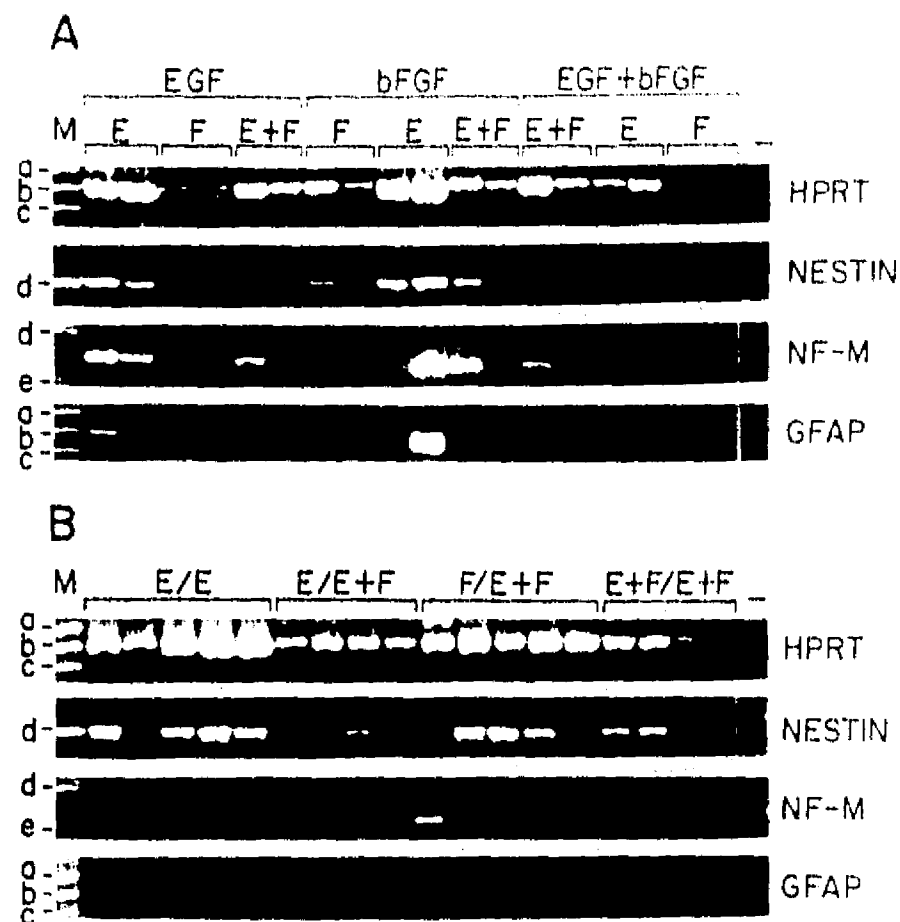


Fig. 7. Secondary colonies expressed nestin, GFAP, and NF-M. Colonies generated under the condition indicated were subcultured in the presence of EGF (E), bFGF (F), or both factors (E + F) at a concentration of 100 ng/ml. RT-PCR procedures for HPRT (indicative of the amount of sample), nestin, GFAP, and NF-M were performed on a pool of colonies generated (A) or on single colonies (B). PCR products were of the expected size (HPRT = 353; NF-M = 186 bp; GFAP = 346 bp; nestin = 222 bp), and were confirmed by restriction endonuclease mapping. Potential PCR products from contaminating genomic DNA were either of higher molecular weight (HPRT = 579; GFAP = 554) or not able to amplify (nestin and NF-M; see Materials and Methods). Molecular weight marker (M) was pBR322 digested with *Hinf*I (a = 396 bp; b = 344 bp; c = 298 bp; d = 220, 221 bp; e = 154 bp).

#### Cells From Growth Factor-Induced Colonies Have Self-Renewal Properties

Colony formation is likely to be a consequence of stimulation of cell proliferation, as inferred by the ability of colony-derived cells to form new colonies in a growth factor-dependent manner (Table I). Although not strictly tested, a single cell seems to be responsible for forming each colony; a dilution of up to 1 cell per 3 sq/mm makes unlikely a migration and aggregation of cells during the period of colony formation (each of the colonies analyzed was constituted of around 2,000 cells, and had a diameter of up to 1 mm). It should, however, be pointed out that at very high dilutions the development of colonies decreases dramatically.

Despite the fact that bFGF was not capable of forming secondary colonies, it is likely that primary colonies are also due to cell proliferation but are assisted by

insulin. Mitogenic activity of bFGF on neural precursors could be due to interaction with other factors. Recently, it has been shown that bFGF acts synergistically with TGF- $\beta$  to regulate Schwann cell mitosis (Schubert, 1992), and, on striatal cells, mitogenic activity of NGF depends on previous exposure to bFGF (Cattaneo and McKay, 1990). Therefore, TGF- $\beta$  and NGF are candidate factors that could be secreted in our primary cultures in response to insulin, and that could interact with bFGF to generate mitogenic activity. Alternatively, bFGF might allow the survival of cells induced to proliferate by an independent mitogenic factor; since the cells derived from bFGF primary colonies respond to EGF, this factor or a related one are candidate mitogenic factors whose secretion could depend on insulin stimulation. Data from other groups suggesting that bFGF could act as a survival factor (Ferrari et al., 1989; Mayer et al., 1993), and our preliminary results indicating that cells subcultured in bFGF for 2 weeks can still respond to the proliferating action of EGF, support this latter hypothesis.

#### EGF- and bFGF-Induced Colonies Are Originated From Neural Precursor Cells

The expansion of neural precursor cells present in the embryonic mesencephalon was demonstrated by the ability of cells derived from colonies to express markers of neurons and astrocytes (Figs. 7, 8). Morphological analysis of cells derived from colonies showed that neurons were predominant over glial cells; therefore, in our culture conditions, neuron differentiation seems to be favored. Accordingly, NF-M mRNA was present in most conditions, whereas GFAP mRNA expression was rarely seen (Fig. 7). In addition, immunocytochemical analysis with NF-M- and GFAP-specific antibodies identified most of the cells as neurons (Fig. 8), whereas astrocytes were infrequent and their immunoreactivity was generally low (data not shown). It should be pointed out that when colonies were analyzed individually, most of them did not express NF-M mRNA. We interpret this result, in light of the few NF-M immunoreactive cells seen within individual colonies, as indicative that most differentiated cells had adhered to the plate. Nestin, an intermediate filament present in neural precursor cells (Lendahl et al., 1990), was expressed with all growth factor combinations and in most colonies analyzed, though at variable levels (Fig. 7; see below).

Recently, induction of proliferation and formation of the so-called spheres by EGF, but not by bFGF, from embryonic and adult striatum was reported (Reynolds and Weiss, 1992; Reynolds et al., 1992). Cells from these spheres are able to generate both neurons and astrocytes, supporting the hypothesis that they derive from neural precursor cells. Similarly, stimulation of proliferation of neural precursor cells by bFGF was observed

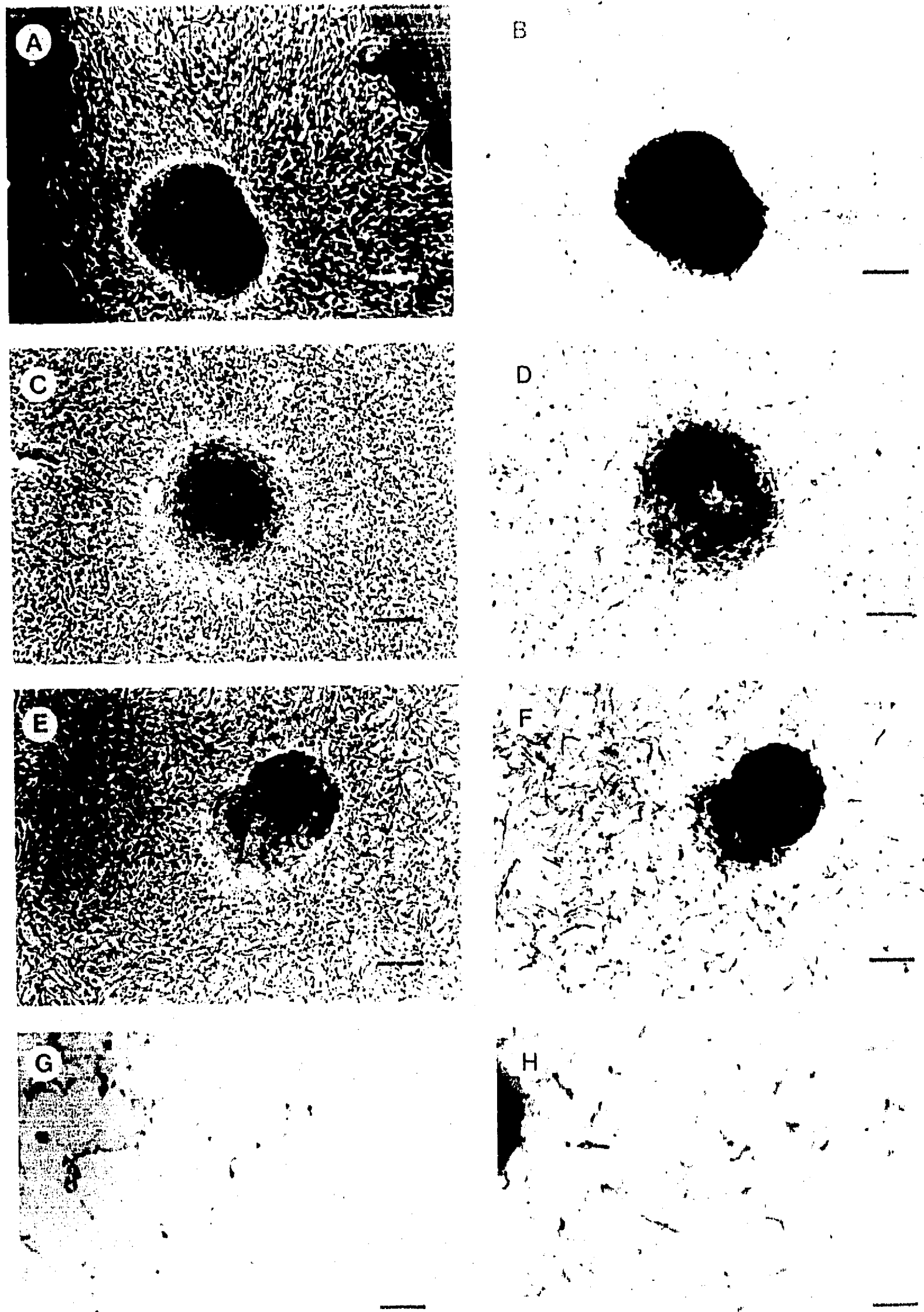


Fig. 8. Immunodetection of neurofilament-expressing cells generated from colonies. Cells from colonies obtained with EGF were subcultured in EGF (A,B), and those from colonies obtained with bFGF were subcultured in either EGF (C,D) or EGF + bFGF (E,F). Representative results from these experiments are shown. G,H: Higher magnifications of an NF-M-positive cell from B and F, respectively. A,C,E: Phase-contrast photomicrographs; all others are brightfield photomicrographs of stained cells. Bars: A-F, 100  $\mu$ M; G,H, 50  $\mu$ M.

from 10.5-dpc mesencephalon (Kilpatrick and Bartlett, 1993). The presence of serum in these latter cultures suggests cooperation of bFGF with other factors, as we report here.

It is important to remark that in our experimental conditions we noticed little cell differentiation; we believe this is due to the mitogenic action of the growth factors used. Preliminary data indicate that a large increase in the number of differentiated cells can be obtained if the growth factors are eliminated from the medium (J.S.-O., unpublished observations). Moreover, if, as has been reported in other systems (Frederiksen et al., 1988; Filipak et al., 1989; Lillien and Raff, 1990; Olson, 1992), there is an inverse relationship between proliferation and differentiation, we could interpret the decrease in the number of round colonies (presumably representative of regenerated neural precursor cells) when EGF + bFGF colonies were subcultured in EGF + bFGF (Table I) as a consequence of favoring cell differentiation. Although this is not yet proven, flat colonies observed in this experiment might represent more differentiated cells with lower proliferative capacity. This same phenomenon could also explain the lower number of colonies from the mesencephalic ventral region induced with EGF + bFGF than with either EGF or bFGF (Fig. 4). In agreement with this proposition, we observed a reduction in nestin mRNA expression in those colonies exposed to EGF + bFGF.

#### bFGF Participates in Cell Maturation

One of the most interesting observations of the present study was of the morphological differences in NF-M immunopositive cells depending on the growth factor added. NF-M-expressing cells derived from EGF colonies were small and without processes (Fig. 8B,G), whereas those from bFGF colonies subcultured in the presence of EGF showed clear neurite outgrowth (Fig. 8D). This effect was very clear when bFGF colonies were subcultured in the presence of both factors (Fig. 8F,H). These results suggest that bFGF is not only involved in cell proliferation, and perhaps in cell differentiation, but also participates in neuronal maturation; Ferrari et al. (1991) had observed similar effects on primary mesencephalic neurons. Our results also indicate that the order of action of the growth factor in a presumed single-cell precursor might have dramatic consequences on its development. It is tempting to speculate that EGF induces proliferation of more mature neural precursor cells when primary cultures have been pretreated with bFGF. Induction of dendritic outgrowth and functional maturation by bFGF have been previously observed: bFGF increases neurite extension of hippocampal (Walicke et al., 1986), ciliary ganglion (Unsiicker et al., 1987; Schmidt and Kater, 1993), cortical (Morrison et al., 1986), mesencephalic (Ferrari et al., 1989), and cerebellar granule

neurons (Hatten et al., 1988). Nevertheless, evidence indicating that EGF affects dendritic outgrowth (Morrison et al., 1987; Rosenberg and Noble, 1989) suggests that this factor might also cooperate in the maturation phenomenon.

#### CONCLUSIONS

We have found that neural precursor cells can be expanded by the action of mitogenic or survival factors. Our data, as well as those from others, show that classical mitogenic growth factors participate in neural maturation. Interestingly, diverse growth factors can produce similar effects on proliferation and maturation of neural precursor cells, but qualitative and mechanistic differences can also be observed. Since growth factors have different roles during the differentiation process, it would be important to determine if their effect on neural maturation is independent of cell proliferation by analyzing their activity in the presence of cell division inhibitors. The ability to propagate precursor cells using mitogenic factors, in contrast with oncogene-derived cell lines, might represent a better alternative for characterizing genetically unmodified neural precursor cells and their progeny.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr. José Segovia, Dr. Arturo Liévano, and the members of our group for their careful and critical reading of this manuscript, Elizabeth Mata and Sergio González for their technical assistance, and Mrs. Magda Miranda for her helpful secretarial work. This work was partially supported by PAPIID/DGAPA/UNAM (IN201991), PADEP/UNAM (030364, 030313) and PNUD (MEX/93/019).

#### REFERENCES

- Aloe L, Levi-Montalcini R (1979): Nerve growth factor-induced transformation of immature chromaffin cells in vivo into sympathetic neurons, effect of antiserum to nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 76:1246-1250.
- Anchan RM, Reh TA, Angello J, Balliet A, Walker M (1991): EGF and TGF- $\alpha$  stimulate retinal neuroepithelial cell proliferation in vitro. *Neuron* 6:923-936.
- Balcarek JM, Cowan NJ (1985): Structure of the mouse glial fibrillary acidic protein gene: Implications for the evolution of the intermediate filament multigene family. *Nucleic Acids Res* 13:5527-5543.
- Barde, Y-A (1989): Trophic factors and neuronal survival. *Neuron* 2:1525-1534.
- Birren SJ, Anderson DJ (1990): A v-myc-immortalized sympathoadrenal progenitor cell line in which neuronal differentiation is initiated by FGF but not NGF. *Neuron* 4:189-201.
- Casper D, Mytilineou C, Blum M (1991): EGF enhances the survival of dopamine neurons in rat embryonic mesencephalon primary cell culture. *J Neurosci Res* 30:372-381.



- Cattaneo E, McKay R (1990): Proliferation and differentiation of neuronal stem cells regulated by nerve growth factor. *Nature* 347:762-765.
- Cepko CL (1988): immortalization of neural cells via oncogene transduction. *Trends Neurosci* 11:6-8.
- Chomczynski P, Sacchi N (1987): Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162:156-159.
- Drago J, Murphy M, Carroll SM, Harvey RP, Bartlett PF (1991): Fibroblast growth factor-mediated proliferation of central nervous system precursors depends on endogenous production of insulin-like growth factor I. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:2199-2203.
- Ferrari G, Minozzi MC, Toffano G, Leon A, Skaper SD (1989): Basic fibroblast growth factor promotes the survival and development of mesencephalic neurons in culture. *Dev Biol* 133:140-147.
- Ferrari G, Toffano G, Skaper SD (1991): Epidermal growth factor exerts neurotrophic effects on dopaminergic and GABAergic CNS neurons: Comparison with basic fibroblast growth factor. *J Neurosci Res* 30:493-497.
- Filipak M, Estervig DN, Tzen C-Y, Minoo P, Hoerl BJ, Maereklein PB, Zschunke MA, Edens M, Scott RE (1989): Integrated control of proliferation and differentiation of mesenchymal stem cells. *Exp Health Perspect* 80:117-125.
- Frederiksen K, Jat PS, Valtz N, Levy D, McKay R (1988): immortalization of precursor cells from mammalian CNS. *Neuron* 1:439-448.
- Gan BS, Hollenberg MD, MacCannell KL, Lederis K, Winkler ME, Derynck R (1987): Distinct vascular actions of epidermal growth factor-urogastrone and transforming growth factor- $\alpha$ . *J Pharmacol Exp Ther* 242:331-337.
- Hatten ME, Lynch M, Rydel RE, Sanchez J, Joseph-Silverstein J, Moscatelli D, Rifkin DB (1988): In vitro neurite extension by granule neurons is dependent upon astroglial-derived fibroblast growth factor. *Dev Biol* 125:280-289.
- Ibbotson KJ, Harrod J, Gowen M, D'Souza S, Smith DD, Winkler ME, Derynck R, Mundy GR (1986): Human recombinant transforming growth factor  $\alpha$  stimulates bone resorption and inhibits formation in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:2228-2232.
- Kilpatrick TJ, Bartlett PF (1993): Cloning and growth of multipotential neural precursors: Requirements for proliferation and differentiation. *Neuron* 10:255-265.
- Korsching S (1993): The neurotrophic factor concept: A reexamination. *J Neurosci* 13:2739-2748.
- Lauder J, Wilkie MB, Lieth E, Han V (1989): Dissociated cell culture and morphochemistry of monoamine neurons. Shahar A, de Vellis J, Vernadakis A, Haber B (eds): "A Dissection and Tissue Culture Manual of the Nervous System." New York: Alan R. Liss, Inc., pp 233-239.
- Lendahl U, Zimmerman LB, McKay RDG (1990): CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell* 60:585-595.
- Levy E, Liem RKH, D'Eustachio P, Cowan NJ (1987): Structure and evolutionary origin of the gene encoding mouse NF-M, the middle-molecular-mass neurofilament protein. *Eur J Biochem* 166:71-77.
- Lillien LE, Raff MC (1990): Differentiation signals in the CNS: Type-2 astrocyte development in vitro as model system. *Neuron* 5:111-119.
- Mayer E, Dunnett SB, Fawcett JW (1993): Mitogenic effect of basic fibroblast growth factor on embryonic ventral mesencephalic dopaminergic neuron precursors. *Dev Brain Res* 72:253-258.
- Melton DW, Konecki DS, Brennan J, Caskey CT (1984): Structure, expression and mutation of the hypoxanthine phosphoribosyltransferase gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 81:2147-2151.
- Morrison RS, Sharma A, de Vellis J, Bradshaw RA (1986): Basic fibroblast growth factor supports the survival of cerebral cortical neurons in primary culture. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:7537-7541.
- Morrison RS, Kornblum HI, Leslie FM, Bradshaw RA (1987): Trophic stimulation of cultured neurons from neonatal rat brain by epidermal growth factor. *Science* 238:72-74.
- Murphy M, Drago J, Bartlett PF (1990): Fibroblast growth factor stimulates the proliferation and differentiation of neural precursor cells in vitro. *J Neurosci Res* 25:463-475.
- Mytilineou C, Park TH, Shen J (1992): Epidermal growth factor-induced survival and proliferation of neuronal precursor cells from embryonic rat mesencephalon. *Neurosci Lett* 135:62-66.
- Olson EN (1992): Interplay between proliferation and differentiation within the myogenic lineage. *Dev Biol* 154:261-272.
- Patterson PH (1992): The emerging neurotrophic cytokine family: First CDF/LIF, CNTF and IL-6: next ONC, MGF, GCSF? *Curr Opin Neurobiol* 2:94-97.
- Patterson PH, Nawa H (1993): Neuronal differentiation factors/cytokines and synaptic plasticity. *Cell* 10:123-137.
- Reynolds BA, Weiss S (1992): Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science* 255:1707-1710.
- Reynolds BA, Tetzlaff W, Weiss S (1992): A multipotent EGF-responsive striatal embryonic progenitor cell produces neurons and astrocytes. *J Neurosci* 12:4565-4574.
- Rosenberg A, Noble EP (1989): EGF-induced neuritegenesis and correlated synthesis of plasma membrane gangliosides in cultured embryonic chick CNS neurons. *J Neurosci Res* 24:531-536.
- Ryder EF, Snyder EY, Cepko CL (1989): Establishment and characterization of multipotent neural cell lines using retrovirus vector-mediated oncogene transfer. *J Neurobiol* 21:356-375.
- Schmidt MF, Kater SB (1993): Fibroblast growth factors, depolarization, and substratum interact in a combinatorial way to promote neuronal survival. *Dev Biol* 158:228-237.
- Schreiber AB, Winkler ME, Derynck R (1986): Transforming growth factor- $\alpha$ : A more potent angiogenic mediator than epidermal growth factor. *Science* 232:1250-1253.
- Schubert D (1992): Synergistic interactions between transforming growth factor beta and fibroblast growth factor regulate Schwann cell mitosis. *J Neurobiol* 23:143-148.
- Turner DL, Snyder EY, Cepko CL (1990): Lineage-independent determination of cell type in the embryonic mouse retina. *Neuron* 4:833-845.
- Unsicker K, Reichert-Preibsch H, Schmidt R, Pettmann B, Labourdette G, Sensenbrenner M (1987): Astroglial and fibroblast growth factors have neurotrophic functions for cultured peripheral and central nervous system neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:5459-5463.
- Vescovi AL, Reynolds BA, Fraser DD, Weiss S (1993): bFGF regulates the proliferative fate of unipotent (neuronal) and bipotent (neuronal/astroglial) EGF-generated CNS progenitor cells. *Neuron* 11:951-966.
- Wallicke P, Cowan WM, Ueno CN, Baird A, Guillemain R (1986): Fibroblast growth factor promotes survival of dissociated hippocampal neurons and enhances neurite extension. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:3012-3016.
- Winkler ME, O'Connor L, Winget M, Fendly B (1989): Epidermal growth factor and transforming growth factor  $\alpha$  bind differently to the epidermal growth factor receptor. *Biochemistry* 28:6373-6378.

NeuroReport 6, 2394-2398 (1995)

We investigated how several factors influence the catecholaminergic phenotype establishment from embryonic mesencephalic neural precursors in culture. Using a semiquantitative RT-PCR procedure we found no significant effect of several growth factors or conditioned media on tyrosine hydroxylase (TH) mRNA levels. Nevertheless, neural precursor cells expanded by epidermal growth factor (EGF) and basic fibroblast growth factor (bFGF) showed the ability to express TH mRNA. Subcultures of EGF expanded neural precursor cells expressed TH mRNA, but not all individual secondary colonies obtained had this characteristic. Preferential dopaminergic differentiation was observed in our culture conditions. Our results suggest that EGF stimulates the proliferation of neural precursor cells that have the potential but differentiate randomly to catecholaminergic cells.

**Key words:** Catecholaminergic differentiation; Tyrosine hydroxylase; Neural precursor; Growth factors

## Random catecholaminergic differentiation of mesencephalic neural precursors

Jesús Santa-Olalla and  
Luis Covarrubias<sup>CA</sup>

Departamento de Genética y Fisiología Molecular, Instituto de Biotecnología, UNAM, Apdo. Postal 510-3, Cuernavaca, Mor. 62271, México

<sup>CA</sup>Corresponding Author

### Introduction

The mechanisms by which embryonic neural cells become committed to a specific fate and acquire their mature phenotype must involve intrinsic properties of precursors cells as well as environmental cues along their migration pathway. In relation to the latter, increasing evidence has shown that growth factors are important elements of the extracellular fluid clearly influencing the establishment of specific phenotypes. A classical example is the effect of the cholinergic differentiation factor on sympathetic neurones.<sup>1</sup> This growth factor acts instructively to conduct cell differentiation to the cholinergic phenotype. On the other hand, nerve growth factor (NGF), a typical survival factor in the nervous system, may act by preferentially selecting the central cholinergic neurones in culture.<sup>2,3</sup>

The role of a multitude of environmental factors on the establishment of the catecholaminergic phenotype has initially been inferred by the action of diverse conditioned media.<sup>4,5</sup> Basic fibroblast growth factor (bFGF), epidermal growth factor (EGF), insulin-like growth factor-I (IGF-I), brain derived neurotrophic factor (BDNF), transforming growth factor- $\alpha$  (TGF- $\alpha$ ) and interleukin-6 (IL-6) are able to stimulate the maturation of dopaminergic cells, as determined by their ability to increase the uptake of dopamine or number of tyrosine hydroxylase-immunopositive cells. Among those, bFGF, IL-6 and BDNF increase the survival of the TH-immunopositive cells and may act preferentially on the dopaminergic cells of the mesencephalon.<sup>6-9</sup> EGF, TGF- $\alpha$  and IGF-I are

probably early effectors acting on neural precursor cells as mitogenic and/or survival factors.<sup>10-13</sup> More recently a glial derived neurotrophic factor (GDNF), member of the transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) family, has been described, which could be a specific survival factor of dopaminergic neurones in the mesencephalon.<sup>14</sup>

Here we report that expression of TH mRNA, the earliest marker of the catecholaminergic lineage, did not change significantly in primary cells from the embryonic mesencephalon after culture with diverse growth factors (EGF, bFGF, TGF- $\beta$ , NGF) and conditioned media. However, most of the individual colonies formed in response to either EGF or bFGF, representing precursor cells,<sup>15</sup> expressed TH mRNA. Pools of EGF-derived secondary colonies also expressed TH mRNA but, when analysed individually, this was the case only for a subset of colonies. In our culture conditions, mRNAs scoding for enzymes involved in the synthesis of dopamine but not of epinephrine or norepinephrine were expressed. Therefore, mesencephalic neural precursor cells expanded with EGF have the potential to differentiate in the catecholaminergic lineage but this process is random suggesting an important role of selective signals.

### Materials and Methods

**Cell cultures:** The procedure for obtaining embryonic mesencephalic cell suspension was as described by Lauder *et al.*<sup>15,16</sup> A total of  $2.5 \times 10^5$  cells were cultured in 16 mm diameter wells precoated with

poly-D-lysine ( $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) and 0.5 ml of serum-free medium [high-glucose Dulbecco's modified Eagle medium (D-MEM) and Ham's F12 (1:1 v/v) supplemented with glutamine ( $0.2192 \text{ mg ml}^{-1}$ ), penicillin-streptomycin ( $0.5 \text{ U ml}^{-1}$  and  $0.5 \mu\text{g ml}^{-1}$ , respectively), insulin ( $25 \mu\text{g ml}^{-1}$ ), transferrin ( $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ ), putrescine ( $60 \mu\text{M}$ ), progesterone ( $20 \text{ nM}$ ) and selenium ( $30 \text{ nM}$ )]. Cultures were maintained at  $37^\circ\text{C}$  in a humidified 5%  $\text{CO}_2$ -95% atmospheric air. Growth factors were added 1 h after seeding. All growth factors were purchased from GIBCO-BRL (Grand Island, NY).

**RNA purification, cDNA synthesis and polymerase chain reaction (PCR) procedure:** RNA was purified from cultures using a modified version of the method published by Chomczynski and Sacchi.<sup>15,17</sup> The RNA was resuspended in  $20 \mu\text{l}$  of water and  $10 \mu\text{l}$  were used for cDNA synthesis using M-MLV reverse transcriptase (BRL) in  $30 \mu\text{l}$  final reaction volume according to the manufacturer's recommendations. Routinely  $6 \mu\text{l}$  of cDNA reaction were used in a PCR reaction containing 2.5 U Taq DNA polymerase (Boehringer-Mannheim),  $200 \mu\text{M}$  deoxyribonucleoside-5'-triphosphates,  $1.86 \text{ mM}$   $\text{MgCl}_2$ , in the buffer provided and  $30 \text{ pmol}$  each of forward and reverse primers. All the reactions were carried out in a programmable heating block (Hybaid). The PCR protocols were: for hypoxanthine phosphoribosyl transferase (HPRT; a housekeeping enzyme), phenylethanolamine-N-methyltransferase (PNMT), nestin and tyrosine hydroxylase (TH),  $95^\circ\text{C}$  1 min,  $57^\circ\text{C}$  1 min,  $72^\circ\text{C}$  1 min, 35 cycles; for neurofilament M (NF-M), glial fibrillary acidic protein (GFAP):  $95^\circ\text{C}$  1 min,  $67^\circ\text{C}$  1 min,  $72^\circ\text{C}$  1 min, 35 cycles; for DOPA decarboxylase (DDC),  $95^\circ\text{C}$  1 min,  $66^\circ\text{C}$  1 min,  $72^\circ\text{C}$  1 min, 35 cycles; for dopamine- $\beta$ -hydroxylase,  $95^\circ\text{C}$  1 min,  $62^\circ\text{C}$  1 min,  $72^\circ\text{C}$  1 min, 35 cycles; in all cases, PCR ended with 10 min at  $72^\circ\text{C}$ . Oligonucleotide primers were: HPRT: forward CCTGCTGGATTACAT-TAAAGCACTG, reverse GTCAAGGGCATATC-CAACAACAAAC; NF-M: forward GCCGAG-CAGAACAAGGAGGCCATT, reverse CTGGA-TGGTGTC(intron)CTGGTAGCTGCT; GFAP: forward TTGCAGACCTCACAGACGCTGCCGT, reverse CGGTTTTCTTCGCCCTCCAGCAAT; nestin: forward CTACCAGGAGCGCGTGGCT-CACAT, reverse GGCTTCCACAGCCAGCTG-GAACTT; TH: forward TACGCCACGCTGAAG-GGCCTCTAT, reverse AGGTGAGGAGGCAT-GACGGATGTA; DDC: forward TGAATGGC-GTGGAGTTTGCAGATT, reverse GGCGTAC-CAGGGACTCAAACCTCA; PNMT: forward GTCGGGACGGGTTCTCATTGAT, reverse AGTTCCCAGGGGCTGGGGCTT; DBH: forward TTGTGTTGACCGGCTACTGCACAGA, reverse CTCACCTGCTGAACCTGTTTACCATGT.

All PCR products were of the expected size and their identity was confirmed by digestion with several restriction endonucleases.

**Southern blot hybridization:** TH RT-PCR products were separated by electrophoresis on a 3% agarose gel and blotted to a nylon membrane (Hybond-N<sup>+</sup>; Amersham) in alkali ( $0.4 \text{ M}$  NaOH). The membrane was prehybridized for 4 h in a solution containing 50% formamide,  $5\times \text{SSC}$  ( $1\times \text{SSC} = 150 \text{ mM}$  NaCl and  $15 \text{ mM}$  sodium citrate, pH 7.0),  $5\times$  Denhardt's solution ( $1\times$  Denhardt's solution = 0.02% Ficoll, 0.02% polyvinylpyrrolidone and 0.02% bovine serum albumin),  $50 \text{ mM}$  phosphate buffer pH 7.0, 1% glycine and  $0.25 \text{ mg ml}^{-1}$  sonicated salmon sperm DNA at  $42^\circ\text{C}$ . The  $^{32}\text{P}$ -labelled TH-cDNA ( $1 \times 10^6 \text{ cpm ng}^{-1}$ ) was added ( $9 \times 10^6 \text{ cpm ml}^{-1}$  in prehybridization solution) and hybridized overnight at  $42^\circ\text{C}$ . The membrane was washed twice for 15 min each with  $2\times \text{SSC}$ , 0.1% sodium dodecyl sulphate (SDS) at  $42^\circ\text{C}$ , followed by three times for 10 min each with  $0.1\times \text{SSC}$  and 0.1% SDS at  $55^\circ\text{C}$  and finishing with one 10 min wash with  $0.1\times \text{SSC}$  and 0.1% SDS at  $62^\circ\text{C}$ . After drying, the membrane was autoradiographed for 4 h.

## Results

Since TH is the first and limiting enzyme in the synthesis of all catecholamines, expression of the gene coding for this enzyme can be used as the earliest indicative of catecholaminergic cell differentiation. Accordingly, using RT-PCR we have been able to detect TH mRNA in the developing mouse mesencephalon as early as 10.5 days post coitus (p.c.) when TH protein is undetectable by immunohistochemistry (J. Santa-Olalla, unpublished results). Looking for factors involved in establishing the catecholaminergic phenotype, we assayed the effect of several factors on TH mRNA as indication of increase in either levels of specific mRNA itself or number of expressing cells. For this, embryonic (13.5 days p.c.) mesencephalic were seeded and cultured in serum-free medium or, in the continuous presence of EGF, bFGF, NGF, TGF- $\beta$  or conditioned media from different sources (embryonic telencephalon, diencephalon,

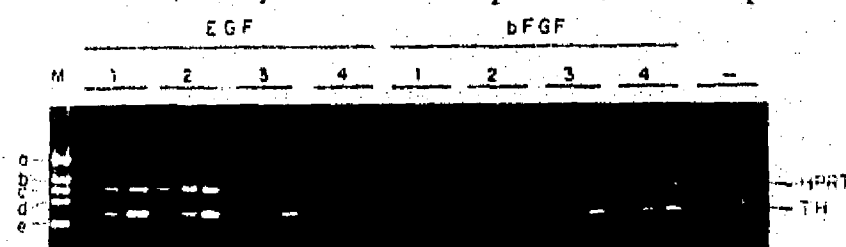


FIG. 1. TH-mRNA expression in primary colonies derived from precursor cells. Four colonies from a primary cell culture generated under the presence of EGF or bFGF, were selected after 8 days in culture and a simultaneous RT-PCR procedure performed for HPRT and TH; aliquots were taken after 30, 35 and 40 cycles. M (pBR322 HinfI): a = 517 and 506 bp; b = 296 bp; c = 344 bp; d = 298 bp; e = 221 and 200 bp.

mesencephalon, metencephalon/myelencephalon). Only slight differences were observed among the different conditions assayed (data not shown) indicating that the factors tested are not determinant in defining the catecholaminergic phenotype.

Nevertheless, we have demonstrated that EGF, TGF- $\alpha$  and bFGF but not NGF or TGF- $\beta$  induce colony formation from neural precursor cells.<sup>15</sup> These colonies, apparently of clonal origin, grow on top of the primary cell monolayer with spherical morphology and have self-renewal properties. In addition, secondary colonies express neurone and astrocyte markers as well as nestin, an intermediate filament protein expressed in neural precursor cells. Because in low density cultures of embryonic mesencephalon, EGF and bFGF increase the number of TH immunopositive cells,<sup>6,10</sup> we decided to analyse whether the cells derived from these precursors expressed TH mRNA. Individual intact primary colonies were picked and total RNA extracted. Specific RT-PCR performed on these samples showed expression of TH in all four EGF-derived colonies and in two of four (50%) derived from bFGF cultures (Fig. 1).

Since the primary colonies analysed could be contaminated with TH producing neurones from the cell monolayer, carried when they were picked, we decided to analyse secondary colonies. A single colony obtained with EGF (bFGF colonies could not be analysed in this way since they do not grow in subcultures<sup>15</sup>) was transferred to a new dish and cultured in the presence of EGF for 15 days. Under these conditions new colonies with morphology similar to the parent arise (i.e. secondary colonies; Fig. 2A). The primary colony and four secondary colonies were taken, total RNA extracted and TH mRNA analysed by RT-PCR. Figure 2B shows that, although in the parent colony TH mRNA was not detected, three of the four secondary colonies analysed expressed this mRNA; a proportion of tertiary colonies also expressed TH mRNA (data not shown). Therefore EGF induced the proliferation of neural precursor cells which have the capacity to differentiate to the catecholaminergic phenotype.

To confirm these data, we dispersed individual primary colonies generated with EGF and subcultured them in the presence of the growth factor. Each subculture gave rise to approximately 20 secondary colonies. TH mRNA was evaluated in pool of secondary colonies (all coming from one individual primary colony) or in individual secondary colonies. In this case, RT-PCR was performed and the DNA product transferred to a membrane filter and hybridized to a specific cDNA probe. Figure 3A shows that all subcultured primary colonies were able to generate cells that expressed TH mRNA, however, in agreement with the transfer experiment described

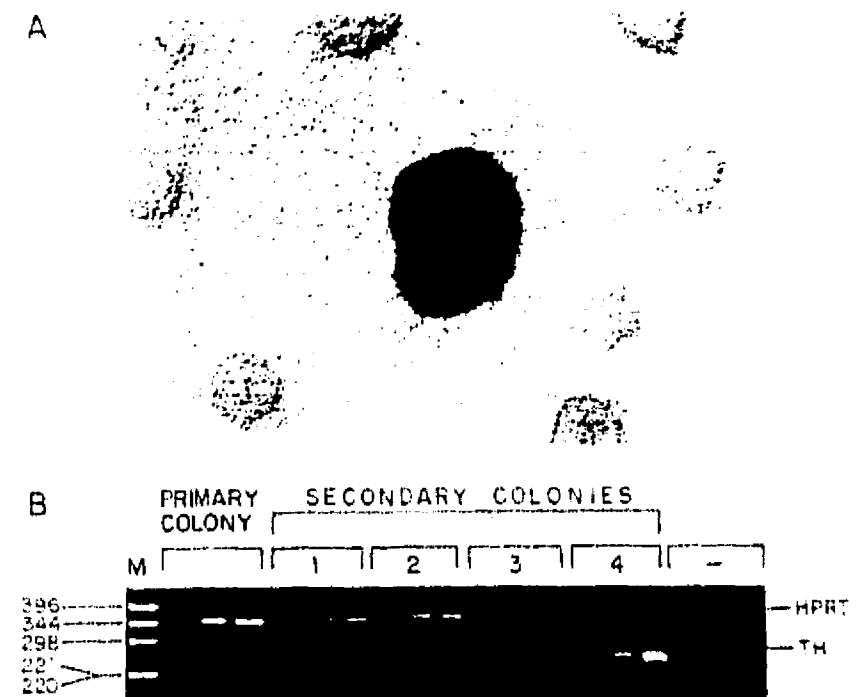


FIG. 2. TH mRNA expression in secondary colonies generated from a single primary colony treated with EGF. One colony obtained with EGF was transferred and cultured in the presence of 100 ng/ml EGF. Fourteen days later, 7 new colonies were generated (A). The primary colony (the biggest) and four secondary colonies were analysed with simultaneous RT-PCR procedure for HPRT and TH. Samples at 30, 35 and 40 cycles are shown (B); M = pBR322 *Hinf*.

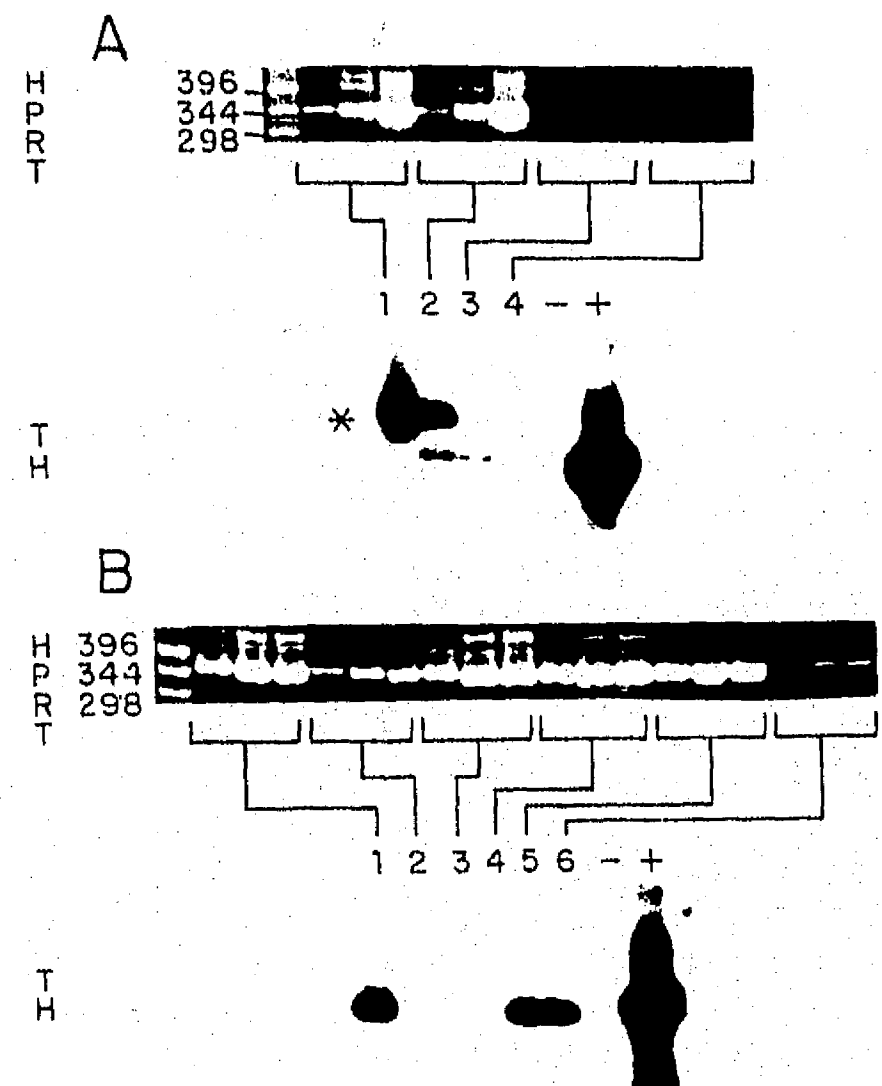


FIG. 3. TH mRNA expression in pools and individual EGF-derived secondary colonies. Primary EGF-derived colonies were dispersed and subcultured in the presence of 100 ng ml<sup>-1</sup> EGF for 11 days. (A) Secondary colonies analysed in pools (from primary colonies 1-4). RT-PCR products shown for HPRT were after 25, 30 and 35 cycles and, for TH after 35 cycles. (B) Secondary colonies analysed individually (1-6). RT-PCR products shown for HPRT were after 30, 35 and 40 cycles and, for TH 40 cycles. TH RT-PCR product was transferred to a nylon membrane and hybridized to a specific probe as described in Materials and Methods. \*PCR product from contaminating genomic DNA.

**Table 1. Neural and catecholaminergic markers in in vivo and in vitro embryonic mesencephalic cells**

Markers	Embryonic Mesencephalon (13.5 d.p.c)	Primary cell culture (8 days)	Neural precursor cell subculture EGF/EGF	
			1	2
HPRT	+++	+++	++++	++++
NESTIN	++	- <sup>a</sup>	+++	++
NF-M	+++	++	+++	++
GFAP	+/-	- <sup>a</sup>	+	-
TH	+++	++	++	+
DDC	++	+++	++	++
DBH <sup>b</sup>	-	-	-	-
PNMT	+++	+	-	-

RT-PCR was performed for all markers shown. Levels of expression are relative to those found for HPRT. <sup>a</sup>Primary cultures in the presence of serum showed high levels of GFAP and nestin mRNA expression. <sup>b</sup>Specific PCR product for this marker was obtained with RNA samples from suprarenal and adult brain.

above, not all individual secondary colonies expressed TH mRNA (50%; Fig. 3B).

DDC and DBH activity<sup>18</sup> and PNMT protein<sup>19</sup> have been detected in the embryonic brain stem. Using RT-PCR, we did not detect DBH mRNA but detected mRNA DDC and PNMT mRNAs in 13.5 day p.c. embryonic mesencephalon. In primary cell cultures of this tissue, we observed a significant decrease in PNMT and a slight increase in DDC mRNA (Table 1). Pools of secondary colonies did not express DBH and PNMT specific mRNAs but they expressed DDC mRNA (Table 1). These results suggest that the catecholaminergic neurones originated in our cultures are mainly of the dopaminergic phenotype.

## Discussion

The control of cell differentiation during development involves dynamic events that eventually establish the expression of molecules conferring specific functions to each generated cell. In the last few years experimental evidence has emphasized the strength of the environment in defining a specific cell phenotype. We are interested in understanding the mechanisms by which growth factors influence specific neuronal phenotypes of the central nervous system. The catecholaminergic lineage is an attractive system since the influence of several growth factors has been determined. Using a semiquantitative RT-PCR, we were not able to see a significant effect of several growth factors (EGF, bFGF, NGF, TGF- $\beta$ ) or conditioned media on the levels of TH mRNA in primary mesencephalic cell cultures of 13.5 day p.c. embryos.

Lack of obvious increase in TH mRNA described above could be due to the pleiotropic effect of these

growth factors on different lineages, obscuring the specific effect on the catecholaminergic phenotype. Alternatively, EGF and bFGF, both with mitogenic activity in our cultures, could induce the proliferation of non-committed precursor cells. To test this latter hypothesis, we analysed the fate of precursor cells expanded by the action of EGF and bFGF. Specifically, we determined whether TH mRNA was expressed by these cells as indicative of their capacity to produce catecholaminergic neurones. Our results show that EGF and bFGF stimulated proliferation of neural precursor cells which have the ability to differentiate to catecholaminergic cells (i.e. TH mRNA-expressing cells). Previous reports have shown that EGF and bFGF act positively on dopaminergic and/or TH-expressing neurones. EGF effects have been related to an increase in cell proliferation, although other reports have described them as a consequence of increased survival.<sup>10,11</sup> bFGF, on the other hand, has mainly been associated with dopaminergic cell survival.<sup>6,7,20</sup> We propose that at least for EGF, and probably for bFGF, the effect is not specific for catecholaminergic neurones but rather for precursors cells which have the potential to differentiate to this phenotype among others. This interpretation is based on the low level of TH mRNA expression in secondary cultures, and the limited number of individual secondary colonies generated in the presence of EGF which expressed TH mRNA, both implying that other phenotypes are represented in our cultures, including the undifferentiated state. Alternatively, TH-expressing cells could be dedifferentiating; however, positive effects of EGF and bFGF on catecholaminergic neurones is against this hypothesis.

During development DDC, DBH, and PNMT are expressed earlier than TH.<sup>8,19</sup> Therefore, the establishment of specific catecholaminergic phenotypes depend, first, on the expression of TH and, second, on the repression of a set of genes which will define the neurotransmitter to be synthesized. Since DDC mRNA was maintained, DBH mRNA not present and PNMT mRNA expression reduced to undetectable levels in our culture conditions, dopaminergic differentiation seems to be favoured. This could be due to the absence of positive regulators required for the expression of DBH and to the presence of negative pathways turning off PNMT. Another possibility is that the mesencephalic precursor cells identified here are already committed to the dopaminergic phenotype, in which case, this decision is taken before TH is expressed. In any case the fact that the mRNAs of enzymes involved in the synthesis of dopamine but not those associated to that of adrenaline are produced in our system indicates that our studies can be extended specifically to the dopaminergic phenotype.

## Conclusion

Under permissive conditions, two general mechanisms could explain the action of extracellular factors on cell differentiation. The extracellular factor could influence instructively a cell defining its final fate. Alternatively, the extracellular factor could select a specific population of cells among those produced randomly from a cell progenitor. Our results suggest that EGF is inducing the proliferation of precursor cells which are stochastically differentiating to several (i.e. more than the catecholaminergic) phenotypes in our culture conditions. Therefore, we propose that selective signals have a major role in the early differentiation of catecholaminergic neurones. The system described here will be an important tool to study the specific survival factors acting on cells along the catecholaminergic lineage. Among candidate factors to be assayed are GDNF, BDNF and IGF-1 which have shown important effects in primary cell cultures.<sup>12,14</sup>

## References

1. Patterson PH and Nawa H. *Cell* 10, 123-137 (1993).
2. Barde Y-A. *Neuron* 2, 1525-1534 (1989).
3. Lorenzi MV, Knusel B, Hefti F *et al. Neurosci Lett* 140, 185-188 (1992).
4. Tomozawa Y and Appel S. *Brain Res* 399, 111-124 (1986).
5. O'Malley EK, Sieber B-A, Black IB *et al. Brain Res* 582, 65-70 (1992).
6. Mayer E, Dunnett SB and Fawcett JW. *Dev Brain Res* 72, 253-258 (1993).
7. Ferrari G, Minozzi M-C, Toffano G *et al. Dev Biol* 133, 140-147 (1989).
8. Hyman C, Hofer M, Barde Y-A *et al. Nature* 350, 230-232 (1991).
9. Hama T, Kushima Y, Miyamoto M *et al. Neuroscience* 40, 445-452 (1991).
10. Casper D, Mytilineou C and Blum M. *J Neurosci Res* 30, 372-381 (1991).
11. Ferrari G, Toffano G and Skaper SD. *J Neurosci Res* 30, 493-497 (1991).
12. Beck KD, Knusel B and Hefti F. *Neuroscience* 52, 855-866 (1993).
13. Alexi T and Hefti F. *Neuroscience* 55, 903-918 (1993).
14. Lin L-FH, Doherty DH, Lile JD *et al. Science* 260, 1130-1132 (1993).
15. Santa-Olalla J and Covarrubias L. *J. Neurosci Res* In press (1995).
16. Lauder J, Wilkie MB, Lieth E *et al. Dissociated cell culture and morphochemistry of monoamine neurons*. In: Shahar A, De Vellis J, Vernadakis A *et al. eds. A Dissection and Tissue Culture Manual of the Nervous System*. New York: Liss, 1989: 233-239.

**ACKNOWLEDGEMENTS:** We thank Dr Jean Louis Charli and Dr Lorenzo Segovia for critically reading the manuscript, Elizabeth Mata, Sergio González and Sonia Rojas for their technical assistance, Dr DM Chicarishi for the TH cDNA and Mrs Magda Miranda for their helpful secretary work. This work was partially supported by PAPIID/DGAPA/UNAM (#IN201991) and CONACyT.

Received 29 June 1995;  
resubmitted 21 August 1995;  
accepted 30 August 1995

## X) DISCUSION Y PERSPECTIVAS.

Actualmente se han documentado múltiples efectos de factores de crecimiento sobre la diferenciación o maduración neuronal (ver Capítulos V y VI). Asimismo, se han acumulado evidencias en las cuales se demuestra que los factores de crecimiento favorecen la proliferación y/o sobrevivencia de precursores neurales, y otros presentan la capacidad de proveer señales instructivas y/o selectivas a precursores neurales (ver Capítulos II, Sección C; III, Secciones A y C, y IV, Sección A). En el presente trabajo se documenta, por primera vez, que EGF y bFGF modulan en forma directa la capacidad proliferativa de células precursoras del mesencéfalo que tienen el potencial a diferenciar a fenotipos específicos. La discusión particular de los resultados se realiza con detalle en los artículos que se anexan en este trabajo; en ellos se hace énfasis en distintos factores que intervienen en la respuesta de los precursores neurales del mesencéfalo a factores de crecimiento (Artículo 1) y el papel de estos sobre el establecimiento del fenotipo dopaminérgico (Artículo 2). En este apartado se discuten, por un lado, los datos aún no publicados que hacen suponer que bFGF podría, por lo menos en parte, estar mediando su efecto a través de favorecer la sobrevivencia y, por otro, los resultados que indican que los precursores neurales expandidos con los factores de crecimiento son capaces de dar origen a neuronas GABAérgicas. Finalmente, se resaltarán las características que presenta el sistema descrito, para ser utilizado como un modelo en el estudio de la diferenciación neural tanto *in vitro* como *in vivo*, así como sus posibles aplicaciones en el área clínica.

### A) Proliferación versus sobrevivencia.

En el presente trabajo, se demuestra claramente la participación de EGF y bFGF en la proliferación de precursores neurales, y se presentan datos experimentales que sugieren efectos distintos para estos. Así entonces, nuestros datos indican que EGF estimula la capacidad proliferativa de los precursores en forma directa, mientras que por otro, bFGF pudiera estar mediando la sobrevivencia de los precursores neurales y, de esta manera, permitir la proliferación.

A pesar de que se ha documentado la participación de diferentes factores de crecimiento en la proliferación de precursores en diferentes regiones del SN (Capítulo II, Sección C), no ha sido posible discernir claramente el mecanismo de acción de ellos. De los descritos, EGF es de las moléculas que consistentemente ha mostrado resultados en favor de promover la proliferación celular en el SN. En particular, existen reportes en la literatura en los que se ha demostrado que EGF estimula la incorporación de timidina tritiada o bromodeoxiuridina en células precursores del bulbo olfatorio<sup>181</sup>, mesencéfalo<sup>171</sup>, estriado<sup>201</sup> y retina<sup>6</sup>. Además, existen datos experimentales en los que se demuestra que EGF promueve sus efectos sobre fenotipos específicos a través de activar la proliferación<sup>35</sup>. Sin embargo, en la mayoría de los casos la posibilidad de favorecer la sobrevivencia por EGF de poblaciones blásticas no ha sido del todo descartada. Los resultados presentados en este trabajo sugieren el efecto directo de EGF sobre los precursores neurales del mesencéfalo, al poder regenerar colonias en subcultivos de colonias individuales a baja dilución, y que si bien su efecto proliferativo es el más probable, no podemos descartar su papel en la sobrevivencia celular.

El presente trabajo ofrece evidencias que proponen que bFGF podría estar mediando sus efectos a través de favorecer la sobrevivencia celular. Nuestra propuesta se fundamenta en los siguientes resultados. Primero, en cultivos primarios de la región dorsal, la pre-incubación con bFGF permite la formación de colonias en respuesta a EGF, y; segundo, subcultivos con solo bFGF mantienen el número de células capaces de generar colonias por EGF. De esta manera, proponemos que bFGF actúa como un cofactor que favorece la proliferación a través de mediar la sobrevivencia celular. La hipótesis anterior encuentra además fundamento en el incremento en la producción de colonias secundarias cuando se transfieren colonias derivadas de precursores en presencia de EGF + bFGF (Tabla 2, Artículo 1).

Se ha reportado que bFGF estimula la proliferación de precursores neurales del mesencéfalo<sup>173</sup>. Sin embargo, la presencia de suero en esos experimentos no descarta la posibilidad de que bFGF interactúe con otros factores que colaboran en la proliferación del precursor, que bien podría ser IGF-I<sup>56</sup>. Experimentos realizados en este trabajo con cultivos primarios, donde se muestra que insulina es necesaria para la generación de colonias parecen ir en el mismo sentido, ya que el receptor para IGF-I muestra afinidad para insulina<sup>158</sup>. Los



resultados presentados aquí, hasta el momento nos permiten postular que bFGF actúa como un factor de sobrevivencia, mientras que EGF tiene la capacidad de inducir la proliferación de estos precursores.

Existen en la literatura varios reportes en los cuales se documentan interacciones de bFGF con otros factores de crecimiento en la proliferación de diferentes tipos celulares: con TGF- $\beta$ , en la proliferación de los precursores de las células de Schwann<sup>212</sup>; con PDGF, sobre el precursor O-2A<sup>242</sup>; y con NGF ó EGF en la proliferación de precursores neurales del estriado<sup>37,46</sup>. En estas interacciones existen principalmente dos posibles mecanismos. En uno de ellos, bFGF actuaría haciendo a las células responsivas al factor proliferativo, y en otro, estimularía la sobrevivencia impidiendo que mueran las células que responden al factor proliferativo. En el caso del estriado, tanto para la interacción con NGF como con EGF, la responsividad de las células es a través de estimular la expresión del receptor de NGF o EGF por bFGF; de esta forma, bFGF es prescindible posterior a la inducción inicial del receptor, dependiendo la proliferación solo de la presencia de NGF o EGF. En el caso del precursor de la célula de Schwann, bFGF estimula debilmente la proliferación, la cual solo se incrementa en presencia de TGF- $\beta$ ; en este sistema AMPc puede substituir a TGF- $\beta$ <sup>227</sup>. El requerimiento de AMPc en este sistema para la proliferación favorecida por bFGF, indica que es posible la participación de moléculas reguladas por segundos mensajeros clásicos. Es interesante entonces que c-Fos, un factor transcripcional que participa en el control de la proliferación, puede ser activado por AMPc<sup>23</sup> y EGF<sup>74</sup>. De esta manera, a futuro será interesante analizar la función de c-FOS, para conocer factores adicionales que participen en el control de la proliferación por EGF y bFGF.

Teniendo en consideración los datos anteriores, un mecanismo alternativo para las interacciones de bFGF con EGF en el mesencéfalo dorsal, podría involucrar la activación de la expresión del receptor a EGF por bFGF. Lo anterior en vista que la célula capaz de generar la colonia de precursores obtiene la propiedad de responder solo a EGF, después de un período de estimulación previo con bFGF, de forma similar al evento descrito en precursores neurales del estriado. La modulación de la expresión del receptor de EGF no es fácil de evaluar en nuestro sistema, ya que en el cultivo primario de la región dorsal se encuentran células que responden a EGF formando una monocapa, las cuales son incapaces de generar colonias y que pudieran

contaminar la preparación. El efecto de bFGF es determinante sobre el precursor que generará la colonia, ya que no prolifera sin la exposición a este factor. De esta forma, lo que es claro es que bFGF genera una señal que permite ganar la capacidad de responder a EGF, factor que finalmente tendrá a su cargo estimular la proliferación del precursor. En este proceso una alternativa que no se puede descartar es que bFGF favorezca el paso del precursor a un estado de diferenciación más avanzado responsivo a EGF.

Recientemente, se ha incrementado el número de reportes que demuestran la existencia de precursores neurales en el SNC, que proliferan en respuesta a bFGF o EGF (ver Capítulo II, Sección C). En la corteza a los 17 d.*pc*, bFGF estimula la proliferación de precursores bipotentes, los cuales pueden dar origen a neuronas y glia, y de precursores que solo generan glia, mientras que EGF estimula precursores comprometidos al linaje glial<sup>123</sup>. En el estriado a los 14 d.*pc*, EGF favorece la proliferación de un precursor bipotente<sup>201</sup>, y bFGF regula la proliferación de precursores que generan solo neuronas o células bipotentes, presentes en la progenie de los precursores responsivos a EGF<sup>237</sup>. Lo que parece ser claro de los datos anteriores y de los obtenidos con marcaje retroviral (ver Capítulos II, Sección D y IV), es la existencia de precursores bipotentes que tienen la capacidad de dar origen a los dos principales linajes del SN, y que en ciertos momentos, coexisten con células que poseen una capacidad restringida en su potencial diferenciativo.

#### **B) Diferenciación a fenotipos terminales.**

En este trabajo se demostró que, además de que bFGF participa en el control de la proliferación de precursores neurales, también está involucrado en la maduración morfológica de las neuronas que se generan de la colonia (ver discusión del Artículo 1). También se estableció que los precursores tienen la capacidad de diferenciar al linaje dopaminérgico (ver discusión del Artículo 2). Los datos experimentales adicionales (ver resultados) muestran que los precursores neurales expandidos tienen también la capacidad de diferenciar dentro del linaje GABAérgico, sugiriendo que existen precursores neurales comunes para las neuronas catecolaminérgicas y GABAérgicas. Es interesante que a diferencia de lo observado para el fenotipo catecolaminérgico donde los factores de crecimiento probados no tuvieron efecto, bFGF si parece mejorar la

síntesis de GABA. El que este evento se encuentre presente solo en células que son generadas en subcultivos de precursores expandidos con bFGF, sugiere que los precursores que se expanden en forma inicial con este factor tienen un mayor potencial para diferenciar al linaje GABAérgico.

De especial relevancia, nuestro trabajo presenta por primera vez, datos experimentales que proponen que en el establecimiento de la capacidad de sintetizar GABA, se encuentra íntimamente relacionado con la expresión de la GAD<sub>65</sub>. Es importante destacar que hay evidencias experimentales que apoyan la posible regulación de la expresión de la GAD<sub>65</sub> por el impulso nervioso, en particular hay una correlación directa de su aparición con las etapas de sinaptogénesis en el estriado<sup>86,156</sup>. En este trabajo, se demostró que los precursores que responden a bFGF generan neuronas con una trama dendrítica más abundante (Artículo 1). Este hallazgo, permite postular que los precursores expandidos con bFGF generarían neuronas que podrían establecer sinápsis más eficientemente, lo que podría de esta forma favorecer la expresión de la GAD<sub>65</sub>, con la consiguiente síntesis de GABA. En apoyo a la relevancia de GAD<sub>65</sub>, GAD<sub>67</sub> se expresa en niveles significativos en todas las condiciones probadas, pero no se detectó GABA por HPLC. Una posible explicación para este hallazgo, es que los precursores neurales del mesencéfalo podrían sintetizar la forma truncada de la GAD<sub>67</sub>, proteína inactiva que se produce en las zonas de alta proliferación durante el desarrollo embrionario<sup>15,21</sup>. Los oligonucleótidos diseñados para detectar la GAD<sub>67</sub>, no permiten distinguir el ARNm que codifica la forma activa de GAD<sub>67</sub> del de la inactiva. En precursores de la médula espinal ha sido posible detectar por inmunocitoquímica a la GAD<sub>67</sub>, pero no fue factible hallar GABA<sup>153</sup>, lo cual concuerda con nuestros resultados. ¿Que importancia funcional tiene GAD<sub>67</sub> en los precursores neurales? y, ¿cuales son los mecanismos que regulan su actividad?, son preguntas interesantes que quedan por resolverse.

Es interesante notar que datos preliminares (Fig. IX.4) muestran que el nivel de expresión de Nestina, NF-M, DDC y GAD<sub>67</sub> se mantiene en la misma proporción independientemente de la condición de subcultivo. Así, si una colonia presenta alta o baja expresión, ese comportamiento se conserva indistintamente de la condición de subcultivo. Estos datos sugieren que el factor de crecimiento este activando la proliferación de precursores en un estadio particular de su diferenciación. De ser cierto la propuesta anterior, en principio

nuestro sistema permitiría aislar y "encadenar" los diferentes intermediarios durante la diferenciación hacia fenotipos específicos.

### C) Caracterización de precursores neurales.

#### i) In vitro

Existen dificultades técnicas para el manejo *in vitro* de los precursores del SNC, lo cual ha limitado su análisis. Regiones que experimentan neurogénesis en etapas postnatales, como el búlbo olfatorio y el cerebelo, son de las pocas regiones en las que ha habido avances en la comprensión de las interacciones que se suceden durante la neurogénesis<sup>52,78,171,193</sup>. El presente trabajo expone datos experimentales, que destacan la utilidad de los precursores expandidos con factores de crecimiento, como modelo experimental alternativo para el estudio de las diferentes respuestas generadas por células indiferenciadas del SNC. Además, este sistema no tienen los inconvenientes de las líneas inmortalizadas o tumorales empleadas hasta el momento (ver Capítulo II).

El poder contar con poblaciones celulares enriquecidas en precursores neurales, sobre las cuales se puedan manipular las condiciones de cultivo, permitirá analizar la influencia de diferentes efectores extracelulares sobre la proliferación, diferenciación y/o sobrevivencia de estas células. En forma relevante, se cuenta con dos condiciones en las cuales se podrán evaluar los factores adicionales que puedan participar en la proliferación (cultivos primarios de la región dorsal y subcultivos). Además permitirá investigar los sistemas de transducción participantes en el proceso de sobrevivencia y/o diferenciación. En forma interesante, el que se pueda dar origen a células que sintetizan enzimas involucradas en la biosíntesis de dos neurotransmisores presentes en el mesencéfalo (dopamina y GABA), abre la posibilidad de estudiar los factores que pudieran estar participando en su determinación, diferenciación y/o maduración funcional.

Durante el desarrollo es posible identificar diferentes interacciones celulares, en particular las que se dan

entre regiones que establecen contactos sinápticos. El contar con precursores de diferentes regiones, en el caso particular de este sistema, del mesencéfalo y estriado, permitirá examinar la existencia de interacciones entre poblaciones indiferenciadas. Así mismo, el simple hecho de contar con poblaciones enriquecidas de precursores neurales, abre la posibilidad de llevar a cabo el análisis de sus componentes bioquímicos y moleculares, lo cual permitirá identificar aquellos que pudieran ser empleados como marcadores, útiles para ubicar y seguir *in vivo* el desarrollo de estas células.

En vista que los precursores neurales del mesencéfalo expandidos con EGF y bFGF muestran cierta heterogeneidad, es de suma importancia obtener una clona para obtener conclusiones relevantes. En nuestro laboratorio se han realizado ensayos para su establecimiento, utilizando subcultivos o transferencia de colonias individuales. Con ambos procedimientos no ha sido posible subcultivarlas por más de 5 pases, pero se ha demostrado que la falta de un sustrato adherente incrementa la eficiencia del subcultivo. Estos resultados permitirán incrementar la eficiencia de clonación, y posiblemente la generación de una línea. Es importante destacar, que existe la posibilidad de que *per se* el sistema sea heterogéneo, al tener precursores que tienden a generar poblaciones proliferantes comprometidas. En apoyo a lo anterior, un grupo de investigación ha demostrado la coexistencia de células multipotentes (i.e. bipotente) y comprometidas (i.e. a neurona o a glia) dentro de clonas derivadas con EGF<sup>237</sup>.

ii) *In vivo*.

La caracterización *in vitro* facilita el análisis de cualquier sistema, sin embargo, siempre es necesario demostrar el comportamiento *in vivo*. Experimentos de trasplantes con líneas neuronales inmortalizadas, han demostrado que es posible incorporar precursores neurales en recién nacidos o en animales adultos y favorecer su diferenciación, e inclusive, en algunas ocasiones se han incorporado estas células en regiones distintas de la cual se originaron, sugiriendo que el entorno celular participa en forma determinante en la diferenciación neuronal (ver Capítulo II, Sección D). El trasplante de precursores neurales es de suma importancia por su posible aplicación en el área clínica; por tanto, evaluar si los precursores neurales expandidos con factores de

crecimiento diferencian adecuadamente *in vivo*, permitirá hacer más relevante su caracterización *in vitro*. En vista que durante el desarrollo se espera que haya cambios importantes en el entorno que rodea a las células, el ambiente adecuado para que los precursores neurales sobrevivan y diferencien debe darse en etapas tempranas del desarrollo. Por ello, será importante reimplantar a los precursores en la zona y el tiempo del cual fueron obtenidos. Actualmente en el laboratorio se ha establecido una técnica quirúrgica que permite proseguir el desarrollo embrionario después de la manipulación extrauterina de embriones, lo cual hará posible la reimplantación de células al mesencéfalo en desarrollo. Un aspecto interesante de evaluar es si los precursores cultivados *in vitro* mantienen su identidad posicional, y si ésta puede modificarse al ser implantados en regiones distintas a las de su origen. Dentro de los marcadores que podrían ser útiles en este sentido son Wnt, En-1 y En-2.

#### **D) Utilidad clínica de células precursoras.**

Uno de los problemas que está recibiendo mucha atención son los procesos moleculares, y celulares que participan en las enfermedades degenerativas del SN. Algunas de estas patologías se han relacionado con la disfunción o pérdida de fenotipos específicos (colinérgico en la Enfermedad de Alzheimer, dopaminérgico en la de Parkinson, GABAérgico en la de Huntington). El identificar los factores que participan en la diferenciación o sobrevivencia de estas poblaciones permitirá a futuro el diseño de nuevas alternativas terapéuticas. En este sentido, se ha documentado que el NGF participa en el control de la sobrevivencia del fenotipo colinérgico, lo cual ha fundamentado el diseño de múltiples estrategias para evitar la degeneración de las neuronas colinérgicas, entre las que destacan implantes de líneas que sintetizan NGF<sup>48</sup>. En vista que los precursores neurales han demostrado integrarse adecuadamente en los sitios de implantación, podrían ser utilizados como vectores de expresión, al favorecerse su integración al sitio del trasplante de una manera más natural. El conocer que factores participan en la diferenciación o sobrevivencia de fenotipos como el dopaminérgico o GABAérgico, permitirá establecer que factores pudieran ser aplicados a pacientes con enfermedades como la de Parkinson o la de Huntington.

En algunos casos, para reemplazar a las poblaciones celulares degeneradas, se ha empleado tejido embrionario; sin embargo, pero su utilización se ha visto limitada por requerirse un número importante de embriones y por razones éticas. De esta forma, si se establecen condiciones que permitan la expansión de precursores neurales, se podría solucionar los problemas inherentes a la carencia de tejido primario. Por supuesto, en este sentido será necesario una mejor caracterización de los mecanismos que controlan la proliferación y su relación con la diferenciación, dado que es necesaria la amplificación de poblaciones comprometidas a fenotipos terminales.

## REFERENCIAS

1. Adamson, E. D. and J. Meek. 1984. The ontogeny of epidermal growth factor receptors during mouse development. *Developmental Biology* 103:62-70.
2. Ahmend, S., B. A. Reynolds, and S. Weiss. 1995. BDNF enhances the differentiation but not the survival of CNS stem cell-derived neural precursors. *J. Neurosci.* 15(8):5765-5778.
3. Alderson, R. F., A. L. Alterman, Y-A. Barde, and R. M. Lindsay. 1990. Brain-derived neurotrophic factor increases survival and differentiated functions of rat septal cholinergic neurons in culture. *Neuron* 5:297-306.
4. Alexi, T. and F. Hefti. 1993. Trophic actions of transforming growth factor  $\alpha$  on mesencephalic dopaminergic neurons developing in culture. *Neuroscience* 55(4):903-918.
5. Allsopp, T. E., S. Wyatt, H. F. Paterson, and A. M. Davies. 1993. The proto-oncogene *bcl-2* can selectively rescue neurotrophic factor-dependent neurons from apoptosis. *Cell* 73:295-307.
6. Anchan, R. M., T. A. Reh, J. Angello, A. Balliet, and M. Walker. 1991. EGF and TGF- $\alpha$  stimulate retinal neuroepithelial cell proliferation in vitro. *Neuron* 6:923-936.
7. Anderson, D. J. 1989. The Neural Crest Cell Lineage Problem: Neurogenesis? *Neuron* 3:1-12.
8. Anderson, D. J. 1993. Cell fate Determination in the peripheral nervous system: The sympathoadrenal progenitor. *Journal of Neurobiology* 24(2):185-198.
9. Anderson, D. J. and R. Axel. 1986. A Bipotential Neuroendocrine Precursor Whose Choice of Cell Fate Is Determined by NGF and Glucocorticoids. *Cell* 47:1079-1090.
10. Arakawa, Y., M. Sendtner, and H. Thoenen. 1990. Survival effect of ciliary neurotrophic factor (CNTF) on chick embryonic motoneurons in culture: comparison with other neurotrophic factors and cytokines. *J. Neurosci.* 10:3507-3515.
11. Baird, A. 1994. Fibroblast growth factor: activities and significance of non-neurotrophin neurotrophic growth factors. *Current Opinion in Neurobiology* 4:78-86.
12. Barbin, G., M. Mallat, and A. Prochiantz. 1985. In vitro Studies on the Maturation of Mesencephalic Dopaminergic Neurons. *Dev. Neurosci.* 7:296-307.
13. Baroffio, A., E. Dupin, and N. M. Le Douarin. 1988. Clone-forming ability and differentiation potential of migratory neural crest cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85:5325-5329.
14. Beck, K. D., B. Knüsel, and F. Hefti. 1993. The nature of the trophic action of brain-derived neurotrophic factor, des(1-3)-insulin-like growth factor-1, and basic fibroblast growth factor on mesencephalic dopaminergic neurons developing in culture. *Neuroscience* 52(4):855-866.
15. Behar, T., W. Ma, L. Hudson, and J. L. Barker. 1994. Analysis of the anatomical distribution of GAD67 mRNA encoding truncated glutamic acid decarboxylase proteins in the embryonic rat brain. *Dev. Brain Res.* 77:77-87.
16. Bernard, O., J. Drago, and H. Sheng. 1992. L-myc and N-myc Influence Lineage Determination in the Central Nervous System. *Neuron* 9:1217-1224.
17. Bernard, O., H. H. Reid, and P. F. Bartlett. 1989. Role of the c-myc and the N-myc Proto-Oncogenes in the Immortalization of Neural Precursors. *J. Neurosci. Res.* 24:9-20.



18. Birren, S. J., L. Lo, and D. J. Anderson. 1993. Sympathetic neuroblasts undergo a developmental switch in trophic dependence. *Development* 119:597-610.
19. Birren, S. J., J. M. Verdi, and D. J. Anderson. 1992. Membrane Depolarization Induces p140trk and NGF Responsiveness, But Not p75LNGFR in MAH Cells. *Science* 257:395-397.
20. Blackwood, E. M., L. Kretzner, and R. N. Eisenman. 1992. Myc and Max function as a nucleoprotein complex. *Genes and Dev.* 2:227-235.
21. Bond, R. W., R. J. Wyborski, and D. I. Gottlieb. 1990. Developmentally regulated expression of an exon containing a stop codon in the gene for glutamic acid decarboxylase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87:8771-8775.
22. Bögl, O., D. Wren, S. C. Barnett, H. Land, and M. Noble. 1990. Cooperation between two growth factors promotes extended self-renewal and inhibits differentiation of oligodendrocyte type-2 astrocyte (O-2A) progenitor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:6368-6372.
23. Bravo, R., M. Neuber, J. Burckhardt, J. Almendral, R. Wallich, and R. Müller. 1987. Involvement of Common and Cell Type-Specific Pathways in c-fos Gene Control: Stable Induction by cAMP in Macrophages. *Cell* 48:251-260.
24. Bredesen, D. E., K. Hisanaga, and F. R. Sharp. 1990. Neural Transplantation Using Temperature-sensitive Immortalized Neural Cells: A Preliminary Report. *Ann. Neurol* 27:205-207.
25. Bronner-Fraser, M. 1993. Segregation of cell lineage in the neural crest. *Current Opinion in Genetics and Development* 3:641-647.
26. Brüstle, O., U. Maskos, and R. D. G. McKay. 1995. Host-guided migration allows targeted introduction of neurons into the embryonic brain. *Neuron* 15:1275-1285.
27. Buchkovich, K., L. A. Duffy, and E. Harlow. 1989. The retinoblastoma protein is phosphorylated during specific phases of the cell cycle. *Cell* 58:1097-1105.
28. Buchman, V. L. and A. M. Davies. 1993. Different neurotrophins are expressed and act in a developmental sequence to promote the survival of embryonic sensory neurons. *Development* 118:989-1001.
29. Buj-Bello, A., V. L. Buchman, A. Horton, A. Rosenthal, and A. M. Davies. 1995. GDNF is an age-specific survival factor for sensory and autonomic neurons. *Neuron* 15:821-828.
30. Bunone, G., M. G. Borrello, R. Picetti, I. Bongarzone, F. A. Peverali, V. de Franciscis, G. D. Valle, and M. A. Pierotti. 1995. Induction of RET proto-oncogene expression in neuroblastoma cells precedes neuronal differentiation and is not mediated by protein synthesis. *Exp. Cell Res.* 217:92-99.
31. Burgess, W. H. and T. Maciag. 1989. The heparin-binding (fibroblast) growth factor family of proteins. *Annu. Rev. Biochem.* 58:575-606.
32. Calof, A. N. 1991. Immortalized neurons derived from tumors in transgenic mice. *TINS* 14:1-3.
33. Cambi, F., B. Fung, and D. M. Chikaraishi. 1989. 5' flanking DNA sequences direct cell-specific expression of rat tyrosine hydroxylase. *Journal of Neurochemistry* 53:1656-1659.
34. Campbell, K., M. Olsson, and A. Björklund. 1995. Regional incorporation and site-specific differentiation of striatal precursors transplanted to the embryonic forebrain ventricle. *Neuron* 15:1259-1273.
35. Casper, D., C. Mytilineou, and M. Blum. 1991. EGF enhances the survival of dopamine neurons in rat embryonic mesencephalon primary cell culture. *J. Neurosc. Res.* 30:372-381.
36. Casper, D., G. J. Roboz, and M. Blum. 1994. Epidermal growth factor and basic fibroblast growth factor

- have independent actions on mesencephalic dopamine neurons in culture. *Journal of Neurochemistry* 62:2166-2177.
37. Cattaneo, E. and R. McKay. 1990. Proliferation and differentiation of neuronal stem cells regulated by nerve growth factor. *Nature* 347:762-765.
  38. Cepko, C. 1988. Retrovirus Vectors and Their Application in Neurobiology. *Neuron* 1:345-353.
  39. Charest, A., B. H. Wainer, and P. R. Albert. 1993. Cloning and differentiation-induced expression of a murine serotonin<sub>1A</sub> receptor in a septal cell line. *J. Neurosci.* 13:5164-5171.
  40. Choi, H. K., L. A. Won, P. J. Kontur, D. N. Hammond, A. P. Fox, B. H. Wainer, P. C. Hoffmann, and A. Heller. 1991. Immortalization of embryonic mesencephalic dopaminergic neurons by somatic cell fusion. *Brain Reserch* 552:67-76.
  41. Choi-Lundberg, D. L. and M. C. Bohn. 1995. Ontogeny and distribution of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) mRNA in rat. *Dev. Brain Res.* 85:80-88.
  42. Chomezynski, P. and Sacchi. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162:156-159.
  43. Chuan, C. F. and S-Y. Ng. 1994. Functional divergence of the MAP kinase pathway: ERK1 and ERK2 activate specific transcription factors. *FEBS Lett.* 346:229-234.
  44. Collins, F., L. -F. H. Lin, D. H. Doherty, J. D. Lile, and S. Bektesh. 1993. GDNH: A Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor for Midbrain Dopaminergic Neurons. *Science* 260:1130-1132.
  45. Coulon, J. F., N. Faucon Biguet, A. Cavoy, J. Delacour, J. Mallet, and J. C. David. 1990. Gene expression of tyrosine hydroxylase in the developing fetal brain. *Journal of Neurochemistry* 55:1412-1417.
  46. Cova, L., A. L. Vescovi, P. Frolichsthal, E. Liboi, M. Danova, A. Riccardi, A. Gritti, and E. A. Parati. 1994. Isolation of potential stem cell of the embryonic mouse CNS that require priming with bFGF to become responsive to EGF in vitro. *Annual Meeting Society for Neuroscience* 1:21.7.(Abstract)
  47. Crowley, C., S. D. Spencer, M. C. Nishimura, K. S. Chen, S. Pitts-Meek, M. P. Armanini, L. H. Ling, S. B. McMahon, D. L. Shelton, A. D. Levinson, and H. S. Phillips. 1994. Mice Lacking Nerve Growth Factor Display Perinatal Loss of Sensory and Sympathetic Neurons yet Develop Basal Forebrain Cholinergic Neurons. *Cell* 76:1001-1011.
  48. Cunningham, L. A., M. P. Short, U. Vielkind, X. O. Breakefield, and M. C. Bohn. 1991. Survival and differentiation within the adult mouse striatum of grafted rat pheochromocytoma cells (PC12) genetically modified to express recombinant  $\beta$ -NGF. *Exp. Neurol.* 112:174-182.
  49. Davies, A. M. 1993. Promoting motor neuron survival. *Current Biology* 3:879-881.
  50. Davis, A. A. and S. Temple. 1994. A self-renewing multipotential stem cell in embryonic rat cerebral cortex. *Nature* 372:263-266.
  51. Davis, C. A. and A. L. Joyner. 1988. Expression patterns of the homeo box-containing genes En-1 and En-2 and the proto-oncogen int-1 diverge during mouse development. *Genes & Development* 2:1736-1744.
  52. DeHamer, M. K., J. L. Guevara, K. Hannon, B. B. Olwin, and A. L. Calof. 1994. Genesis of olfactory receptor neurons in vitro: regulation of progenitor cell divisions by fibroblast growth factors. *Neuron* 13:1083-1097.
  53. DeHay, C., P. Giroud, M. Berland, I. Smart, and H. Kenedy. 1993. Modulation of the cell cycle

- contributes to the parcellation of the primate visual cortex. *Nature* 366:464-466.
54. di Porzio, U., M. -Ch. Daguét, J. Glowinski, and A. Prochiantz. 1980. Effect of striatal cells on in vitro maturation of mesencephalic dopaminergic neurones grown in serum-free conditions. *Nature* 288:370-373.
  55. DiCicco-Bloom, E., W. J. Friedman, and I. B. Black. 1993. NT-3 stimulates sympathetic neuroblast proliferation by promoting precursor survival. *Neuron* 11:1101-1111.
  56. Drago, J., M. Murphy, S. M. Carroll, R. P. Harvey, and P. F. Bartlett. 1991. Fibroblast growth factor-mediated proliferation of central nervous system precursors depends on endogenous production of insulin-like growth factor I. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:2199-2203.
  57. Eccleston, P. A. and D. H. Silberberg. 1985. Fibroblast growth factor is a mitogen for oligodendrocytes in vitro. *Dev. Brain Res.* 21:315-318.
  58. Erdö, S. L. and J. R. Wolff. 1990. t-aminobutyric acid outside the mammalian brain. *Journal of Neurochemistry* 54(2):363-372.
  59. Ericson, J., J. Muhr, M. Placzek, T. Lints, T. M. Jessell, and T. Edlund. 1995. Sonic hedgehog induce the differentiation of ventral forebrain neurons: A common signal for ventral patterning within the neural tube. *Cell* 81:747-756.
  60. Erlander, M. G., N. J. K. Tillakaratne, S. Feldblum, N. Patel, and A. J. Tobin. 1991. Two genes encode distinct glutamate decarboxylases. *Neuron* 7:91-100.
  61. Erlander, M. G. and A. J. Tobin. 1991. The structural and functional heterogeneity of glutamic acid decarboxylase: a review. *Neurochem. Res.* 16(3):215-226.
  62. Evrard, C., I. Borde, P. Marin, E. Galiana, J. Prémont, F. Gros, and P. Rouget. 1990. Immortalization of bipotential and plastic glio-neuronal precursor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87:3062-3066.
  63. Evrard, G., E. Galiana, and P. Rouget. 1988. Immortalization of Bipotential Glial Progenitors and Generation of Permanent "Blue" Cell Lines. *J. Neurosc. Res.* 21:80-87.
  64. Fallon, J. H., K. B. Seroogy, S. E. Loughlin, R. S. Morrison, R. A. Bradshaw, D. J. Knauer, and D. D. Cunningham. 1984. Epidermal growth factor immunoreactive material in the central nervous system: location and development. *Science* 224:1107-1109.
  65. Fernyhough, P., G. B. Willars, R. M. Lindsay, and D. R. Tomlinson. 1993. Insulin and insulin-like growth factor I enhance regeneration in cultured adult rat sensory neurones. *Brain Res.* 607:117-124.
  66. Ferrari, G., M. -C. Minozzi, G. Toffano, A. Leon, and S. D. Skaper. 1989. Basic fibroblast growth factor promotes the survival and development of mesencephalic neurons in culture. *Developmental Biology* 133:140-147.
  67. Ffrench-Constant, C. 1994. How the embryonic cells measure time? *Current Biology* 4:415-419.
  68. Fhiser, D. A. and J. Lakshmanan. 1990. Metabolism and effects of Epidermal Growth Factor and related growth factors in Mammals. *Endocrine Reviews* 11:418-442.
  69. Filipak, M., D. N. Estervig, C-Y. Tzen, P. Minoo, B. J. Hoerl, P. B. Maercklein, M. A. Zschunke, M. Edens, and R. E. Scott. 1989. Integrated control of proliferation and differentiation of mesenchymal stem cells. *Exp. Health. Pers.* 80:117-125.
  70. Flanders, K. C., G. Lüdecke, S. Engels, D. S. Cissel, A. B. Roberts, P. Kondaiah, R. Lafyatis, M. B. Sporns, and K. Unsicker. 1991. Localization and actions of transforming growth factor- $\beta$ s in the embryonic nervous system. *Development* 113:183-191.

71. Foster, G. A., M. Schultzberg, M. Goldstein, and T. Hokfelt. 1985. Ontogeny of phenylethanolamine n-methyltransferase and tyrosine hydroxylase-like immunoreactivity in presumptive adrenaline neurones of the foetal rat central nervous system. *J. Comp. Neurol.* 236:348-381.
72. Frederiksen, K., P. S. Jat, N. Valtz, D. Levy, and R. McKay. 1988. Immortalization of precursor cells from mammalian CNS. *Neuron* 1:439-448.
73. Frederiksen, K. and R. D. G. McKay. 1988. Proliferation and Differentiation of Rat Neuroepithelial Precursor Cells in vivo. *J. Neurosci.* 8:1144-1151.
74. Fu, X-Y. and J-J. Zhang. 1993. Transcription factor p91 interacts with the epidermal growth factor receptor and mediates activation off the c-fos gene promoter. *Cell* 74:1135-1145.
75. Fukada, K. 1985. Purification and partial characterization of a cholinergic neuronal differentiation factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:8795-8799.
76. Galileo, D. S., G. E. Gray, G. C. Owens, J. Majors, and J. R. Sanes. 1990. Neurons and glia arise from a common progenitor in chick optic tectum: demonstration with two retrovirus and cell type-specific antibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:458-462.
77. Gao, W-Q., N. Heintz, and M. E. Hatten. 1991. Cerebellar granule cell neurogenesis is regulated by cell-cell interaction in vitro. *Neuron* 6:705-715.
78. Gao, W-Q., J. L. Zheng, and M. Karihaloo. 1995. Neurotrophin-4/5 (NT-4/5) and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) act at later stage of cerebellar granule cell differentiation. *J. Neurosci.* 15:2656-2667.
79. Gao, W. -Q. and M. E. Hatten. 1994. Immortalizing oncogenes subvert the establishment of granule cell identity in developing cerebellum. *Development* 120:1059-1070.
80. Ghosh, A. and M. E. Greenberg. 1995. Distinct roles for bFGF and NT-3 in the regulation of cortical neurogenesis. *Neuron* 15:89-103.
81. Giacobini, M. M. J., S. Almstrom, K. Funa, and L. Olson. 1993. Differential effects of platelet-derived growth factor isoforms on dopamine neurons in vivo: -BB supports cell survival, -AA enhances fiber formation. *Neuroscience* 57,4:923-929.
82. Golden, G. S. 1973. Prenatal development of the biogenic amine systems of the mouse brain. *Developmental Biology* 33:300-311.
83. Goldman, J. E. 1992. Regulation of oligodendrocyte differentiation. *TINS* 10:359-362.
84. Goulding, M. D., A. Lumsden, and P. Gruss. 1993. Signal from the notochord and floor plate regulate the region-specific expression of two pax genes in the developing spinal cord. *Development* 117:1001-1016.
85. Greenlund, L. J. S., T. L. Deckweth, and E. M. Jr. Johnson. 1995. Superoxide dismutase delays neuronal apoptosis: a role for reactive oxygen species in programmed neuronal death. *Neuron* 14:303-315.
86. Greif, K. F., N. J. K. Tillakaratne, M. G. Erlander, S. Feldblum, and A. J. Tobin. 1992. transient increase in expression of glutamate decarboxylase (GAD) mRNA during the postnatal development of the rat striatum. *Developmental Biology* 153:158-164.
87. Gruss, P. and C. Walther. 1992. Pax in development. *Cell* 69:719-722.
88. Guillemot, F. and A. L. Joyner. 1993. Dynamic expression of the murine achaete-scute homolog in the developing (MASH-1) nervous system. *Mech. Dev.* 42:171-185.

89. Guillemot, F., L-C. Lo, J. E. Johnson, A. Auerbach, D. J. Anderson, and A. L. Joyner. 1993. Mammalian achaete-scute homolog 1 is required for the early development of olfactory and autonomic neurons. *Cell* 75:463-476.
90. Haffner, R. and M. Oren. 1995. Biochemical properties and biological effect of p53. *Current Opinion in Genetics and Development* 5:84-90.
91. Hama, T., Y. Kushima, M. Miyamoto, M. Kubota, N. Takei, and H. Hatanaka. 1991. Interleukin-6 improves the survival of mesencephalic catecholaminergic and septal cholinergic neurons from postnatal, two-week-old rats in culture. *Neuroscience* 40:445-452.
92. Hanaway, J., J. A. McConnell, and M. G. Netsky. 1971. Histogenesis of the substantia nigra, ventral tegmental area of Tsai and interpeduncular nucleus: An autoradiographic study of the mesencephalon in the rat. *J. Comp. Neur.* 142:59-74.
93. Hanks, M., W. Wurst, L. Anson-Cartwright, A. B. Auerbach, and A. L. Joyner. 1995. Rescue of the En-1 mutant phenotype by replacement of En-1 with En-2. *Science* 269:679-682.
94. Harrington, C. A., E. J. Lewis, D. Krzemien, and D. M. Chikaraishi. 1987. Identification and cell type specificity of the tyrosine hydroxylase gene promoter. *NAR* 15(5):2363-2383.
95. Hartikka, J. and F. Hefti. 1988. Developmental of septal cholinergic neurons in culture: plating density and glial cells modulate effects of NGF on survival, fiber growth and expression of transmitter-specific enzymes. *J. Neurosci.* 8:2967-2986.
96. Hatten, M. E., M. Lynch, R. E. Rydel, J. Sanchez, J. Joseph-Silverstein, D. Moscatelli, and D. B. Rifkin. 1988. In vitro neurite extension by granule neurons is dependent upon astroglia-derived fibroblast growth factor. *Dev. Biol.* 125:280-289.
97. Haycock, J. W., N. G. Ahn, M. H. Cobb, and E. G. Krebs. 1992. ERK1 and ERK2, two microtubule-associated protein 2 kinases, mediate the phosphorylation of tyrosine hydroxylase at serine-31 in situ. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89:2365-2369.
98. Hemmati-Brivanlou, A., O. G. Kelly, and D. A. Melton. 1994. Follistatin, an Antagonist of Activin, Is Expressed in the Spemann Organizer and Displays Direct Neuralizing Activity. *Cell* 77:283-295.
99. Hemmati-Brivanlou, A. and D. A. Melton. 1994. Inhibition of Activin Receptor Signaling Promotes Neuralization in *Xenopus*. *Cell* 77:273-281.
100. Hemmendinger, L. M., B. B. Garber, P. C. Hoffmann, and A. Heller. 1981. Target neuron-specific process formation by embryonic mesencephalic dopamine neurons in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 78(2):1264-1268.
101. Heumann, R. 1994. Neurotrophin signalling. *Current Opinion in Neurobiology* 4:668-679.
102. Hosoya, T., K. Takizawa, K. Nitta, and Y. Hotta. 1995. glial cells missing: A binary switch between neuronal and glial determination in *drosophila*. *Cell* 82:1025-1036.
103. Hughes, R. A., M. Sendtner, and H. Thoenen. 1993. Members of several gene families influence survival of rat motoneurons in vitro and in vivo. *J. Neurosc. Res.* 36:663-671.
104. Hughes, S. M., L. E. Lillien, M. C. Raff, H. Rohrer, and M. Sendtner. 1988. Ciliary neurotrophic factor induces type-2 astrocyte differentiation in culture. *Nature* 335:70-73.
105. Hyman, C., M. Hofer, Y. -A. Barde, M. Juhasz, G. D. Yancopoulos, S. P. Squinto, and R. M. Lindsay. 1991. BDNF is a neurotrophic factor for dopaminergic neurons of the substantia nigra. *Nature* 350:230-232.

106. Hyman, C., M. Juhasz, C. Jackson, P. Wright, N. Y. Ip, and R. M. Lindsay. 1994. Overlapping and distinct action of neurotrophins BDNF, NT-3 and NT-4/5 on cultured dopaminergic and GABAergic neurons of the ventral mesencephalon. *J. Neurosci.* 14(1):335-347.
107. Hynes, M., J. A. Porter, C. Chiang, D. Chang, M. Tessier-Lavigne, P. A. Beachy, and A. Rosenthal. 1995. Induction of midbrain dopaminergic neurons by sonic hedgehog. *Neuron* 15:35-44.
108. Hynes, M., K. Poulsen, M. Tessier-Lavigne, and A. Rosenthal. 1995. Control of neuronal diversity by the floor plate: Contact-mediated induction of midbrain dopaminergic neurons. *Cell* 80:95-101.
109. Ip, N. Y., T. G. Boulton, Y. Li, J. M. Verdi, S. J. Birren, D. J. Anderson, and G. D. Yancopoulos. 1994. CNTF, FGF, and NGF collaborate to drive the terminal differentiation of MAH cells into postmitotic neurons. *Neuron* 13:443-455.
110. Isaacson, O., T. W. Deacon, P. Pakzaban, W. R. Galpern, J. Dinsmore, and L. H. Burns. 1995. Transplanted xenogenic neural cell in neurodegenerative disease models exhibit remarkable axonal target specificity and distinct growth patterns of glial and axonal fibres. *Nature Medicine* 1:1189-1194.
111. Iwata, N., K. KOBAYASHI, T. SASAOKA, H. Hidaka, and T. Nagatsu. 1992. Structure of the mouse tyrosine hydroxylase gene. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 182(1):348-354.
112. Jacks, T., A. Fazeli, E. M. Schmitt, R. T. Bronson, M. A. Goodell, and R. A. Weinberg. 1992. Effects of an Rb mutation in the mouse. *Nature* 359:295-300.
113. Jessen, K. R. and R. Mirsky. 1992. Schwann cells: early lineage, regulation of proliferation and control of myelin formation. *Current Opinion in Neurobiology* 2:575-581.
114. Jones, B. W., R. D. Fetter, G. Tear, and C. S. Goodman. 1995. glial cells missing: A genetics switch that controls glial versus neuronal fate. *Cell* 82:1013-1023.
115. Jones, K. R., I. Farinas, C. Backus, and L. F. Reichardt. 1994. Targeted Disruption of the BDNF Gene Perturbs Brain and Sensory Neuron Development but Not Motor Neuron Development. *Cell* 76:989-999.
116. Kalman, D., K. Whittaker, J. M. Bishop, and P. H. O'Lague. 1993. Domains of E1A that bind p105Rb, p130, and p300 are required to block nerve growth factor-induced neurite growth in PC12 cells. *Mol. Biol. Cell* 4:353-361.
117. Katarova, Z., G. Szabo, E. Mugnaini, and R. J. Greenspan. 1989. Molecular Identification of the 62 kd Form of Glutamic Acid Decarboxylase from the Mouse. *J. Neurosci.* 2:190-202.
118. Kaufman, D. L., C. R. Houser, and A. J. Tobin. 1991. Two forms of the t-aminobutyric acid synthetic enzyme glutamate decarboxylase have distinct intraneuronal distributions and cofactor interactions. *Journal of Neurochemistry* 56:720-723.
119. Kengaku, M. and H. Okamoto. 1995. bFGF as a possible morphogen for the anteroposterior axis of the central nervous system in *Xenopus*. *Development* 121:3121-3130.
120. Keynes, R. and R. Krumlauf. 1994. HOX genes and regionalization of the nervous system. *Annu. Rev. Neurosci.* 17:109-132.
121. Keynes, R. and A. Lumsden. 1990. Segmentation and the Origin of Regional Diversity in the Vertebrate Central Nervous System. *Neuron* 2:1-9.
122. Kilbourne, E. J., B. B. Nankova, E. J. Lewis, A. McMahon, H. Osaka, D. B. Sabban, and E. L. Sabban. 1992. Regulated Expression of the Tyrosine Hydroxylase Gene by Membrane Depolarization. *J. Biol. Chem.* 267:7563-7569.

123. Kilpatrick, T. J. and P. F. Bartlett. 1995. Cloned multipotential precursors from the mouse cerebrum require FGF-2, whereas glial restricted precursors are stimulated with either FGF-2 or EGF. *J. Neurosci.* **15(5)**:3653-3661.
124. Kilpatrick, T. J., P. S. Talman, and P. F. Bartlett. 1993. The differentiation and survival of murine neurons in vitro is promoted by soluble factors produced by an astrocytic cell line. *J. Neurosci. Res.* **359**:147-161.
125. Kirschner, M. 1992. The cell cycle then and now. *TIBS* **17**:281-285.
126. Knüsel, B., J. W. Winslow, A. Rosenthal, L. E. Burton, D. P. Seid, K. Nikolics, and F. Hefti. 1991. Promotion of central cholinergic and dopaminergic neuron differentiation by brain-derived neurotrophic factor but not neurotrophin 3. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**:961-965.
127. Kobayashi, K., N. Kaneda, H. Ichinose, F. Kishi, A. Nakazawa, Y. Kurosawa, K. Fujita, and T. Nagatsu. 1988. Structure of human tyrosine hydroxylase gene: alternative splicing from a single gene accounts for generation of four mRNA types. *J. Biochem.* **103**:907-912.
128. Korsching, S. 1993. The neurotrophic factor concept: a reexamination. *J. Neurosci.* **13 (7)**:2739-2748.
129. Kriegstein, K., C. Suter-Crazzolara, W. H. Fischer, and K. Unsicker. 1995. TGF- $\beta$  superfamily members promote survival of midbrain dopaminergic neurons and protect them against MPP<sup>+</sup> toxicity. *EMBO J.* **14 (4)**:736-742.
130. Kushima, Y., C. Nishio, T. Nonomura, and H. Hatanaka. 1992. Effects of nerve growth factor and basic fibroblast growth factor on survival of cultured septal cholinergic neurons from adult. *Brain Res.* **598**:264-270.
131. Kuzis, K., S. Reed, N. J. Cherry, W. R. Woodward, and F. P. Eckenstein. 1995. Developmental time course of acidic and basic fibroblast growth factors' expression in distinct cellular populations of the rat central nervous system. *The Journal of Comparative Neurology* **358**:142-153.
132. Kwang-Soo, K., K. L. Myung, C. Joanne, and H. J. Tong. 1993. Both the basal and inducible transcription of the tyrosine hydroxylase gene are dependent upon a cAMP response element. *J. Biol. Chem.* **268/21**:15689-15695.
133. Lamb, T. M., A. K. Knecht, W. C. Smith, S. E. Stachel, A. N. Economides, N. Stahl, G. D. Yancopoulos, and R. M. Harland. 1993. Neural induction by the secreted polypeptide noggin. *Science* **262**:713-718.
134. Landis, S. C. 1990. Target regulation of neurotransmitter phenotype. *TINS* **13**:344-350.
135. Lauder, J., M. B. Wilkie, E. Lieth, and V. Han. 1989. Dissociated Cell Culture and Morphochemistry of Monoamine Neurons, p. 233-239. In A. Shahar, J. Vellis, A. Vernadakis, and B. Haber (ed.), *A dissection and tissue culture manual of the nervous system*. Alan R. Liss Inc., New York.
136. Lazar, L. M. and M. Blum. 1992. Regional Distribution and Developmental Expression of Epidermal Growth Factor and Transforming Growth Factor- $\alpha$  mRNA in Mouse Brain by a Quantitative Nuclease Protection Assay. *J. Neurosci.* **12**:1688-1697.
137. Le Douarin, N. M. 1980. The ontogeny of the neural crest in avian embryo chimeras. *Nature* **286**:663-669.
138. Le Douarin, N. M. 1993. Embryonic neural chimeras in the study of brain development. *TINS* **16**:64-72.
139. Lee, E. Y. -H. P., Ch-Y. Chang, N. Hu, Y. -Ch. J. Wang, Ch. -Ch. Lai, K. Herrup, W. -H. Lee, and A. Bradley. 1992. Mice deficient for Rb are nonviable and show defects in neurogenesis and haematopoiesis. *Nature* **359**:288-294.

140. Lee, J. E., S. M. Hollenberg, L. Snider, D. L. Turner, N. Lipnick, and H. Weintraub. 1995. Conversion of *Xenopus* ectoderm into neurons by neuroD, a basic helix-loop-helix protein. *Science* 268:836-844.
141. Leibrock, J., F. Lottspeich, A. Hohn, M. Hofer, B. Hengerer, P. Masiakowski, H. Thoenen, and Y. A. Barde. 1989. Molecular cloning and expression of brain-derived neurotrophic factor. *Nature* 341:149-152.
142. Lemke, G. 1993. Transcriptional regulation of the development of neurons and glia. *Current Opinion in Neurobiology* 3:703-708.
143. Leutz, A. and M. Schachner. 1981. Epidermal growth factor stimulates DNA-synthesis of astrocytes in primary cerebellar cultures. *Cell Tissue Res.* 220:393-404.
144. Levi-Montalcini, R. 1987. The nerve growth factor 35 years later. *Science* 237:1154-1162.
145. Lewis, E. J. and D. M. Chikaraishi. 1987. Regulated Expression of the Tyrosine Hydroxylase Gene by Epidermal Growth Factor. *Mol. Cell. Biol.* 7:3332-3336.
146. Lewis, E. J., C. A. Harrington, and D. M. Chikaraishi. 1987. Transcriptional regulation of the tyrosine hydroxylase gene by glucocorticoid and cyclic AMP. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:3550-3554.
147. Li, L., W. Wu, L. F. Lin, L. F. Lei, M. Lei, R. W. Oppenheim, and L. J. Houenou. 1995. Rescue of adult mouse motoneurons from injury-induced cell death by glial cell line-derived neurotrophic factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:9771-9775.
148. Lillien, L. E. and M. C. Raff. 1990. Analysis of the Cell-Cell interaction that control type-2 astrocyte development in vitro. *Neuron* 4:525-534.
149. Lindsay, R. M., S. J. Wiegand, C. A. Altar, and P. S. DiStefano. 1994. Neurotrophic factors: from molecule to man. *TINS* 17:182-190.
150. López Antunez, L. 1980. Anatomía funcional del sistema nervioso. Limusa, México.
151. Luskin, M. B. 1994. Neural cell lineage in the vertebrate central nervous system. *FASEB J.* 8:722-730.
152. Luskin, M. B., A. L. Pearlman, and J. R. Sanes. 1988. Cell Lineage in the Cerebral Cortex of the Mouse Studied In Vivo and In Vitro with a Recombinant Retrovirus. *Neuron* 1:635-647.
153. Ma, W., T. Behar, D. Maric, I. Maric, and J. L. Barker. 1992. Neuroepithelial cells in the rat spinal cord express glutamate decarboxylase immunoreactivity in vivo and in vitro. *The Journal of Comparative Neurology* 325:257-270.
154. Mallat, M., V. M. Neto, F. Gros, J. Glowinski, and A. Prochiantz. 1986. Two Simian Virus 40 (SV40)-Transformed Cell Lines from the Mouse Striatum and Mesencephalon Presenting Astrocytic Characters. II. Interactions with Mesencephalic Neurons. *Dev. Brain Res.* 26:23-31.
155. Manthorpe, M., R. Adler, and S. Varon. 1981. Cholinergic neurotrophic factors: IV age-dependent requirements by chick embryo ciliary ganglionic neurons. *Dev. Biol.* 85:156-163.
156. Martin, D. L. and K. Rimvall. 1993. Regulation of t-aminobutyric acid synthesis in the brain. *Journal of Neurochemistry* 60:395-407.
157. Massagué, J., L. Attisano, and J. L. Wrana. 1994. The TGF- $\beta$  family and its composite receptors. *TICB* 4:172-178.
158. Master, B. A. and M. K. Raizada. 1993. Insulin-like growth factor I receptors and IGF-I actions in neuronal cultures from the brain. *A. N. Y. A. S.* 692:89-101.



159. Mayer, E., S. B. Dunnett, and J. W. Fawcett. 1993. Mitogenic effect of basic fibroblast growth factor on embryonic ventral mesencephalic dopaminergic neurone precursors. *Dev. Brain Res.* 72:253-258.
160. Mayer, E., S. B. Dunnett, R. Pellitteri, and J. W. Fawcett. 1993. Basic fibroblast growth factor promotes the survival of embryonic neurons-I. Effects in vitro. *Neuroscience* 56(2):379-388.
161. McKinnon, R. D., G. Piras, J. M. Jr. Ida, and M. Dubois-Dalcq. 1993. A role for TGF- $\beta$  in oligodendrocyte differentiation. *J. Cell Biol.* 121(6):1397-1407.
162. McMahon, A. P. and A. Bradley. 1990. The Wnt-1 (int-1) protooncogene is required for development of a large region of the mouse brain. *Cell* 62:1073-1085.
163. McMahon, A. P., A. L. Joyner, A. Bradley, and J. A. McMahon. 1992. The midbrain-hindbrain phenotype of Wnt-1<sup>-</sup>/Wnt-1<sup>-</sup> mice results from stepwise deletion of engrailed-expressing cells by 9.5 days postcoitum. *Cell* 69:581-595.
164. Mehler, M. F. and J. A. Kessler. 1994. Growth factor regulation of neuronal development. *Dev. Neurosci.* 16:180-195.
165. Melton, D. W., D. S. Konecki, J. Brennand, and C. T. Caskey. 1984. Structure, expression and mutation of the hypoxanthine phosphoribosyltransferase gene. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81:2147-2151.
166. Merry, D. E., D. J. Veis, W. F. Hickey, and S. J. Korsmeyer. 1994. bcl-2 protein expression is widespread in the developing nervous system and retained in the adult PNS. *Development* 120:301-311.
167. Millen, K. J., W. Wurst, K. Herrup, and A. L. Joyner. 1994. Abnormal embryonic cerebellar development and patterning of postnatal foliation in two mouse Engrailed-2 mutants. *Development* 120:695-706.
168. Miranda, R. C., F. Sohrabji, and C. D. Toran-Allerand. 1993. Neuronal colocalization of mRNAs for neurotrophins and their receptors in the developing central nervous system suggests a potential for autocrine interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6439-6443.
169. Morrison-Graham, K., G. C. Schatteman, T. Bork, D. F. Bowen-Pope, and J. A. Weston. 1992. A PDGF receptor mutation in the mouse (patch) perturbs the development of a non-neuronal subset of neural crest-derived cells. *Development* 115:133-142.
170. Morshead, C. M., B. A. Reynolds, C. G. Craig, M. W. McBurney, W. A. Staines, D. Morassutti, S. Weiss, and D. van der Kooy. 1994. Neural stem cells in the adult mammalian forebrain: a relatively quiescent subpopulation of subependymal cells. *Neuron* 13:1071-1082.
171. Muller, Y., C. Duperray, F. Caruso, and J. Clos. 1994. Autocrine regulation of proliferation of cerebellar granule neurons by nerve growth factor. *Journal of Neuroscience Research* 38:41-55.
172. Murphy, M., O. Bernard, K. Reid, and P. F. Bartlett. 1991. Cell Lines Derived from Mouse Neural Crest are Representative of Cells at Various Stages of Differentiation. *J. Neurobiol.* 22:522-535.
173. Murphy, M., J. Drago, and P. F. Bartlett. 1990. Fibroblast growth factor stimulates the proliferation and differentiation of neural precursor cells in vitro. *J. Neurosc. Res.* 25:463-475.
174. Murphy, M., K. Reid, M. A. Brown, and P. F. Bartlett. 1993. Involment of leukemia inhibitory factor and nerve growth factor in the development of dorsal root ganglion neurons. *Development* 117:1173-1182.
175. Murphy, M., K. Reid, M. Ford, J. B. Furness, and P. F. Bartlett. 1994. FGF2 regulates proliferation of neural crest cells, with subsequent neuronal differentiation regulated by LIF or related factors. *Development* 120 (12):3519-3528.

176. Murphy, M., K. Reid, D. J. Hilton, and P. F. Bartlett. 1991. Generation of sensory neurons is stimulated by leukemia inhibitory factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:3498-3501.
177. Murphy, M., K. Reid, D. E. Williams, S. D. Lyman, and P. F. Bartlett. 1992. Steel Factor Is Required for Maintenance, but Not Differentiation, of Melanocyte Precursors in the Neural Crest. *Developmental Biology* 153:396-401.
178. Mytilineou, C., T. H. Park, and J. Shen. 1992. Epidermal growth factor-induced survival and proliferation of neuronal precursor cells from embryonic rat mesencephalon. *Neurosci. Lett.* 135:62-66.
179. Nagata, K., N. Takei, H. Nakajima, H. Saito, and S. Kohsaka. 1993. Microglial conditioned medium promotes survival and development of cultured mesencephalic neurons from embryonic rat brain. *Journal of Neuroscience Research* 34:357-363.
180. Nagatsu, T. and H. Ichinose. 1991. Comparative studies on the structure of human tyrosine hydroxylase with those of the enzyme of various mammals. *Comp. Biochem. Physiol.* 98C:203-210.
181. Nagesh, K., Mahanthappa, and AS. Geral. 1993. Peptide growth factor control of olfactory neurogenesis and neuron survival in vitro: roles of EGF and TGF- $\beta$ s. *Neuron* 10:293-305.
182. Nakafuku, M. and S. Nakamura. 1995. Establishment and characterization of a multipotential neural cell line that can conditionally generate neurons, astrocyte, and oligodendrocyte in vitro. *Journal of Neuroscience Research* 41:153-168.
183. Nancy, Y. Ip., L. Yanping, G. D. Yancopoulos, and R. M. Lindsay. 1993. Cultured Hippocampal Neurons Show Responses to BDNF, NT-3, and NT-4, but Not NGF. *J. Neurosci.* 13(8):3394-3405.
184. Neto, V. M., M. Mallat, H. Chneiweiss, J. Premont, F. Gros, and A. Prochiantz. 1986. Two Simian Virus 40 (SV40)-Transformed Cell Lines from the Mouse Striatum and Mesencephalon Presenting Astrocytic Characters. I. Immunological and Pharmacological Properties. *Dev. Brain Res.* 26:11-22.
185. Noble, M., K. Murray, P. Stroobant, M. D. Waterfield, and P. Riddle. 1988. Platelet-derived growth factor promotes division and motility and inhibits premature differentiation of the oligodendrocyte/type-2 astrocyte progenitor cell. *Nature* 333:560-562.
186. Nornes, H. O. and G. D. Das. 1974. Temporal pattern of neurogenesis in spinal cord of rat. I. An autoradiographic study- time and sites of origin and migration and settling patterns of neuroblasts. *Brain Res.* 73:121-138.
187. O'Malley, E. K., B. -A. Sieber, I. B. Black, and Ch. F. Dreyfus. 1992. Mesencephalic type I astrocytes mediate the survival of substantia nigra dopaminergic neurons in culture. *Brain Res.* 582:65-70.
188. Olson, E. N. 1992. Interplay between proliferation and differentiation within the myogenic lineage. *Developmental Biology* 154:261-272.
189. Othberg, A., P. Odin, A. Ballagi, A. Ahgren, K. Funa, and O. Lindvall. 1995. Specific effects of platelet derived growth factor (PDGF) on fetal rat and human dopaminergic neurons in vitro. *Exp. Brain. Res.* 105:111-122.
190. Pahlman, S., S. Mamaeva, G. Meyerson, M. E. K. Mattsson, C. Bjelfman, E. Ortoft, and U. Hammerling. 1990. Human neuroblastoma cells in culture: a model for neuronal cell differentiation and function. *Acta. Physiol. Scand. Suppl.* 592:25-37.
191. Pardee, A. B. 1989. G1 Events and Regulation of Cell Proliferation. *Science* 246:603-608.
192. Parsons, J. T. and M. J. Weber. 1989. Genetics of src:Structure and Functional Organization of a Protein Tyrosine Kinase. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 147:79-127.

193. Pixley, S. K. 1992. CNS glial cells support in vitro survival, division, and differentiation of dissociated olfactory neural progenitor cells. *Neuron* 8:1191-1204.
194. Prives, C. and J. J. Manfredi. 1993. The p53 tumor suppressor protein: meeting review. *Genes & Develop.* 7:529-534.
195. Prochiantz, A., U. di Porzio, A. Kato, B. Berger, and J. Glowinski. 1979. In vitro maturation of mesencephalic dopaminergic neurons from mouse embryos is enhanced in presence of their striatal target cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76:5387-5391.
196. Rabinovsky, E. D., J. Ramchatesingh, and J. L. McManaman. 1995. Regulation of tyrosine hydroxylase gene expression in IMR-32 neuroblastoma cells by basic fibroblast growth factor and ciliary neurotrophic factor. *Journal of Neurochemistry*
197. Rao, M. S., P. H. Patterson, and S. C. Landis. 1992. Membrane associated neurotransmitter-stimulating (MANS) factor is very similar to ciliary neurotrophic factor (CNTF). *Dev. Biol.* 153:411-416.
198. Ray, J. and F. H. Gage. 1994. Spinal cord neuroblast proliferation in response to basic fibroblast growth factor. *J. Neurosci.* 14(6):3548-3564.
199. Ray, J., D. A. Peterson, M. Schinstine, and F. H. Gage. 1993. Proliferation, differentiation, and long-term culture of primary hippocampal neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90:3602-3606.
200. Reid, H. H., A. F. Wilks, and O. Bernard. 1990. Two forms of the basic fibroblast growth factor receptor-like mRNA are expressed in the developing mouse brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:1596-1600.
201. Reynolds, B. A., W. Tetzlaff, and S. Weiss. 1992. A multipotent EGF-responsive striatal embryonic progenitor cell produces neurons and astrocytes. *J. Neurosci.* 12:4565-4574.
202. Reynolds, B. A. and S. Weiss. 1992. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science* 255:1707-1710.
203. Roelink, H., A. Augsburger, J. Heemskerk, V. Korzh, S. Norlin, A. Ruiz i Altaba, Y. Tanabe, M. Placzek, T. Edlund, T. M. Jessell, and J. Dodd. 1994. Floor Plate and Motor Neuron Induction by vhh-1, a Vertebrate Homolog of Hedgehog Expressed by the Notochord. *Cell* 76:761-775.
204. Rosenthal, A., D. V. Goeddel, T. Nguyen, M. Lewis, A. Shih, G. R. Laramée, K. Nikolics, and J. W. Winslow. 1990. Primary structure and biological activity of a novel human neurotrophic factor. *Neuron* 4:767-773.
205. Rubenstein, J. L. J., S. Martinez, K. Shimamura, and L. Puelles. 1994. The embryonic vertebrate forebrain: the prosomeric model. *Science* 266:578-580.
206. Rudkin, B. B., P. Lazarovici, B-Z. Levi, Y. Abe, K. Fujita, and G. Guroff. 1989. Cell cycle-specific action of nerve growth factor in PC 12 cells: differentiation without proliferation. *EMBO J.* 8:3319-3325.
207. Ryder, E. F., E. Y. Snyder, and C. L. Cepko. 1989. Establishment and characterization of multipotent neural cell lines using retrovirus vector-mediated oncogene transfer. *J. Neurobiol.* 21:356-375.
208. Saadat, S., M. Sendtner, and H. Rohrer. 1989. Ciliary neurotrophic factor induce cholinergic differentiation of rat sympathetic neurons in culture. *J. Cell Biol.* 108:1807-1816.
209. Sadowski, H. B., K. Shuai, J. E. Jr. Darnell, and M. Z. Gilman. 1993. A common nuclear signal transduction pathway activated by growth factor and cytokine receptors. *Science* 261:1739-1743.
210. Sager, R. 1992. Tumor suppressor genes in the cell cycle. *Current Opinion Cell Biology* 4:155-160.

211. Sassone-Corsi, P., C. J. Der, and I. M. Verma. 1989. ras-induced neuronal differentiation of PC12: possible involvement of fos and jun. *Mol. Cell. Biol.* 9:3174-3183.
212. Schubert, D. 1992. Synergistic interactions between transforming growth factor beta and fibroblast growth factor regulate schwann cell mitosis. *Journal of Neurobiology* 23:143-148.
213. Schumacher, M., I. Jung-Testas, P. Robel, and E-E. Baulieu. 1993. Insulin-like growth factor I: a mitogen for rat Schwann cells in the presence of elevated levels of cyclic AMP. *Glia* 8:232-240.
214. Segovia, J., N. J. K. T. Tillakaratne, K. Whelan, A. J. Tobin, and K. Gale. 1990. Parallel increases in striatal glutamic acid decarboxylase activity and mRNA levels in rats with lesions of the nigrostriatal pathway. *Brain Res.* 529:345-348.
215. Sehy, D. W., L-E. Shao, A. L. Yu, W-M. Tsai, and J. Yu. 1992. Activin A-induced differentiation in K562 cells is associated with a transient hypophosphorylation of RB protein and the concomitant block of cell cycle at G1 phase. *Journal of Cellular Biochemistry* 50:255-265.
216. Seroogy, K. B., S. Numan, C. M. Gall, D. C. Lee, and H. I. Kornblum. 1994. Expression of EGF receptor mRNA in rat nigrostriatal system. *Neuroreport* 6:105-108.
217. Shah, N. M., M. A. Marchionni, I. Isaacs, P. Stroobant, and D. J. Anderson. 1994. Glial growth factor restricts mammalian neural crest stem cells to a glial fate. *Cell* 77:349-360.
218. Sheng, M. and M. E. Greenberg. 1990. The Regulation and Function of c-fos and Other Immediate Early Genes in the Nervous System. *Neuron* 4:477-485.
219. Sherr, Ch. J. 1993. Mammalian G1 Cyclins. *Cell* 73:1059-1065.
220. Smeyne, R. J., R. Klein, R. Schnapp, L. K. Long, S. Bryant, A. Lewin, S. A. Lira, and M. Barbacid. 1994. Severe sensory and sympathetic neuropathies in mice carrying a disrupted Trk/NGF receptor gene. *Nature* 368:246-249.
221. Smith, J. C., B. M. J. Price, K. Van Nimmen, and D. Huylebroeck. 1990. Identification of a potent *Xenopus* mesoderm-inducing factor as homolog of activin A. *Nature* 345:729-731.
222. Snyder, E. Y. 1994. Grafting immortalized neurons to the CNS. *Current Opinion in Neurobiology* 4:742-751.
223. Snyder, E. Y., D. L. Deitcher, Ch. Walsh, S. Arnold-Aldea, E. A. Hartwig, and C. L. Cepko. 1992. Multipotent Neural Cell Lines Can Engraft and Participate in Development of Mouse Cerebellum. *Cell* 68:33-55.
224. Snyder, E. Y., B. D. Yandava, Z-H. Pan, and J. D. Macklis. 1993. Immortalized postnatally derived cerebellar progenitors can engraft and participate in development of multiple structures at multiple stage along mouse neuroaxis. *Annual Meeting Society for Neuroscience* 19:613.(Abstract)
225. Spemann, H. 1938. Embryonic development and induction. Yale University Press,
226. Stemple, D. L. and D. J. Anderson. 1992. Isolation of Stem Cell for Neurons and Glia from the Mammalian Neural Crest. *Cell* 71:973-985.
227. Stewart, H. J. S., P. A. Eccleston, K. R. Jessen, and R. Mirsky. 1991. Interaction between cAMP elevation, identified growth factors, and serum components in regulating Schwann cell growth. *J. Neurosci. Res.* 30:346-352.
228. Taniguchi, T. 1995. cytokine signaling through nonreceptor protein tyrosine kinases. *Science*

- 268:251-255.
229. Temple, S. 1989. Division and differentiation of isolated CNS blast cells in microculture. *Nature* 340:471-473.
230. Teng, K. K. and L. A. Greene. 1993. Depolarization Maintains Neurites and Priming of PC12 Cells after Nerve Growth Factor Withdrawal. *J. Neurosci.* 13:3124-3135.
231. Tojo, H., Y. Kaisho, M. Nakata, K. Matsuoka, M. Kitagawa, T. Abe, K. Takami, M. Yamamoto, A. Shino, and K. Igarashi. 1995. Targeted disruption of the neurotrophin-3 gene with lacZ induces loss of TrkC-positive neurons in sensory ganglia but not in spinal cords. *Brain Res.* 669:163-175.
232. Tomozawa, Y. and S. Appel. 1986. Soluble Striatal Extracts Enhance Development of Mesencephalic Dopaminergic Neurons in Vitro. *Brain Research.* 399:111-124.
233. Turner, D. L., E. Y. Snyder, and C. L. Cepko. 1990. Lineage-independent determination of cell type in the embryonic mouse retina. *Neuron* 4:833-845.
234. van den Heuvel, S. and E. Harlow. 1993. Distinct Roles for Cyclin-Dependent Kinases in Cell Cycle Control. *Science* 262:2050-2053.
235. Vaysse, P. J. -J. and J. E. Goldman. 1990. A clonal analysis of glial lineages in neonatal forebrain development in vitro. *Neuron* 5:227-235.
236. Ventimiglia, R., P. E. Mather, B. E. Jones, and R. M. Lindsay. 1995. The neurotrophin BDNF, NT-3 and NT-4/5 promote survival and morphological and biochemical differentiation of striatal neurons in vitro. *European Journal of Neuroscience* 7:213-222.
237. Vescovi, A. L., B. A. Reynolds, D. D. Fraser, and S. Weiss. 1993. bFGF regulates the proliferative fate of unipotent (neuronal) and bipotent (neuronal/astroglial) EGF-generated CNS progenitor cells. *Neuron* 11:951-966.
238. Vicario-Abejón, C., K. K. Johe, T. G. Hazel, D. Collazo, and D. G. McKay. 1995. Functions of basic fibroblast growth factor and neurotrophins in the differentiation of hippocampal neurons. *Neuron* 15:105-114.
239. Weiland, N. G. 1992. Glutamic acid decarboxylase messenger ribonucleic acid is regulated by estradiol and progesterone in the hippocampus. *Endocrinology* 131:2697-2702.
240. Widmer, H. R. and F. Hefti. 1994. Neurotrophin-4/5 promotes survival and differentiation of rat striatal neurons developing in culture. *European Journal of Neuroscience* 6 (11):1669-1679.
241. Williams, B. P. and J. Price. 1995. Evidence for multiple precursor cell types in the embryonic rat cerebral cortex. *Neuron* 14:1181-1188.
242. Wolswijk, G. and M. Noble. 1992. Cooperation between PDGF and FGF converts slowly dividing 0-2A adult progenitor cells to rapidly dividing cells with characteristics of 0-2A perinatal progenitor cells. *J. Cell Biol.* 118:889-900.
243. Wood, K. W., H. Qi, G. D'Arcangelo, R. C. Armstrong, T. M. Roberts, and S. Halegoua. 1993. The cytoplasmic raf oncogene induces a neuronal phenotype in PC12 cells: A potential role for cellular raf kinases in neuronal growth factor signal transduction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:5016-5020.
244. Wrana, J. L., L. Attisano, R. Wieser, F. Ventura, and J. Massagué. 1994. Mechanism of activation of the TGF- $\beta$  receptor. *Nature* 370:341-347.
245. Wurst, W., A. B. Auerbach, and A. L. Joyner. 1994. Multiple developmental defects in Engrailed-1

- mutant mice: an early mid-hindbrain deletion and patterning defects in forelimbs and sternum. *Development* 120:2065-2075.
246. Xion, Y., G. J. Hannon, H. Zhang, D. Casso, R. Kobayashi, and D. Beach. 1993. p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature* 366:701-704.
247. Xuan, S., C. A. Baptista, G. Balas, W. Tao, V. C. Soares, and E. Lai. 1995. Winged helix transcription factor BF-1 is essential for the development of the cerebral hemispheres. *Neuron* 14:1141-1152.
248. Xue, Z. G., N. M. Le Douarin, and J. Smith. 1988. Insulin and insulin-like growth factor-I can trigger the differentiation of catecholaminergic precursor in cultures of dorsal root ganglia. *Cell Diff. Dev.* 25:1-10.
249. Yamamori, T., K. Fukada, R. Aebersold, S. Korsching, M. J. Fann, and P. H. Patterson. 1989. The cholinergic neuronal differentiation factor from heart cells is identical to leukemia inhibitory factor. *Science* 246:1412-1415.
250. Yan, G. Z. and E. B. Ziff. 1995. NGF regulate the PC12 cell cycle machinery through specific inhibition of the Cdk kinase and induction of cycline D1. *J. Neurosci.* 15:6200-6212.
251. Yang, K. D., H. L. Chuen, and M. F. Shaio. 1995. Pentoxifylline augments but not antagonize TNF alpha-mediated neuroblastoma cell differentiation modulation of calcium but not cAMP. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 26:1006-1014.
252. Yoon, S. O. and D. M. Chikaraishi. 1992. Tissue-Specific Transcription of the Rat Tyrosine Hydroxylase Gene Requires Synergy between an AP-1 Motif and an Overlapping E Box-Containing Dyad. *Neuron* 9:55-67.
253. Yuspa, S. H., H. Hennings, R. W. Tucker, S. Jaken, A. E. Kilkeny, and D. R. Roop. 1990. Signal transduction for proliferation and differentiation in keratinocytes. *ANYAS* 191-196.
254. Zhao, J., H. O. Nornes, and T. Neuman. 1995. Expression of Rb,E2F,cds2 and D, B cyclins in developing spinal cord. *Neurosci. Lett.* 190:49-52.
255. Zigmond, R. E., M. A. Schwarzschild, and A. R. Rittenhouse. 1989. Acute regulation of tyrosine hydroxylase by nerve activity and by neurotransmitters via phosphorylation. *Ann. Rev. Neurosci.* 12:415-461.