

Universidad Nacional Autónoma de México
Instituto de Neurobiología

**CARACTERIZACIÓN DE NEURONAS CATECOLAMINÉRGICAS ECTÓPICAS EN
EL MESENCÉFALO DORSAL EMBRIONARIO DE RATA**

Tesis que para obtener el grado de
Maestro en Ciencias (Neurobiología)
presenta

el Biol. Exp. José Sócrates López Noguera

Director de Tesis
Dr. Alfredo Varela Echavarría

Campus Juriquilla, Querétaro. Mayo, 2012



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Universidad Nacional Autónoma de México
Instituto de Neurobiología

Los miembros del Comité Tutorial certificamos que la tesis elaborada por: José Sócrates López Noguera, cuyo título es: "Caracterización de neuronas catecolaminérgicas ectópicas en el mesencéfalo dorsal embrionario de rata" se presenta como uno de los requisitos para obtener el grado de Maestría en Ciencias (Neurobiología) y cumple con los criterios de originalidad y calidad requeridos por la división de Estudios de Posgrado de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Firma

Presidente

Dra. Ma. Teresa Morales Guzmán.

Secretario (Tutor)

Dr. Alfredo Varela Echavarría

Vocal

Dra. Diana Escalante Alcalde

Suplente

Dra. Carmen Aceves Velasco

Suplente

Dr. Juan R. Riesgo Escovar

Aprobado por el Comité Académico

Coordinador del Programa

Agradecimientos

El presente trabajo contó con el apoyo y fondos de IMPULSA-UNAM02, CONACYT 101433 y beca CONACYT 322473.

Agradezco de manera particular al Dr. Alfredo Varela Echavarría por confiar en mí y darme la oportunidad de incluirme en su laboratorio, por ser mi tutor y mentor durante esta etapa de mi carrera, así como también compartir su experiencia, conocimiento y darme siempre los mejores consejos.

A mi comité tutorial conformado por la Dra. Carmen Aceves Velasco y el Dr. José Jesús García Colunga por su crítica y consejos durante la realización del presente trabajo.

A la Dra. Ma. Teresa Morales Guzmán, Dra. Diana Escalante Alcalde y Dr. Juan R. Riesgo Escovar por ser los revisores del presente trabajo.

A Claudia M. García-Peña por brindarme siempre su apoyo y consejos cuando los necesité, los cuales fueron muy importantes para la realización del presente trabajo.

A Elsa Nydia Hernández Ríos, Martín García Servín, Ramón Martínez Olvera y Leonor Casanova Rico, por su apoyo técnico.

ÍNDICE

RESUMEN	5
ABSTRACT	6
1. INTRODUCCIÓN	8
2. ANTECEDENTES GENERALES.....	10
2.1. Sistema dopaminérgico en el cerebro adulto de rata	10
2.2 Desarrollo de las neuronas dopaminérgicas en el mesencéfalo embrionario	11
2.3 Mecanismos de diferenciación de las neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo embrionario	14
2.4 Generación ectópica de neuronas TH ⁺ mesencefálicas	17
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	18
4. HIPÓTESIS.....	19
5. OBJETIVOS	19
6. MATERIAL Y MÉTODOS.....	20
7. RESULTADOS	25
8. DISCUSIÓN	39
9. CONCLUSIONES.....	43
10. REFERENCIAS	44
ANEXOS.....	47

RESUMEN

Las neuronas catecolaminérgicas se caracterizan por la expresión de la enzima tirosina hidroxilasa (TH), enzima limitante en la síntesis de las catecolaminas (dopamina, noradrenalina y adrenalina). Los núcleos dopaminérgicos del mesencéfalo se encuentran en la parte ventral del mismo y corresponden a los núcleos A8 (área retorubral), A9 (sustancia nigra) y A10 (área ventral tegmental). En este trabajo se caracterizó una población de células inmunopositivas a TH (TH⁺) que se generan ectópicamente en el mesencéfalo dorsal (MD) en dos sistemas de cultivo. En el primero se cultivaron cerebros de embriones de rata de 12.5 días de gestación (E12.5) por 24 horas y en el segundo, embriones de rata E12.5 incubados exo-útero también por 24 horas. Al caracterizar el fenotipo catecolaminérgico de las células TH⁺ del MD, se observó que no expresan marcadores de tipo noradrenérgico como la enzima dopamina β Hidroxilasa (DBH), aunque tampoco se observó expresión de DBH en el locus ceruleus (LC) en ninguno de los dos sistemas de cultivo. No se observó expresión de marcadores neuronales como β-III tubulina en las células TH del MD. Las células TH ectópicas del MD tampoco presentaron expresión del marcador mesencefálico dopaminérgico Pitx3, posiblemente debido a que la expresión de TH en estas células es independiente de Pitx3. Otra posibilidad es que la expresión de Pitx3 en estas células inicie después de la expresión de TH como ocurre en las neuronas dopaminérgicas del núcleo A10.

ABSTRACT

Catecholaminergic neurons are characterized by the expression of the enzyme tyrosine hydroxylase (TH), the rate-limiting enzyme in the synthesis of catecholamines (dopamine, noradrenaline and adrenaline). The mesencephalic dopaminergic nuclei are located in the ventral region and correspond to the A8 (retrosubstantia nigra), A9 (substantia nigra) and A10 (ventral tegmental area) nuclei. In this work we characterized a population of cells immunopositive for TH (TH⁺) generated ectopically on the dorsal mesencephalon (DM) using two different culture systems. In the first, E12.5 embryonic rat brains were cultured for 24 hours. In the second, whole embryos of the same stage were cultured for the same period of time. We characterized the catecholaminergic phenotype of these cells and observed that they did not express noradrenergic markers such as dopamine β hydroxylase (DBH). Expression of neuronal markers such as the β-III tubulin microtubule protein was not observed in the DM ectopic TH⁺ cells. Also absent was the specific mesencephalic dopaminergic marker Pitx3, possibly due to an alternative mechanism of TH expression independent of Pitx3. Another possibility is that Pitx3 expression in these cells occurs after TH expression as in the case of the A10 nucleus.

ABREVIACIONES

A	Adrenalina
DA	Dopamina
DBH	Dopamina β Hidroxilasa
FGF8	Factor de crecimiento fibroblástico 8
HIF	Factor de transcripción inducido por hipoxia
HRE	Elemento responsivo a hipoxia
LC	Locus Ceruleus
MD	Mesencéfalo dorsal
mDA	Neuronas dopaminérgicas mesencefálicas
MV	Mesencéfalo ventral
NA	Noradrenalina
nDA	Neuronas dopaminérgicas
PBS	Solución búfer salina de fosfatos
Pitx-3	Pituitary homeobox 3
PP	Placa del piso
RR	Área retrorubral
SHH	Sonic Hedgehog
SN	Sustancia nigra
SNC	Sistema Nervioso Central
SNpc	Sustancia Nigra pars compacta
TH	Tirosina Hidroxilasa
TGF-β	Factor de crecimiento transformante β
VTA	Área ventral tegmental

1. INTRODUCCIÓN

Las neuronas catecolaminérgicas que sintetizan y liberan los neurotransmisores dopamina (DA), noradrenalina (NA) y adrenalina (A) en el sistema nervioso central (SNC) pueden ser identificadas por la expresión de la enzima Tirosina Hidroxilasa (TH), enzima involucrada en la síntesis de L-dopa a partir de tirosina, lo que representa el primer paso en la síntesis de las catecolaminas DA, NA y A (Marin et al., 2005; Prakash y Wurst, 2006). Las neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo (mDA), representan la población más grande de neuronas de este tipo que se encuentra en el cerebro de los mamíferos; están involucradas en el control de movimientos voluntarios y la postura, así como en la modulación de conductas de recompensa y cognitivas. Su disfunción se asocia a la patogénesis de desórdenes de adicción, depresión y esquizofrenia, además de que su degeneración en el cerebro adulto conlleva a la enfermedad de Parkinson (Prakash y Wurst, 2006; Smidt y Burbach, 2007). Los cuerpos celulares de las neuronas mDA se encuentran ubicados en tres núcleos distribuidos de manera rostro-caudal a lo largo del tegmentum del mesencéfalo o también llamado mesencéfalo ventral (MV), dichos núcleos son la sustancia nigra (SN), el área ventral tegmental (VTA) y el área retrorubral (RR). Históricamente, estos grupos de neuronas mDA se han denominado también como núcleos A9, A10 y A8 respectivamente (Prakash y Wurst, 2006).

De acuerdo con estudios ontogénicos en diferentes vertebrados, la expresión de TH se ha utilizado como un marcador temprano en el desarrollo de estos núcleos. Hasta el momento, la mayoría de los trabajos se han realizado por medio de técnicas inmunohistoquímicas. Sin embargo, por medio de otras técnicas como la hibridación *in situ* (HIS), se ha obtenido nueva información sobre su origen y desarrollo. Mediante HIS, se analizó la expresión del RNA mensajero de TH (mRNA-TH) en cerebros de ratón en diferentes estadios embrionarios (Marin et al., 2005). Se encontró expresión en sitios del mesencéfalo donde no se había reportado previamente, como los colículos inferiores en la zona dorsal y el núcleo A11 del hipotálamo posterior. Es importante señalar que la expresión de TH en estas zonas

es transitoria ya que solamente se observó hasta E14.5. En el mesencéfalo adulto la expresión de TH se limita a su zona ventral.

La inducción de la diferenciación de los precursores neuronales que dan lugar a las neuronas mDA, depende de la interpretación de las señales provenientes de dos centros organizadores importantes, uno ubicado en el mesencéfalo ventral y el otro en la frontera entre el mesencéfalo y el romboencéfalo (también denominado istmo) (Andersson et al., 2006; Prakash y Wurst, 2006; Abeliovich y Hammond, 2007; Puelles, 2007).

Las células de la placa del piso (PP), ubicadas en el MV, secretan la lipoproteína Sonic Hedgehog (SHH), mientras que las células del istmo secretan el factor de crecimiento fibroblástico 8 (FGF8) (Ye et al., 1998). Las señales producidas por tales moléculas derivan en la expresión de factores de transcripción específicos que conllevan a la diferenciación, maduración y mantenimiento del fenotipo dopaminérgico de las células del MV (Prakash y Wurst, 2004; Roussa y Krieglstein, 2004).

Además de SHH y FGF8 como inductores de la diferenciación dopaminérgica, estudios recientes han revelado que el factor de crecimiento transformante β (TGF- β), otra molécula expresada en el mesencéfalo, funciona como mediador esencial para la inducción y mantenimiento de las neuronas mDA (Roussa y Krieglstein, 2004). De igual manera, se ha observado que TGF- β induce la expresión de marcadores específicos de neuronas mDA como Pitx3 en cultivos de células de la zona dorsal del mesencéfalo (MD) de manera independiente a SHH y FGF8 (Roussa et al., 2006).

En nuestro laboratorio observamos que al cultivar el cerebro embrionario de rata de 12.5 días de gestación o incubar el embrión completo exo-útero, se induce la expresión aberrante de TH en células distribuidas en el mesencéfalo dorsal (MD). El presente trabajo está dirigido a caracterizar el fenotipo de esta población ectópica por medio del análisis de expresión de marcadores neuronales y de identidad dopaminérgica mesencéflica.

2. ANTECEDENTES GENERALES

2.1. Sistema dopaminérgico en el cerebro adulto de rata

Las neuronas catecolaminérgicas que se encuentran en el mesencéfalo adulto son del tipo dopaminérgico y están ubicadas en tres diferentes núcleos a lo largo de su región ventral (MV) o tegmentum. Dichos núcleos son: 1) La Sustancia Nigra (SN) que a su vez se subdivide en SN pars compacta (SNpc) que posee un 95% de neuronas dopaminérgicas (nDA), la SN lateralis que tiene casi en su totalidad nDA; 2) El área ventral tegmental (VTA) la cual posee un 80% de nDA y el resto son neuronas que sintetizan principalmente GABA y 3) El área retrorubral (RR), que contiene un 50% de nDA y el resto no está bien definido (Prakash y Wurst, 2006).

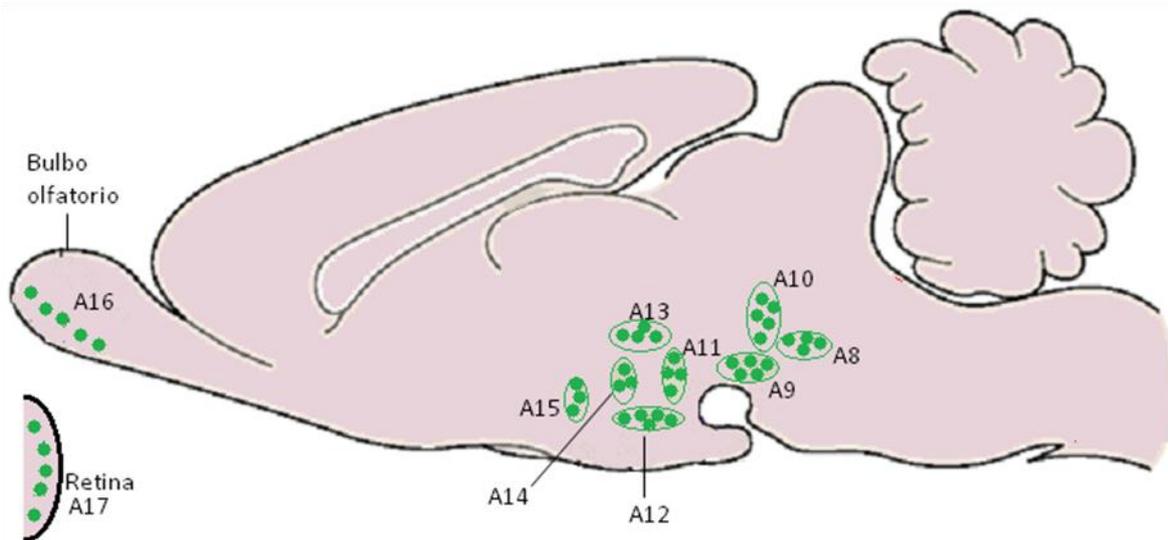


Figura. 1. Vista sagital de la ubicación de los núcleos dopaminérgicos en el cerebro adulto de rata. Se muestra un esquema con la ubicación de los diferentes núcleos dopaminérgicos en el mesencéfalo ventral (A8-A10), diencefalo (A11-A15), bulbo olfatorio (A16) y retina (A17) (Modificado de Kandel et al, 2000).

Estos grupos de nDA han sido denominados: A8 (RR), A9 (SN) y A10 (VTA) (Fig.1) (Prakash y Wurst, 2006). Otros grupos de nDA se encuentran en el diencefalo y comprenden a los grupos A11-A15, siendo los núcleos del hipotálamo posterior (A11) y de la zona incierta en el tálamo ventral (A13) los más grandes del diencefalo (Prakash y Wurst, 2006).

Finalmente, otras poblaciones pequeñas de nDA se encuentran en el telencéfalo, las cuales comprenden a los grupos A16 de las interneuronas del bulbo olfatorio periglomerular y A17 de las interneuronas amácrinas de la retina (Marin et al., 2005).

Las neuronas de la SNpc inervan al estriado dorsolateral y al putamen caudado, formando la muy conocida ruta nigro-estrial. Las neuronas del VTA y del RR, proyectan al estriado ventral como parte del sistema mesolímbico y estableciendo conexiones ascendentes hacia la corteza prefrontal o el llamado sistema mesocortical. Las nDA del grupo diencefálico A11 ó hipotálamo posterior, envían gran parte de sus proyecciones descendentes a las áreas autonómicas del tallo cerebral en su parte baja y a la médula espinal (Prakash y Wurst, 2006; Sillitoe y Vogel, 2008).

Cada grupo de nDA se encuentra integrado al control y modulación de diferentes funciones cerebrales de acuerdo con sus distintas proyecciones. Las nDA que inervan el sistema nigro-estrial, se encuentran integradas en una compleja red que incluye otras áreas subtalámicas y corticales que controlan movimientos voluntarios y la postura corporal. Por otro lado, los sistemas mesolímbico y mesocortical están involucrados en la modulación y control de funciones cognitivas y conductas de reforzamiento o recompensa (Prakash y Wurst, 2006).

2.2 Desarrollo de las neuronas dopaminérgicas en el mesencéfalo embrionario

Las primeras neuronas mesencefálicas dopaminérgicas (mDA), aparecen alrededor del día gestacional E10.5 en embriones de ratón (Riddle y Pollock, 2003). En este estadio, dichas células se caracterizan por la expresión de un miembro de la familia de receptores nucleares llamado Nurr1 (Wallen et al., 1999), por lo que se consideran precursoras postmitóticas, ya que todavía no son neuronas dopaminérgicas completamente diferenciadas (Prakash y Wurst, 2006). La neurogénesis de las neuronas mDA tiene un pico alrededor de E12.5, el cual decae posteriormente (Wallen et al., 1999). Las neuronas de la SNpc y del RR son generadas entre E10 y E13 (con un pico entre E11 y E12), mientras que las neuronas del VTA son generadas a partir de un día después entre E10 y E14 (con un pico entre E12 y E13) (Bayer et al., 1995).

Los estadios previamente mencionados son en embriones de ratón, aunque el curso temporal del desarrollo de las neuronas mDA está conservado entre ratón y rata, y sólo hay que tomar en consideración que el desarrollo de ratón, precede al

desarrollo de rata en aproximadamente un día y medio (1.5 días) (Kawano et al., 1995).

2.2.2 Localización de neuronas catecolaminérgicas en el mesencéfalo y prosencéfalo embrionario

La ontogenia de las neuronas mDA, ha sido investigada en diferentes grupos de vertebrados (rata, ratón, aves y primates), por medio de histofluorescencia de catecolaminas y por medio de inmunohistoquímica usando anticuerpos contra DA y TH (Di Porzio et al., 1990; Vitalis et al., 2000).

El estudio de los patrones de expresión de diversos genes a lo largo del tubo neural y la placa neural, demuestran que, al menos en las etapas tempranas, el neuroepitelio está subdividido en distintos dominios moleculares (Shimamura et al., 1997). Esto ha permitido generar modelos para el estudio de la ontogenia de las neuronas mDA. El modelo neuromérico propuesto por Puelles y Rubenstein (Puelles y Rubenstein, 2003), define al tubo neural en dominios longitudinales y transversales; los dominios longitudinales están designados de manera ventral a dorsal como: placa del piso (PP), placa basal (PB), placa alar (PA) y placa del techo (PT): Por otra parte, los dominios transversales se han designado de manera rostral a caudal como: telencéfalo, diencefalo rostral, prosómeras 3-1, mesencéfalo y romboencéfalo (Smidt y Burbach, 2007).

Mediante el modelo neuromérico, se ha propuesto que las neuronas catecolaminérgicas (ya sean permanentes o transitorias), son generadas cerca o en la región que ocuparán en el adulto, en lugar de ser generadas en fuentes localizadas y distribuidas por medio de migración (Puelles y Rubenstein, 2003). En estos estudios ontogénicos, la expresión de TH en los núcleos o grupos celulares correspondientes a las regiones de neuronas catecolaminérgicas en el mesencéfalo y prosencéfalo, resulta ser un buen marcador temprano para analizar el desarrollo de estas poblaciones neuronales.

En uno de los primeros estudios para determinar la ontogenia de la expresión de TH, se utilizaron embriones de ratones transgénicos que expresaban el gen reportero lacZ bajo el promotor tejido-específico de TH. Se observó expresión transitoria de TH

desde E9.0, en los primordios de los ganglios sensoriales glossofaríngeo (IX) y del vago (X). Entre E9.5 y E10.5 la expresión se extendió a los primordios de los ganglios geniculado (VII) y trigémino (V). Durante el mismo periodo, se encontró expresión de β -galactosidasa (producto de la expresión del gen lacZ) en distintas regiones como el prosencéfalo ventral, mesencéfalo ventral y dorsolateral, así como en el romboencéfalo rostral, alcanzando su pico máximo en E10. Para E13.5, la expresión desaparece por completo en todas las regiones mencionadas, excepto en la zona del MV que posteriormente contiene a los núcleos dopaminérgicos A9 y A10, así como la región rostrocaudal del romboencéfalo que posteriormente forma el núcleo noradrenérgico locus ceruleus (LC) (Son et al., 1996).

En estudios recientes realizados por medio de hibridación *in situ* (HIS), se analizó la expresión del RNA mensajero de TH (mRNA-TH) en estadios embrionarios tempranos (E10-12) y tardíos (E12.5-13.5) (Fig. 2) de ratón. Se demostró que entre los estadios E10 y E12, la expresión de TH abarca una amplia región del neuroepitelio y se extiende a través de las neurómeras, representadas por el mesencéfalo, prosómeras 1-3 (que forman el diencefalo) y prosencéfalo secundario (forman el telencefalo e hipotálamo ventral) (Marin et al., 2005).

Por otra parte, en E12.5-E15.5 la expresión del mRNA-TH se restringe a regiones que corresponden a los núcleos dopaminérgicos (A8-A15). Además de estos núcleos, se observa expresión de TH en regiones no descritas previamente como el núcleo parabraquial, el núcleo parabigeminal, el septum y las eminencias ganglionares media y lateral (Fig. 2).

Otras regiones en las que se detectó señal de TH, corresponden a la zona dorsal del mesencéfalo que incluye a los colículos inferiores y al núcleo A11 del hipotálamo posterior, que es parte del diencefalo en una distribución media dorsoventral que se extiende longitudinalmente del mesencéfalo a la prosómera 2. También se detectó un grupo con expresión de mRNA-TH entre la prosómera 1 y 2, que lo denominaron como núcleo A11 dorsal (A11-d) (Marin et al., 2005). Cabe mencionar que en estas regiones la expresión del mRNA-TH es transitoria, ya que se observa expresión en E14.5, mientras que en embriones de E17.5 ya no se detecta (Marin et al., 2005).

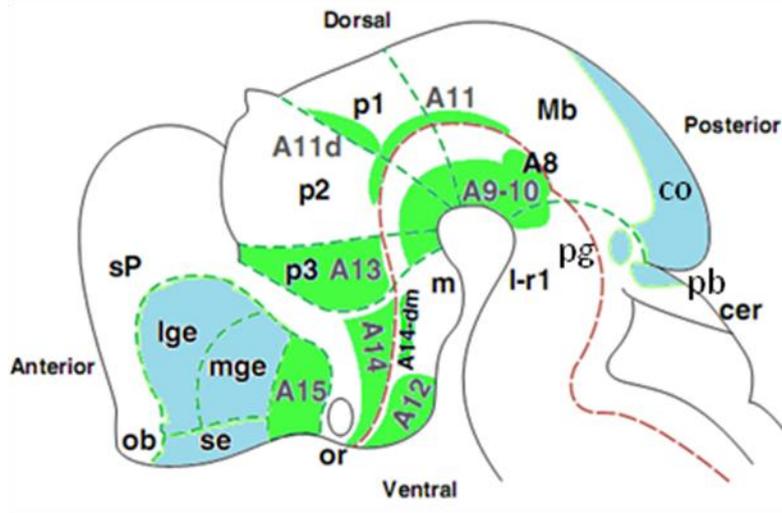


Figura 2. Núcleos dopaminérgicos en el SNC de ratón en desarrollo. Esquema resumiendo la distribución de la expresión del mRNA de TH en embriones que abarcan estadios de 12.5 a 14.5 días de gestación en relación a un mapa neuromérico. Las regiones correspondientes a los núcleos dopaminérgicos se muestran en verde (A8-A15) y en azul regiones de expresión transitoria del mRNA de TH en la eminencia medial (mge) y lateral (lge), colículo inferior (co), septum (se), núcleo parabigeminal (pg) y parabraquial (pb). No se muestran los núcleos A16 y A17. Se observan las neurómeras que corresponden al istmo (l-r1), mesencéfalo (Mb), prosómeras 1 a 3 (p1-p3) y prosencéfalo secundario (sP). cerebelo (cer), bulbo olfatorio (ob), cuerpo mamilar (m), núcleo dorsomedial del A14 (A14-dm) y núcleo A11 dorsal (A11d) (Modificado de (Marin et al., 2005).

2.3 MECANISMOS DE DIFERENCIACIÓN DE LAS NEURONAS DOPAMINÉRGICAS DEL MESENCÉFALO EMBRIONARIO

2.3.4 Especificación del territorio mesencefálico

La especificación de una región permisiva para la generación de neuronas dopaminérgicas es un evento fundamental que ocurre temprano en el desarrollo de las neuronas mDA. Se ha demostrado que la inducción de la diferenciación de los precursores neuronales que dan lugar a las neuronas mDA, depende de la interpretación de las señales provenientes de dos centros organizadores, el primero ubicado en el mesencéfalo ventral y el segundo en la zona limítrofe entre el mesencéfalo y el romboencéfalo (istmo) (Andersson et al., 2006; Prakash y Wurst, 2006; Abeliovich y Hammond, 2007; Puellas, 2007). Dichas señales corresponden en la parte ventral del mesencéfalo, a la lipoproteína difusible sonic hedgehog (SHH), que es producida por las células de la placa del piso (PP) y de la notocorda,

mientras que en el istmo se produce el factor de crecimiento fibroblástico 8 (FGF8). Además de éstas, otra señal importante, es la de Wnt1, que es una glicoproteína expresada primero en un amplio dominio que comprende al territorio prospectivo del mesencéfalo y que posteriormente se restringe a una estrecha línea a lo largo de la línea media dorsal (placa del techo) del mesencéfalo y diencefalo caudal. La interacción espacial entre estas tres señales, es requerida para la especificación de la región del mesencéfalo en donde se generaran las neuronas mDAs (Prakash y Wurst, 2006; Gale y Li, 2008).

El istmo se establece en estadíos tempranos del desarrollo neural (E7.5-E9.5 de ratón) por la expresión opuesta de los dominios de dos represores transcripcionales: Otx2 en el prosencéfalo y mesencéfalo, y Gbx2 en el romboencéfalo y médula espinal. También se ha visto que Otx2 regula la expresión de señales morfogénicas como la de SHH y FGF8 (Vernay et al., 2005).

Otx2 es una molécula importante en la formación del patrón dorso-ventral en el mesencéfalo. La carencia de esta proteína en la frontera alar-basal, produce una expansión del dominio de expresión de SHH, con la inhibición del dominio ventral de Nkx6. Este efecto incrementa de manera masiva el número de neuronas dopaminérgicas (Puelles y Rubenstein, 2003). Cuando se bloquea la expresión de Otx2 en la placa basal y del piso, se produce un cambio drástico en la diferenciación de los progenitores neuronales que dan lugar a las neuronas mDA. En este caso, las bandas Nkx2.2-positivas se expanden ventralmente, ocupando el territorio de Nkx6.1. Este cambio en la combinación de factores de transcripción produce un cambio de neuronas dopaminérgicas a serotoninérgicas (Puelles et al., 2004).

La expresión de moléculas como Wnt1 y FGF8, se inicia posteriormente en el istmo, donde Wnt1 se requiere para el mantenimiento de la expresión de Otx2, el cual se asocia con la expresión de los factores de transcripción Engrailed-1 (En-1) y 2 (En-2), que son expresados específicamente en neuronas dopaminérgicas mesencefálicas postmitóticas (Echevarria et al., 2003; Prakash y Wurst, 2004).

SHH fue uno de los primeros factores para los que se demostró la inducción de diferentes tipos celulares ventrales, incluyendo a las neuronas mDA. Además, se ha visto que SHH por sí solo es capaz de inducir la diferenciación de neuronas

dopaminérgicas en el mesencéfalo ventral (Hynes et al., 1995), pero en otras zonas neuronales, se requiere de la presencia de FGF8 (Ye et al., 1998).

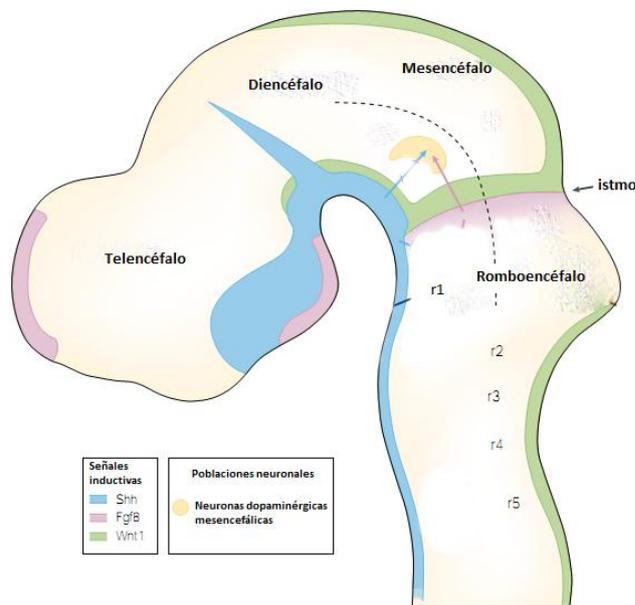


Figura. 3 Localización de los factores involucrados en el desarrollo de las NDA mesencefálicas. Vista sagital del tubo neural de un ratón en E11.5. Las señales inductivas (flechas) que reciben las células precursoras que darán origen a las nmDA, son producidas por dos centros importantes dentro del tubo neural como es el istmo (FGF8) y la placa del piso (SHH). r = rombómera. (Modificado de (Prakash y Wurst, 2004))

2.3.5 Determinación del destino dopaminérgico

La interacción de las señales inductoras producidas en la región del mesencéfalo ventral (SHH) y el istmo (FGF8), en combinación con la expresión de Otx2, permiten a las células de la línea media ventral del mesencéfalo responder a la expresión del factor de transcripción tipo homeodominio Lmx1a (Prakash y Wurst, 2004). En estudios previos se ha visto que Lmx1a puede utilizarse como un marcador para precursores mesencefálicos en las células de la zona ventricular (ZV) de la PP en embriones de ratón E9, además de que se sabe que la expresión de Lmx1a está inducida por SHH en la placa del piso (Andersson et al., 2006). Lmx1a induce la expresión de Msx1, otro factor homeodominio, que inhibe la expresión de reguladores negativos de la neurogénesis como el factor homeodominio Nkx6.1 (Gale y Li, 2008). Al final, esta cascada induce la expresión de factores proneurales como Neurogenina 2 (Ngn2), que es requerido para la generación de los progenitores postmitóticos de las neuronas mDA y su diferenciación hacia neuronas maduras (Abeliovich y Hammond, 2007). Conforme los precursores de las neuronas mDA se vuelven progenitores postmitóticos, comienzan a expresar el marcador

neuronal Tuj1 ó β -tubulina clase III, así como el receptor nuclear Nurr1 (Gale y Li, 2008).

2.3.6 Diferenciación terminal

El paso final en la diferenciación de las neuronas mDA, involucra la expresión de TH, enzima limitante en la producción de dopamina y en el que Nurr1 juega un papel importante (Prakash y Wurst, 2006). En ratones knock-out para el gen de Nurr1, se altera la expresión de marcadores para neuronas mesencefálicas dopaminérgicas como TH y cRet, que es un componente del receptor del factor de crecimiento derivado de la glía (GDNF) (Saucedo-Cardenas et al., 1998).

Otro factor de transcripción implicado en la regulación de TH y en la diferenciación de un subconjunto de neuronas mDA, es el pituitary homeobox 3 (Pitx3). Pitx3 se expresa tanto en neuronas de la SNpc como del VTA, aunque se sabe que su ausencia resulta en la pérdida preferencial de neuronas de la SNpc (Smidt et al., 1997; Smidt et al., 2004; Smidt y Burbach, 2007; Gale y Li, 2008).

La expresión de Pitx3, prosigue a la expresión de Nurr1 y ha sido implicado en la generación de neuronas dopaminérgicas maduras, sugiriendo una participación de Nurr1 en la regulación de Pitx3 (Simeone, 2005; Abeliovich y Hammond, 2007).

Finalmente, los factores de transcripción En1 y En2, son requeridos para el mantenimiento de las nmDA en estadios posteriores en el desarrollo fetal y en la adultez (Gale y Li, 2008).

2.4 Generación ectópica de neuronas TH⁺ mesencefálicas

En un estudio realizado por Roussa y col. (2006), se demostró que los progenitores neurales del MV y MD de embriones de ratón en E12, exhiben identidad regional *in vitro*. Además observaron que el tratamiento de células disociadas del MV con el factor de crecimiento transformante β (TGF- β), una molécula que también es expresada en el mesencéfalo, incrementa el número de células inmunoreactivas para marcadores dopaminérgicos como TH, Pitx3 y Nurr1. También observaron que el mismo factor induce la expresión de TH en el células disociadas del MD de una manera independiente de Shh y Fgf8 (ya que estos no se expresan en el MD),

revelando un papel importante de TGF- β en la diferenciación de las neuronas mDA (Roussa et al., 2006).

Estudios previos realizados en nuestro laboratorio, en los cuales se incubaron cerebros embrionarios E12.5 de rata Wistar por 24 horas en una matriz de colágena embebida en medio de cultivo con diferentes suplementos, se observó expresión de TH en células ubicadas en la zona correspondiente al MD (Fig.4). Además se observó que algunas de estas células presentaban procesos celulares con una orientación en dirección ventral. Tales resultados motivaron el presente trabajo que tiene por finalidad caracterizar por medio de diversos marcadores el fenotipo de esta población ectópica de células inmunopositivas a TH (TH⁺).

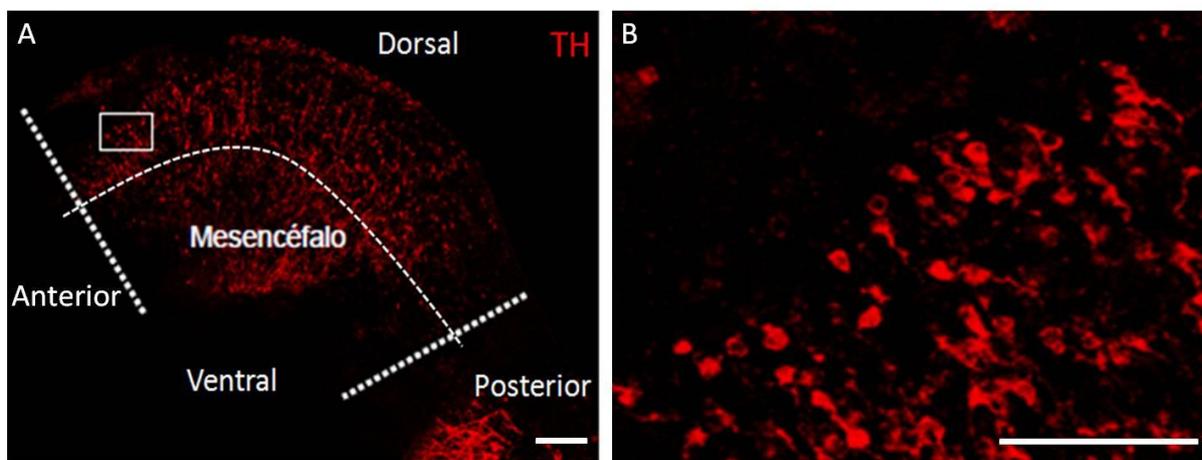


Figura. 4. Células inmunoreactivas a TH en el mesencéfalo dorsal en E12 de rata. A) Vista panorámica lateral donde se observa una población ectópica de neuronas TH+ B) Magnificación de A, donde se muestra la población de neuronas TH+. (Imágenes proporcionadas por García-Peña CM) Barras de Calibración 100 μ m.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En cultivos de cerebro embrionario de ratas Wistar de 12.5 días de gestación y en embriones completos incubados exo-útero, se observaron células ectópicas que expresan TH en el área dorsal del mesencéfalo. Debido a que no se conoce la identidad de esas células y no existen datos previos respecto a su aparición en dicha región, el presente proyecto tuvo como objetivo caracterizarlas mediante el uso de marcadores neuronales y de identidad de tipos catecolaminérgicos.

4. HIPÓTESIS

Debido a la expresión de TH y a la ubicación en el mesencéfalo de las células ectópicas, estas células expresarán marcadores dopaminérgicos mesencefálicos como Pitx3, mas no así de marcadores noradrenérgicos como la enzima dopamina β hidroxilasa (DBH).

5. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

La caracterización de neuronas ectópicas TH⁺ del mesencéfalo dorsal embrionario en rata cuando el cerebro en desarrollo ó el embrión completo son cultivados *in vitro*.

5.2 OBJETIVOS PARTICULARES

En cerebro o embrión completo cultivados *in vitro*:

- Analizar la expresión ectópica de TH en el mesencéfalo de cerebros embrionarios incubados en diferentes combinaciones de medios de cultivo.
- Analizar la expresión de TH y DBH por medio de inmunofluorescencia para definir el fenotipo catecolaminérgico de las células TH⁺ ectópicas mesencefálicas.
- Analizar la expresión de marcadores neuronales como β -III tubulina para corroborar si las células TH⁺ ectópicas mesencefálicas presentan fenotipo neuronal.
- Analizar por medio de inmunofluorescencia la expresión Pitx-3, como marcador de identidad y diferenciación de las neuronas dopaminérgicas mesencefálicas.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Cultivo de cerebro embrionario de rata

Embriones de rata Wistar de 12.5 días de gestación fueron extraídos de la madre (previo sacrificio por dislocación cervical) por medio de cesárea, se colocaron en una caja de disección con solución búfer salina de fosfatos (PBS) 1X (GIBCO, 70011-044, Carlsbad CA, USA.). Bajo un microscopio estereoscópico se retiró el tejido extraembrionario así como los arcos branquiales y parte del mesodermo restante, tratando de mantener el neuroepitelio lo más intacto posible. El resto del embrión fue descartado, trabajando únicamente con la parte del neuroepitelio que abarca del telencéfalo a la rombómera 2 del romboencéfalo. Previo a la adición de los diferentes medios de cultivo, los cerebros de los embriones fueron colocados en cajas de cultivo de 4 pozos (un cerebro por pozo) y se les agregó una gota de 30 μ l de una mezcla de colágena (ver anexo 1). Se dejó polimerizar la colágena por aproximadamente 20 minutos a 37°C y 5% CO₂, posteriormente se agregaron 250 μ l de medio de cultivo correspondiente a cada condición y se dejó incubar por 24 horas a 37°C y 5% CO₂.

Con el fin de evaluar el efecto de los componentes del medio por separado, además de cultivar los cerebros con el medio original, se cultivaron bajo las siguientes condiciones: 1) L-glutamina, 2) B27, 3) N2, 4) ácido ascórbico. Cada una de estas condiciones, también contenía medio neurobasal y suero de cabra al 5%. Además de estas condiciones, se realizaron otras que sólo contenían: 1) medio neurobasal, 2) suero de cabra al 5% y 3) medio DMEM. Finalmente para evaluar el efecto de la colágena sobre la expresión ectópica de TH en el MD, un grupo de cerebros fueron colocados en cajas de silicón para microdisección y se fijaron con alfileres, tratando de sustituir la función de la colágena. Posteriormente se adicionó un volumen de medio DMEM suficiente para cubrir los cerebros y se incubaron por 24 horas a 37°C y 5% CO₂.

Tanto el proceso de extracción de los embriones y su manipulación, así como la preparación de las diferentes combinaciones de los medios de cultivo, se realizaron en condiciones de esterilidad y en una campana de flujo laminar. Además, para evitar la contaminación de los medios de cultivo, a todos se les adicionó

penicilina/estreptomicina (para la preparación de los diferentes medios y la mezcla con colágena, ver Anexos 1 y 2).

6.2 Incubación exo-útero de embriones completos

Ratas Wistar hembra con embriones de 12.5 días de gestación (E12.5), fueron anestesiadas con una mezcla de Ketamina (75 mg/kg) y Xilacina (12.5 mg/kg) (Cheminova, México). Luego, mediante cesárea, se extrajeron los embriones del útero tratando de dejar lo más intacta posible la placenta. El amnion y el saco vitelino se abrieron cuidadosamente para incrementar la difusión de oxígeno hacia el embrión. Posteriormente, los embriones se colocaron en pequeños frascos de vidrio con 4 ml de suero de rata hembra adulta lactante (previamente inactivado a 56°C por una hora); se agregó glucosa a una concentración final de 2 mg/ml y 200 IU/ml de penicilina/estreptomicina. Los frascos fueron acoplados a una cámara rotatoria, e incubados por 24 horas a 37°C y con una mezcla de gases de 95% O₂ y 5% de CO₂. Sólo aquellos embriones que presentaban actividad cardíaca después de las 24 horas de incubación fueron procesados para llevar a cabo los estudios posteriores.

6.3 Inmuntinciones

El procedimiento de inmunotinción tanto para los cultivos de cerebro como para los embriones incubados exo-útero, fue el mismo. Después de las 24 horas de cultivo, las muestras fueron fijadas en paraformaldehído (PFA) (SIGMA, P-6148, Saint Louis MO, USA) al 3.5% en PBS por 24 horas a 4°C. Posteriormente se realizaron seis lavados de 10 minutos cada uno con PBS para retirar el exceso de PFA. En los embriones incubados exo-útero se trató de retirar la mayor cantidad posible de tejido mesodérmico, tratando de dejar lo más intacto posible el neuroepitelio. Posteriormente se bloquearon por 30 minutos con suero de cabra al 10% (GIBCO, 16210-072, Carlsbad CA, USA), después los tejidos fueron incubados toda la noche a 4°C con anticuerpos primarios diluidos en PBS con Tritón X-100 al 0.3% (JT Baker, BK-x198-07) y suero de cabra al 10%. Se utilizaron los siguientes anticuerpos primarios: anti-TH policlonal [1:1000] (Pelfreeze, Rogers AK, USA P40101-0) hecho

en conejo, anti-TH policlonal [1:250] (Pelfreeze, P60101-0, Rogers AK, USA) hecho en oveja, anti-DBH monoclonal [1:500] (Millipore, MAB308, Temecula CA, USA), anti- β III tubulina monoclonal [1:2000] (Covance, MMS-435-P, Berkeley CA, USA).

Posterior a la incubación con los anticuerpos primarios, se realizaron seis lavados de 10 min cada uno con PBS para retirar el exceso de anticuerpo. Se realizó un segundo bloqueo con suero de cabra al 10% por 30 minutos. Después del bloqueo, se retiró el suero de cabra al 10% y los tejidos fueron expuestos a anticuerpos secundarios, se incubaron por una hora a temperatura ambiente y posteriormente a 4°C durante toda la noche. En este proceso siempre se cubrieron las muestras para protegerlas de la luz. Los anticuerpos secundarios utilizados fueron anti-IgG de ratón acoplado a Alexa 488 (Invitrogen, A11029, Carlsbad CA, USA), anti-IgG de conejo acoplado a Alexa 488 (Invitrogen, A11034, Carlsbad CA, USA), anti-IgG de oveja acoplado a Alexa 488 (Invitrogen, 11015, Carlsbad CA, USA), anti-IgG de ratón acoplado a Cy3 (Jackson-IR, 715166151, West Grove PA, USA) y anti-IgG de conejo acoplado a Cy3 (Jackson-IR, 711165152, West Grove PA, USA), todos en concentraciones 1:1000 y diluidos en PBS. El control de la inmunotinción se realizó omitiendo el anticuerpo primario.

Posteriormente se realizaron seis lavados de 10 min cada uno con PBS, para retirar el exceso de anticuerpo secundario que no se logró acoplar. Para el montaje de los cerebros, éstos se cortaron a lo largo de su línea media dorsal y ventral para obtener dos hemisferios los cuales se montaron sobre portaobjetos con una pequeña gota de aproximadamente 30 μ l de DABCO-glicerol [DABCO 1%(Sigma, D-2522), glicerol 90%]. El mismo procedimiento se realizó para el montaje de los cerebros de los embriones cultivados exo-útero.

6.4 Cortes histológicos

Se utilizaron embriones control E12.5 y E13.5, además de embriones E12.5 incubados exo-útero por 24 horas. Los embriones fueron fijados en PFA 3.5% a 4°C por 18 horas. Posteriormente se crioprotegieron en PBS con sacarosa al 30% por 18 horas a 4°C. Después se colocaron en una mezcla 1:1 de sacarosa al 30% en PBS y Tissue Tek (Sakura Finetek Inc., Torrance CA, USA) por una hora a temperatura ambiente. A continuación se colocó el embrión en un pequeño recipiente cuboidal

con Tissue Tek y se congeló en hielo seco. Una vez formado el bloque, se colocó en un criostato marca Leica, modelo CM 3050. Los cortes se realizaron de manera coronal y de un grosor de 16 μm , luego fueron colocados en portaobjetos Superfrost Plus (VWR, 48311-703, Batavia IL, USA), dejándolos secar a temperatura ambiente por una hora. Posteriormente se lavaron 3 veces con PBS por cinco minutos cada lavado. Se bloquearon con suero de cabra al 5 % (GIBCO, 16210-072, Carlsbad CA, USA) por 30 minutos. Después los cortes se expusieron a anticuerpos primarios diluidos en PBS con Tritón X-100 al 0.3% (JT Baker, BK-x198-07), incubándolos por 18 horas a 4°C. Al término de la incubación, las muestras fueron lavadas cuatro veces con PBS por cinco minutos cada una y se realizó un segundo bloqueo con suero de cabra al 5% por 30 minutos. Posterior al bloqueo, se retiró el suero de cabra al 5% y se incubaron las muestras a temperatura ambiente con anticuerpos secundarios, todos a concentraciones 1:1000 en PBS durante una hora. Después de la incubación se realizaron 6 lavados con PBS para retirar el exceso de anticuerpo no acoplado. Finalmente, para observar al microscopio, se cubrieron las muestras con unas gotas de DABCO-glicerol (ver Anexo 3) y posteriormente se les colocó un cubreobjetos.

Los anticuerpos primarios utilizados para los cortes fueron anti-TH policlonal [1:250] (Pelfreeze, P60101-0, Rogers AK, USA) hecho en oveja y anti-Pitx3 policlonal [1:100] (Invitrogen, 38-2850, Carlsbad CA, USA) hecho en conejo. Los anticuerpos secundarios fueron anti-IgG de oveja acoplado a Alexa 488 (Invitrogen, 11015, Carlsbad CA, USA) y anti-IgG de conejo acoplado a Cy3 (Jackson-IR, 711165152, West Grove PA, USA).

6.5 Adquisición de imágenes

Las muestras se observaron en un microscopio confocal Nikon Eclipse E500 módulo PCM 2000 y las imágenes se obtuvieron con el software de captura Simple PCI (Compix media Inc., USA). También se utilizó el microscopio confocal Zeiss Axiovert 200 LSM 510 Meta- Multifotónico y las imágenes se obtuvieron con el software de captura LSM510 Meta (Zeiss, Alemania). Micrografías representativas de 3 experimentos independientes por grupo se procesaron posteriormente con el programa Adobe Photoshop CS2 (Adobe, San Jose, CA, USA) para el ajuste de brillo y contraste.

6.6 Análisis cuantitativo de la expresión de TH en el mesencéfalo de cerebros embrionarios cultivados bajo diferentes condiciones

Cerebros embrionarios de rata en E12.5 cultivados por 24 horas *in vitro* bajo diferentes condiciones (Material y Métodos 6.1) e inmunoteñidos con anti-TH, fueron utilizados para analizar de manera cuantitativa la expresión total de TH en el mesencéfalo. Para ello se capturaron imágenes panorámicas del mesencéfalo de los cerebros por medio de microscopía confocal (Material y Métodos 6.5) y las imágenes fueron analizadas utilizando el programa de procesamiento de imágenes imageJ (NIH, Bethesda, MD, USA). En el programa se midió el porcentaje de expresión de TH con respecto al área total del mesencéfalo. Se utilizó una muestra de 3 embriones por condición, incluyendo los embriones control de E12.5 y E13.5. La media, desviación estándar y el gráfico se realizó con el paquete estadístico Graphpad Prism 5 (Graphpad Software, La Jolla, CA, USA).

7. RESULTADOS

7.1 Análisis de la abundancia de células TH ectópicas en el mesencéfalo de cerebros cultivados *in vitro* en diferentes medios

Con el propósito de evaluar el efecto de los componentes del medio de cultivo sobre la aparición ectópica de células que expresan TH en el MD de cerebros embrionarios de rata cultivados *in vitro*, se realizaron cultivos con diferentes componentes por separado y en ausencia o presencia de la matriz de colágena (Material y Métodos 6.1). Posteriormente se realizaron inmunofluorescencias (IFs) en los cerebros cultivados para analizar la expresión de TH en el MD. Además, para corroborar que la expresión ectópica de TH era ocasionada por el cultivo *in vitro* de los cerebros, se realizaron IFs en cerebros de embriones E12.5 sin cultivar, los cuáles fueron utilizados como controles del inicio del cultivo. Por otra parte, embriones sin cultivar en E13.5 fueron utilizados como controles del término del cultivo (E12.5+24 horas).

El análisis por inmunofluorescencia reveló la presencia de células TH⁺ en el MD de cerebros cultivados en todos los diferentes medios de cultivo. También se observó expresión de TH en el MD de los cerebros que se cultivaron en medio DMEM con colágena y en los que se cultivaron sin colágena. Se pudo observar, sin embargo, una mayor abundancia de células ectópicas TH en el MD de cerebros cultivados en el medio con todos los componentes (medio completo), en comparación con los demás grupos. Por otra parte, cuando se comparó la expresión de TH en los cerebros cultivados con respecto a los controles, no se detectó expresión de TH en el MD de los cerebros control E12.5 y E13.5, únicamente se observó expresión en la zona ventral del mesencéfalo; sin embargo, en todos los cerebros cultivados, se observó poca o nula expresión de TH en el MV (Fig 5).

El análisis detallado de las micrografías reveló que las células TH del MD de los cerebros cultivados en las diferentes condiciones, presentaban características morfológicas similares; el cuerpo celular es redondeado, los procesos celulares difieren en longitud pero en su mayoría se encuentran orientados en dirección ventral (Fig 6 A"-C", 7 A"-C" y 8 A"-C").

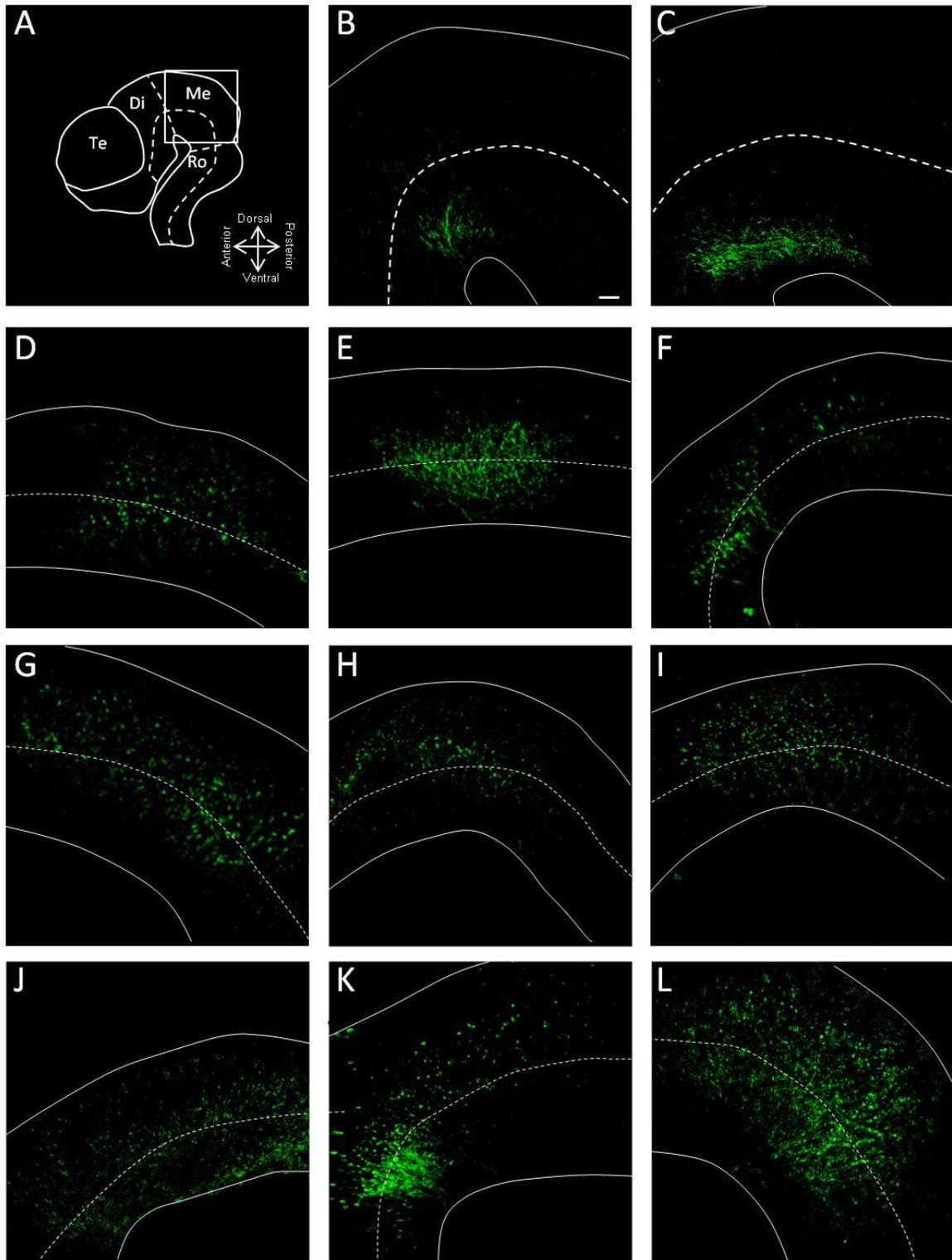


Figura 5. Expresión de TH en el mesencéfalo de cerebros embrionarios E12.5 cultivados por 24 horas bajo diferentes condiciones. A) Esquema de un neuroepitelio donde se muestra en el recuadro la localización y orientación del sitio correspondiente al mesencéfalo donde se tomaron las micrografías. La línea punteada corresponde al surco limitante, que divide al neuroepitelio en parte basal (ventral) y alar (dorsal). B) Inmunotinción para TH de un embrión control en E12.5 donde no se observa expresión ectópica de TH. C) Embrión control E13.5 donde tampoco hay expresión ectópica de TH. D) Colágena con medio neurobasal, L-glutamina y suero de cabra E) Colágena con medio neurobasal, B27 y suero de cabra. F) Colágena con medio neurobasal, N2 y suero de cabra. G) Colágena con medio neurobasal, ácido ascórbico y suero de cabra. H) Colágena con medio neurobasal sin suplementos. I) Colágena con suero de cabra. J) Colágena con medio DMEM. K) Medio DMEM sin colágena. L) Colágena con medio neurobasal, L-glutamina, B27, N2, ácido ascórbico y suero de cabra. Te, telencéfalo; Di, diencefalo; Me, mesencéfalo; Ro, romboencéfalo; TH, tirosina hidroxilasa. Barra de calibración 100 μ m.

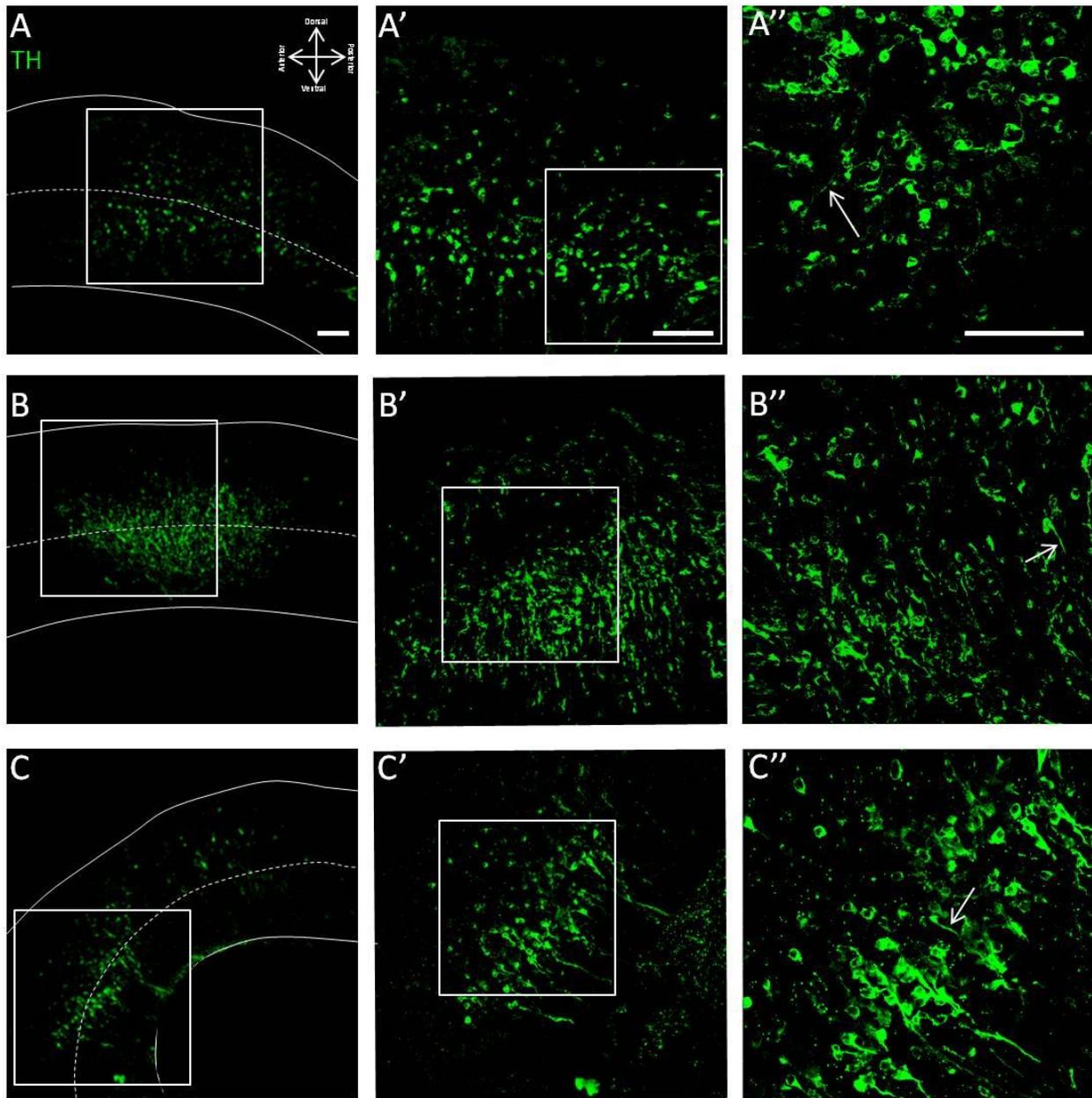


Figura 6. Micrografías de la región del mesencéfalo de los cerebros cultivados *in vitro* por 24 horas bajo diferentes condiciones. Se muestran inmunotinciones para TH de diferentes cultivos, donde en la primera columna (A, B y C) se muestra una vista panorámica del mesencéfalo, en la segunda columna (A', B' y C') la región del recuadro de la primera columna magnificado, en la tercera columna (A'', B'' y C'') se muestra una magnificación del recuadro de la segunda columna. Las flechas blancas señalan los procesos de las células, la mayoría de estos se orientan en dirección ventral. A-A'') Colágena con medio neurobasal, L-glutamina y suero de cabra. B-B'') Colágena con medio neurobasal, B27 y suero de cabra. C-C'') Colágena con medio neurobasal, N2 y suero de rata. Barras de calibración 100µm.

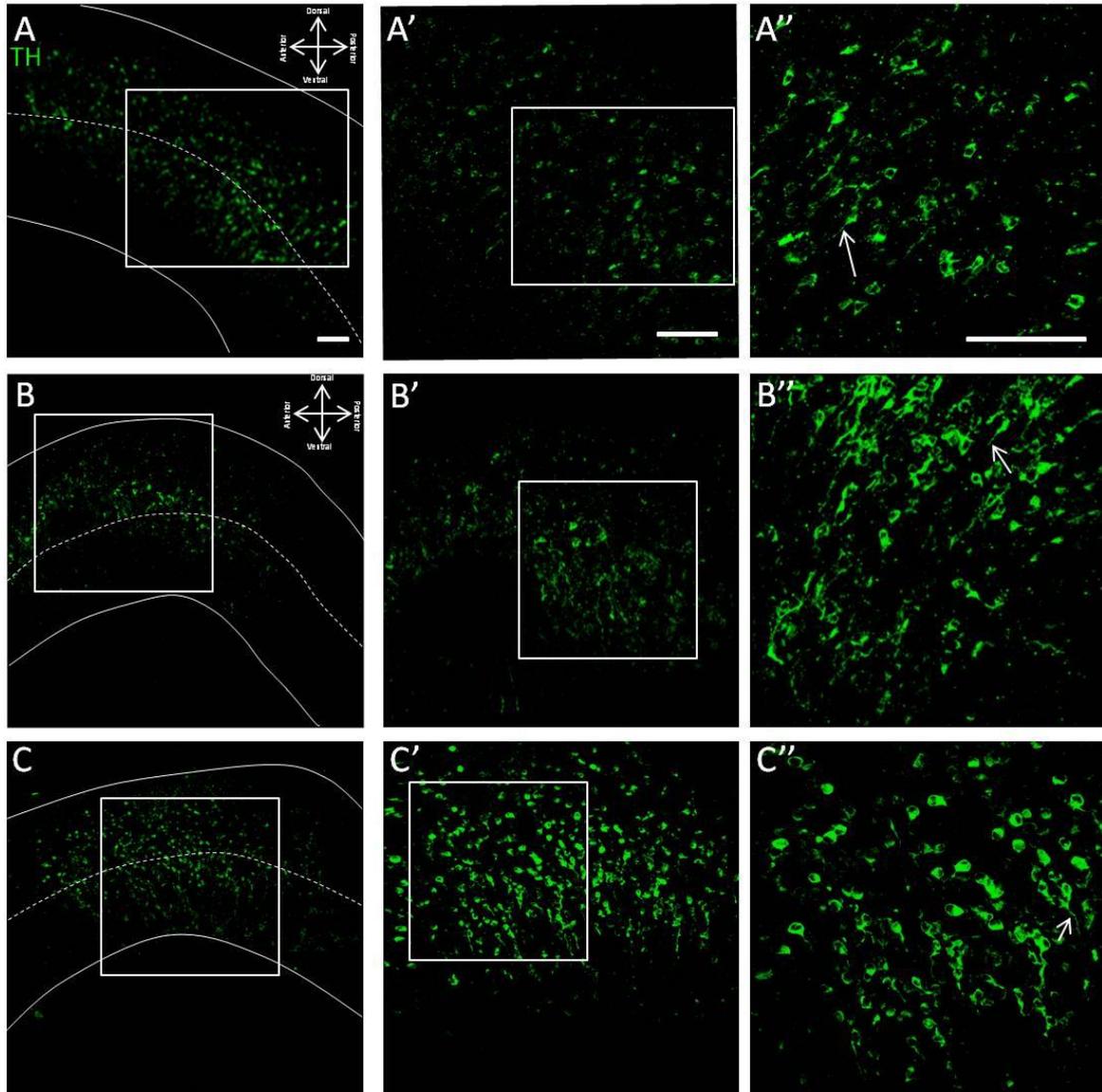


Figura 7. Micrografías de la región del mesencéfalo de los cerebros cultivados *in vitro* por 24 horas bajo diferentes condiciones. Se muestran inmunotinciones para TH de diferentes cultivos. En la primera columna (A, B y C) se muestra una vista panorámica del mesencéfalo. En la segunda columna (A', B' y C') se observa la región de recuadro de la primera columna en mayor aumento. En la tercera columna (A'', B'' y C'') se muestra la región del recuadro de la segunda columna amplificado. La flechas blancas señalan los procesos de las células, la mayoría de estos se orientan en dirección ventral. A-A'') Colágena con medio neurobasal, ácido ascórbico y suero de rata. B-B'') Colágena con medio neurobasal sin suplementos. C-C'') Colágena con suero de cabra. Barras de calibración 100 μ m.

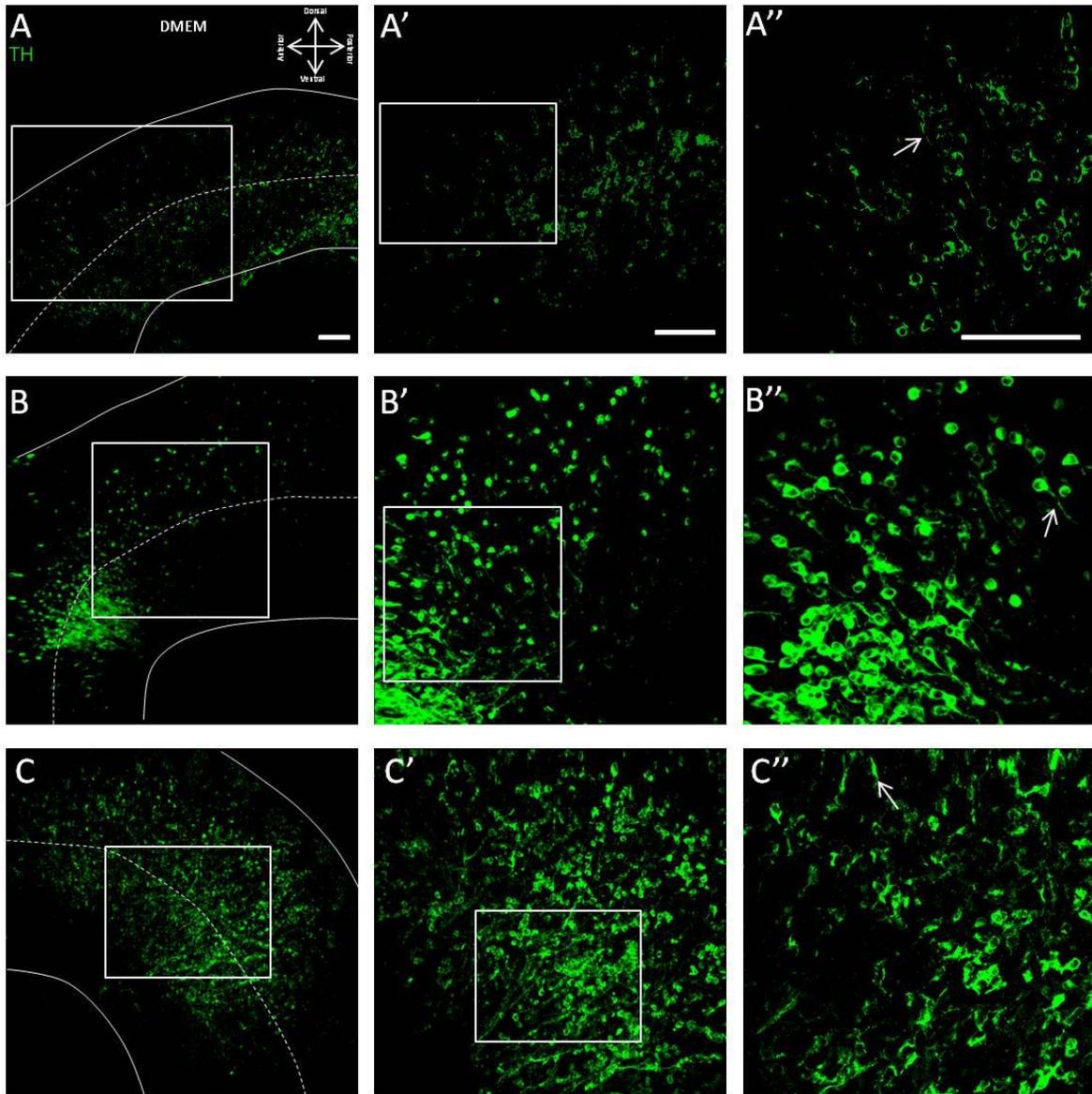


Figura 8. Micrografías de la región del mesencéfalo de los cerebros cultivados *in vitro* por 24 horas bajo diferentes condiciones. Se muestran inmuntinciones para TH de diferentes cultivos, donde en la primer columna (A, B y C) se muestra una vista panorámica del mesencéfalo. En la segunda columna (A', B' y C') se observa la región de recuadro de la primera columna amplificado. En la tercera columna (A'', B'' y C'') se muestra la región del recuadro de la segunda columna amplificado. La flechas blancas señalan los procesos de las células, la mayoría de estos se orientan en dirección ventral. A-A'') Mesencéfalo de un cerebro cultivado en colágena con medio DMEM. B-B'') Medio DMEM sin colágena. C-C'') Colágena con medio neurobasal con L-glutamina, B27, N2, ácido ascórbico y suero de cabra. Barras de calibración 100µm.

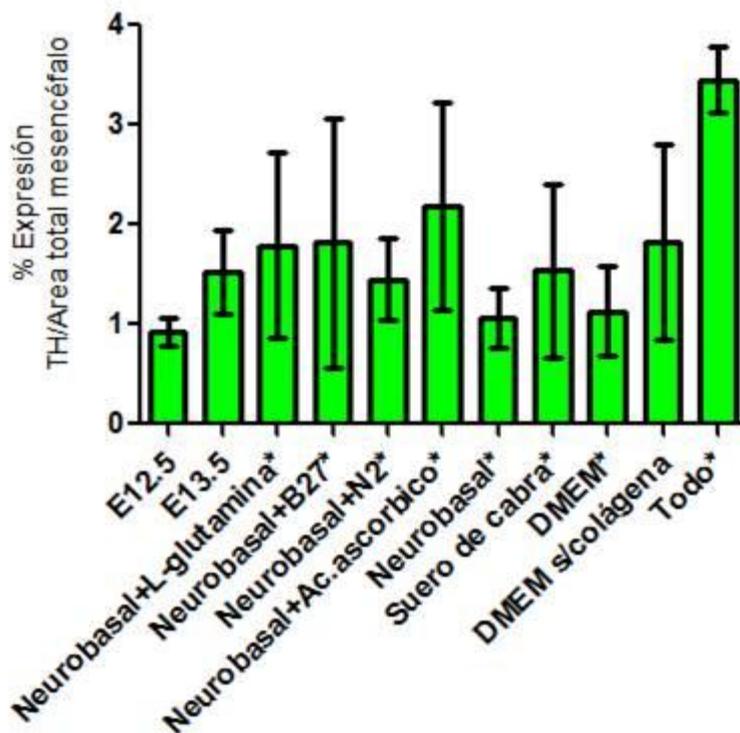


Figura 9. Análisis cuantitativo de la expresión de TH en el mesencéfalo de cerebros cultivados *in vitro* bajo diferentes condiciones por 24 horas. Se muestra en la gráfica el porcentaje de expresión de TH respecto al área total del mesencéfalo, observándose mayor expresión en los cerebros cultivados con Todo (Neurobasal, L-glutamina, B27, N2, ácido ascórbico y suero de cabra).*Indica los cerebros que fueron cultivados con colágena. Barras de error= \pm desviación estándar. n=3 experimentos independientes.

El análisis cuantitativo reveló que los cerebros cultivados con el medio completo (medio neurobasal con L-glutamina, B27, N2, ácido ascórbico y suero de cabra), fueron los que presentaron mayor expresión de TH (Fig. 9). Además se observó menor variabilidad en este grupo, ya que la desviación estándar es menor en comparación con los demás grupos.

Los resultados del análisis cuantitativo y de las micrografías, revelaron que la expresión de TH en el MD se ve influenciada por el cultivo de los cerebros *in vitro*, ya que no se observó expresión ectópica de TH en los cerebros control sin cultivar. Sin embargo, también revelan un efecto aditivo de los componentes del medio sobre la expresión de TH. Esto, debido a que el cultivo de los cerebros con el medio completo, parece favorecer la aparición de células TH en el MD o ayuda a incrementar la supervivencia de éstas células en comparación con los cultivos con los componentes por separado, donde su expresión se ve disminuida. Con base en estos hallazgos, los análisis subsecuentes se llevaron a cabo usando el medio completo en colágena.

7.2 Caracterización del fenotipo catecolaminérgico de las células TH ectópicas del mesencéfalo dorsal

Para analizar el fenotipo catecolaminérgico de las células TH⁺ del MD, se realizaron dobles IFs, para observar la expresión de TH y de la enzima dopamina β Hidroxilasa (DBH). La enzima DBH es característica de las neuronas noradrenérgicas y es importante en la síntesis del neurotransmisor NA. Las IFs se realizaron en los cerebros cultivados en colágena y en cerebros de embriones de rata E12.5 incubados exo-útero por 24 horas ya que en estos últimos, también se había observado expresión de TH en el MD.

Para el análisis de la expresión de TH y DBH, se dividió al mesencéfalo dorsal en tres regiones a lo largo de su eje longitudinal. La región del Mesencéfalo Dorsal Anterior (MDA) es la región más anterior e inicia en la división entre el diencéfalo y mesencéfalo. Adyacente y caudal a esta región se ubica la región que denominamos Mesencéfalo Dorsal Intermedio (MDI) y finalmente, caudal a ésta se localiza la denominada Mesencéfalo Dorsal Posterior (MDP) que contiene los colículos inferiores y tiene su límite posterior en el istmo. En ningún nivel anatómico del mesencéfalo dorsal de los embriones control se detectó expresión de TH o de DBH. En cambio, sí se observó expresión de TH en el mesencéfalo dorsal tanto en los cerebros cultivados en colágena como en los embriones incubados exo-útero. En ninguno de éstos, sin embargo, hubo expresión de DBH. También se encontró que la morfología de las células TH del MD de los embriones incubados exo-útero, es muy similar a la de los cerebros cultivados en colágena. Estas células presentan un cuerpo celular redondeado y un proceso celular orientado hacia el mesencéfalo ventral (Fig. 10). Con el propósito de determinar si la ausencia de DBH en las células TH⁺ del MD se debía a que el MD no es un sitio de expresión normal de DBH y no a un efecto ocasionado por el sistema de cultivo, se analizó la expresión de DBH en el Locus Ceruleus (LC), núcleo noradrenérgico ubicado en la rombómera 1 del romboencéfalo. Los resultados revelaron que no hay expresión de DBH en el LC de los cerebros cultivados o en los embriones incubados exo-útero (Fig, 11 D-D" y E-E"). En cambio sí se encontró expresión de DBH en el LC de los embriones control E12.5 y E13.5, además de que se pudieron observar células TH⁺ que colocalizaban con células DBH⁺ (Fig. 11 B-B" y C-C"). Estos resultados revelaron que existe una

alteración en la expresión de DBH tanto en los cerebros cultivados como en los embriones incubados exo-útero.

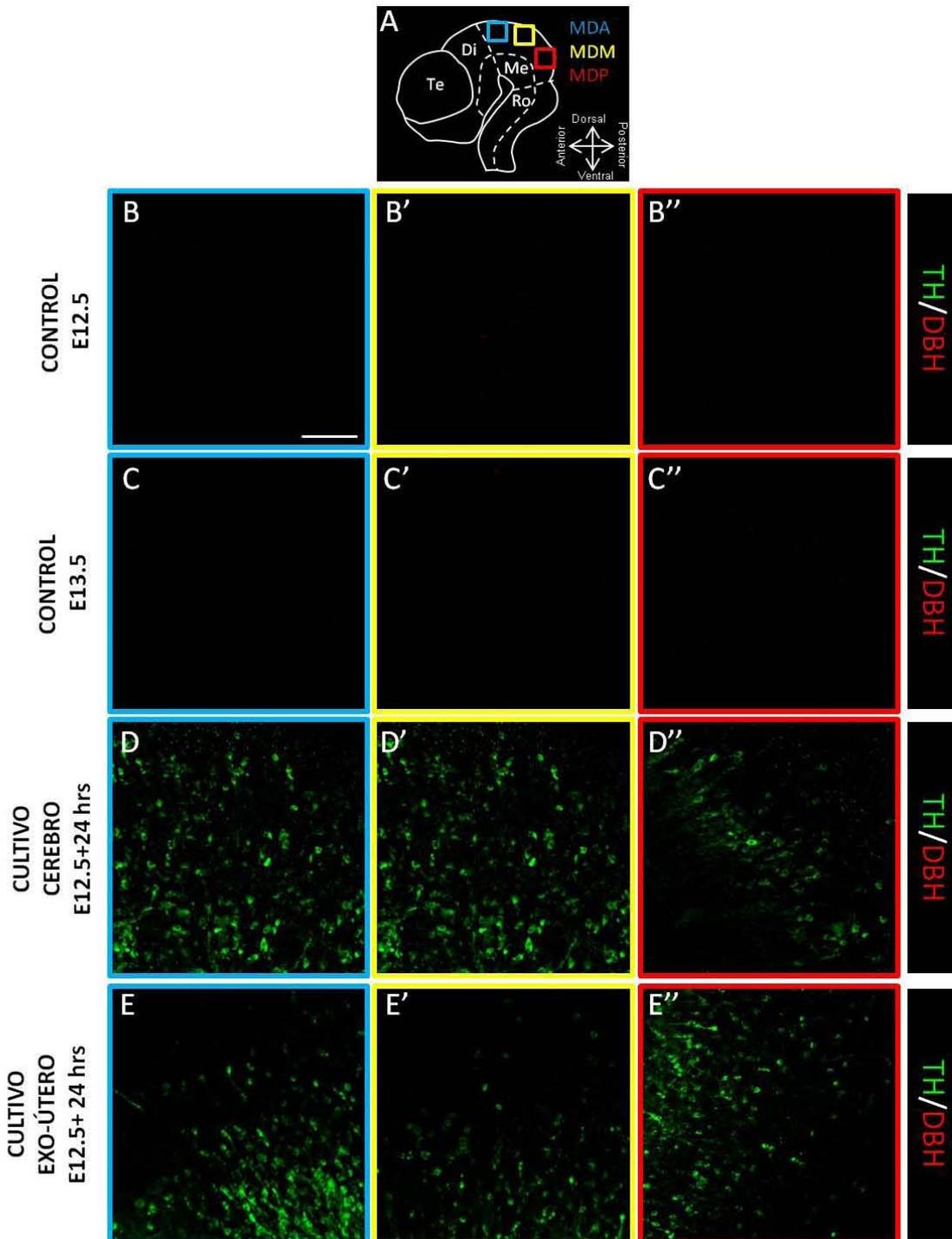


Fig 10. Análisis de la expresión de TH y DBH en diferentes niveles anatómicos del mesencéfalo dorsal de cerebros cultivados en colágena y embriones incubados exo-útero por 24 horas. A) Esquema que muestra la región donde se tomó la micrografía con respecto al neuroepitelio completo. Se muestra en la primera columna (azul), la región correspondiente al Mesencéfalo Dorsal Anterior (MDA), en amarillo la región correspondiente al Mesencéfalo Dorsal Medial (MDM) y en rojo el Mesencéfalo Dorsal Posterior (MDP). B-B'') Inmutinción para TH y DBH de embriones control E12.5. C-C'') Embriones control E13.5. D-D'') Cultivo de cerebro en colágena. E-E'') Incubación exo-útero. TH, Tirosina Hidroxilasa; DBH, Dopamina β Hidroxilasa; Te, Telencéfalo; Di, Diencefalo; Me, Mesencéfalo; Ro, Romboencéfalo. Barra de calibración: 100 μ m.

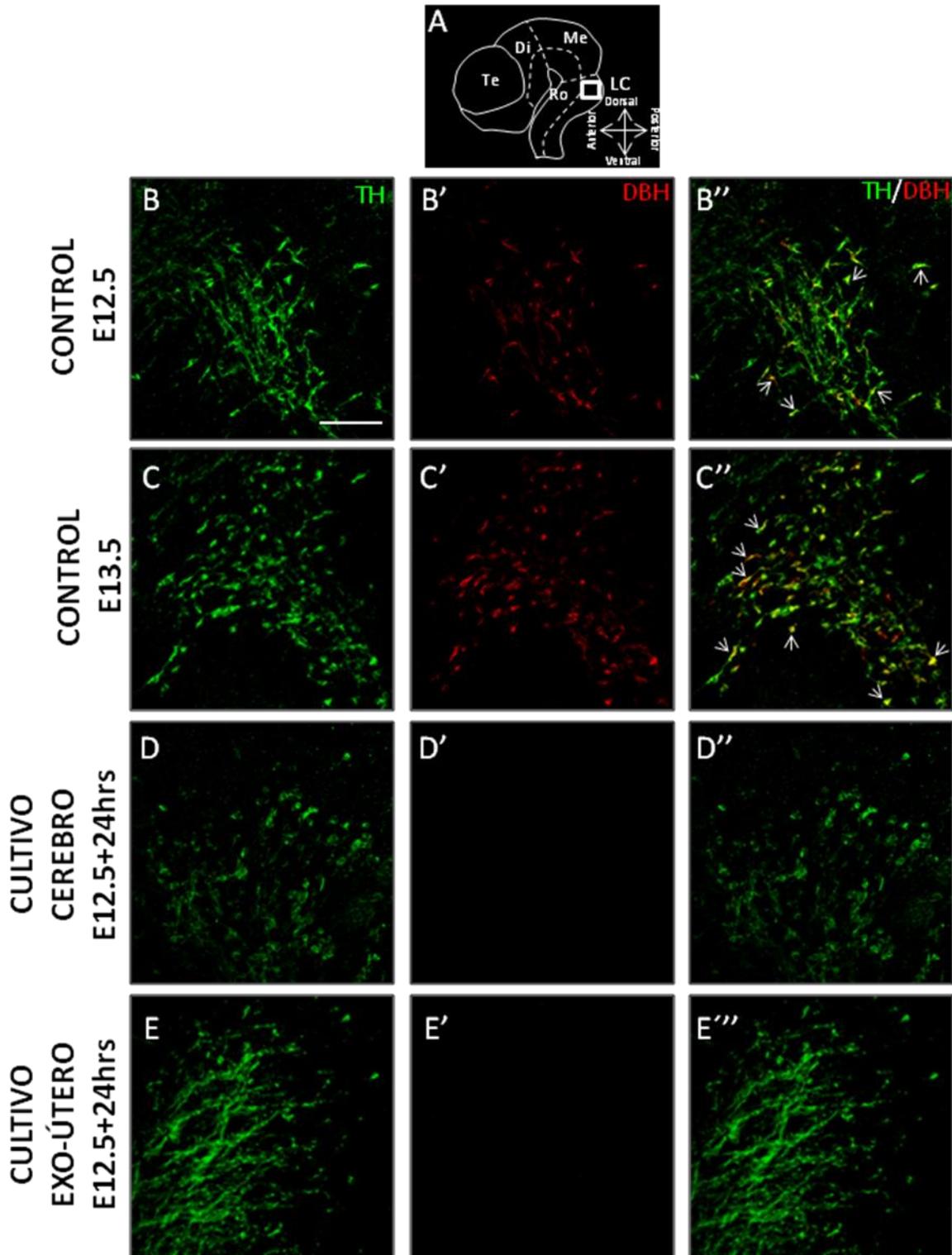


Fig 11. Expresión de TH y DBH en el Locus Coeruleus (LC) de cerebros cultivados en colágena y embriones incubados exo-útero por 24 horas. A) Muestra la región correspondiente a la ubicación LC dentro del neuroepitelio. B-B'') LC de un embrión control E12.5 donde se observan células en donde colocalizan TH y DBH (flechas). C-C'') LC de un embrión control E13.5 donde se observa mayor número de células en donde hay co-localización de TH y DBH (flechas) con respecto al control E12.5. D-D'') LC de un explante de cerebro embrionario donde se observa expresión de TH, mas no así de DBH. E-E'') LC de un embrión cultivado exo-útero donde se observa expresión de TH, mas no así de DBH. Barra de calibración 100µm.

7.3 Análisis de la expresión de β -III tubulina en células TH ectópicas del mesencéfalo dorsal

Para analizar la expresión de marcadores neuronales en las células TH del MD, se llevó a cabo un análisis por medio de IFs de la expresión de β -III tubulina. En los cerebros cultivados en colágena se observaron alteraciones notables en la orientación y dirección de las fibras axonales del mesencéfalo (Fig.12 D) en comparación con los cerebros control E12.5 y E13.5. En cambio, entre los embriones incubados exo-útero y los controles no se observaron diferencias en la morfología de las fibras axonales (Fig. 12 E).

Por ello, los estudios siguientes se realizaron con los cerebros de los embriones incubados exo-útero (ya que no presentaban las alteraciones morfológicas observadas en los cerebros cultivados en colágena). Entonces, con la finalidad de comprobar si las células TH⁺ eran neuronas, se realizaron dobles IFs para TH y β -III tubulina.

Los resultados de las IFs, revelaron que algunas de las células ectópicas TH del MD aparentemente también expresaban β -III tubulina (Fig. 13 B, C y D). Con la finalidad de corroborar si había expresión de β -III tubulina en las células TH ectópicas, se realizó un estudio más fino de las micrografías obtenidas en el microscopio confocal. Esto se logró por medio del análisis de las proyecciones ortogonales de las micrografías obtenidas por microscopia confocal, las cuales permiten visualizar la muestra en tres diferentes planos (Fig 13 B', C' y D'). Los resultados revelaron que los procesos de las células TH se encontraban asociados a fibras β -III tubulina provenientes de neuronas cuyos cuerpos celulares se encuentran en el tectum del mesencéfalo (flechas en Fig. 13 C' y D'). Además, se observó que las células TH que no se encontraban asociadas a fibras β -III tubulina, únicamente presentaban el pseudocolor correspondiente a la expresión de TH (flecha Fig. 13 B'). Estos hallazgos indican que las células TH del MD no expresan β -III tubulina, aunque no se descarta la posibilidad de que este marcador se exprese posteriormente.

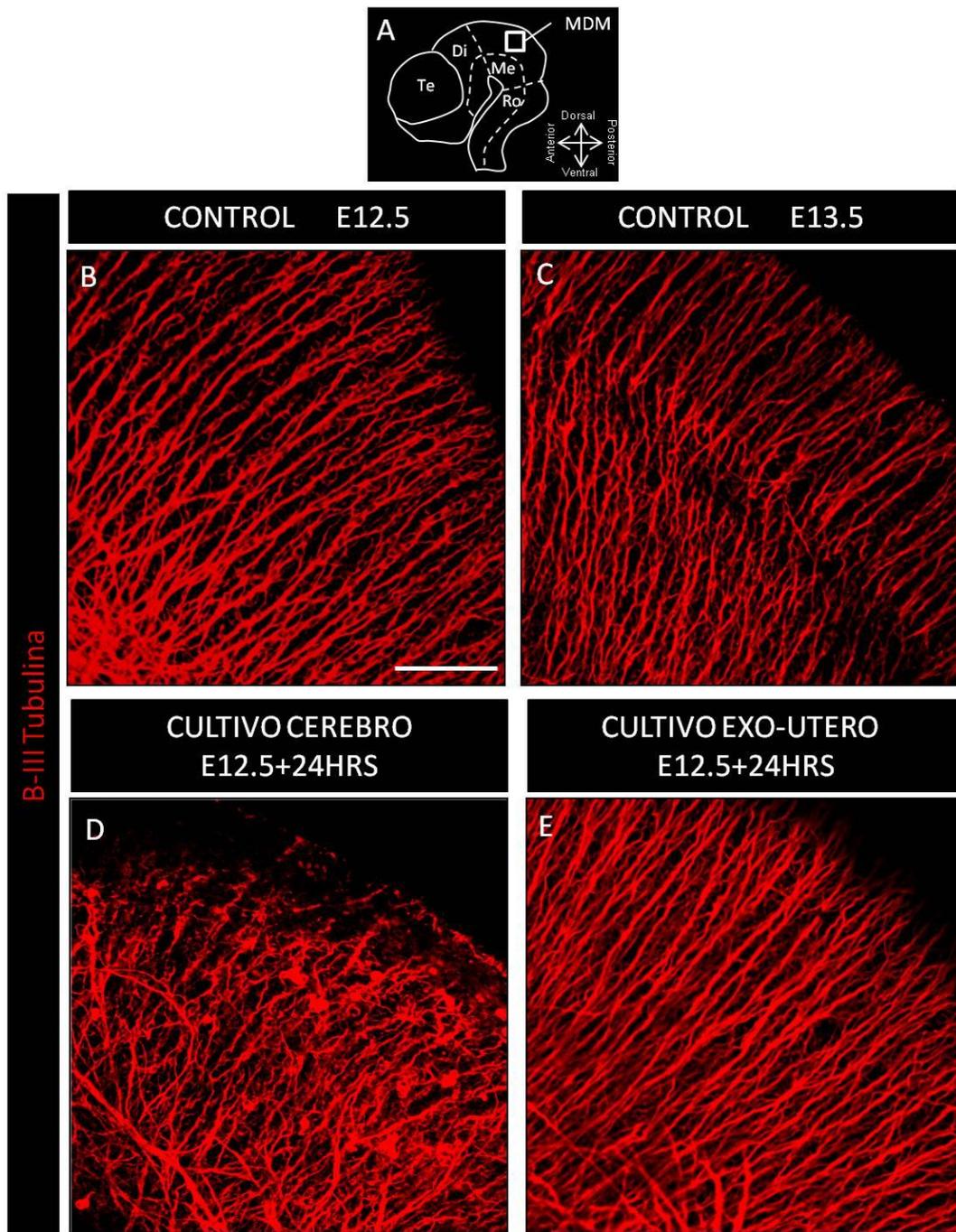


Figura 12. Expresión de β -III tubulina en el Mesencéfalo Dorsal Medial (MDM). A) Esquema que muestra la región del neuroepitelio donde se tomó la micrografía. B-D) Regiones del MDM de un embrión control E12.5 (A), embrión control E13.5 (B), cerebro cultivado en colágena (D) y embrión completo incubado exo-útero (E). Se observa que el acomodo de las fibras β -III tubulina⁺ es muy similar al de las fibras de los controles E12.5 y E13.5, sin embargo para el caso del cerebro cultivado en colágena (D), se puede observar un desarreglo de las fibras. Te, Telencéfalo; Di, Diencefalo; Me, Mesencéfalo; Ro, Romboencéfalo. Barra de calibración: 100 μ m.

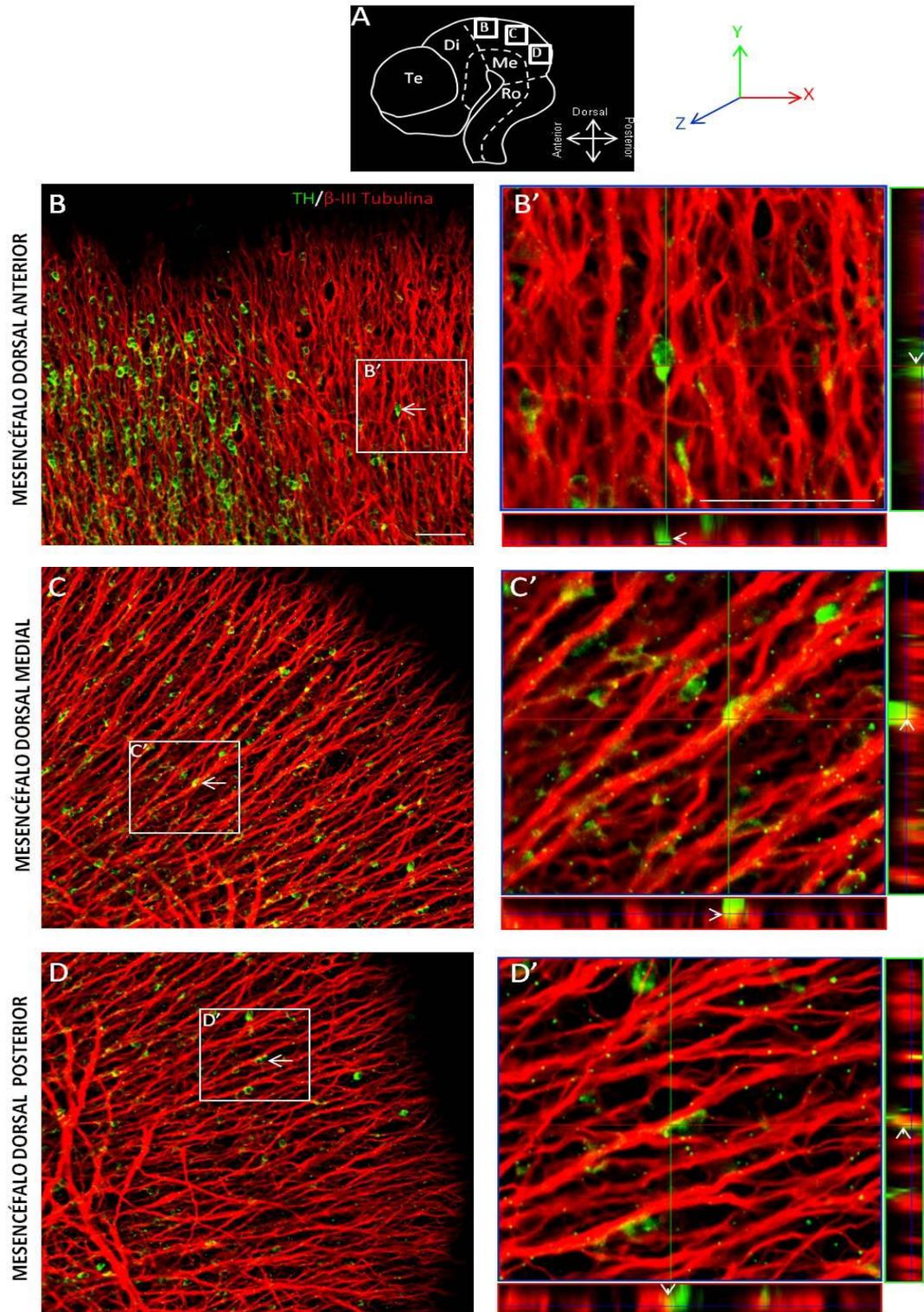


Figura 13. Análisis de la expresión de β -III tubulina en células TH⁺ del mesencéfalo dorsal (MD) generadas en embriones incubados exo-útero por 24 hrs. A) Esquema que muestra la región del neuroepitelio donde se tomó la micrografía. B) Mesencéfalo Dorsal Anterior (MDA) donde se observa en B' una proyección ortogonal de la región amplificada en B, las cabezas de flecha indican la intersección del eje X con el eje Y, además la célula TH⁺ se observa completamente verde, debido a que no se encuentra asociada a ninguna fibra β -III tubulina⁺. C) Mesencéfalo Dorsal Medial (MDM) donde se observa en C' una proyección ortogonal de la región amplificada en C, la cabeza de flecha señala una célula TH⁺ asociada a una fibra β -III tubulina⁺. D) Mesencéfalo Dorsal Posterior (MDP) donde se observa en D' la proyección ortogonal de la región amplificada en D, donde la cabeza de flecha señala la parte de la célula TH⁺ que se encuentra asociada a la fibra β -III tubulina⁺ y se puede ver en color amarillo, a diferencia de la parte que no se encuentra asociada a la fibra y se observa en color verde. En B, C y D la flecha blanca señala la célula TH⁺ donde se intersecan los ejes X (línea roja) e Y (línea verde) en la proyección ortogonal. Barra de calibración: 100 μ m.

7.4 Análisis de la expresión de Pitx3 en las células TH ectópicas del mesencéfalo dorsal

Con la finalidad de comprobar si las células TH⁺ del MD presentaban identidad dopaminérgica mesencefálica, se analizó la expresión de Pitx3 por medio de IFs. Se utilizaron cerebros de embriones incubados exo-útero y embriones control E12.5 y E13.5. En los resultados se observó colocalización de Pitx3 con algunas células TH⁺ del mesencéfalo ventral, tanto en los embriones control E12.5 (Fig.14 B), como en los E13.5 control (Fig. 14 C). Además, en los embriones incubados exo-útero también hubo presencia de células Pitx3⁺/TH⁺ (Fig. 14 D).

En lo que respecta a la región del mesencéfalo dorsal, no se encontró expresión ni de TH ni de Pitx3 en los embriones control E12.5 y E13.5 (Fig. 14 B' y C'). Por otro lado, en los embriones incubados exo-útero se observaron células ectópicas TH⁺, aunque es importante señalar que no hubo presencia de Pitx3 en todo el MD (Fig. 14 D').

Los resultados revelaron que la expresión de Pitx3 se mantiene en el mesencéfalo ventral de los embriones incubados exo-útero, además de que algunas células Pitx3⁺ colocalizan con TH. Sin embargo, en la parte dorsal del mesencéfalo no se encontró presencia de Pitx3 aunque sí de células TH⁺. Estos resultados sugieren que las células ectópicas TH⁺ no presentan identidad dopaminérgica mesencefálica, pero tampoco se descarta la posibilidad de que estas células pudieran expresar Pitx3 posteriormente.

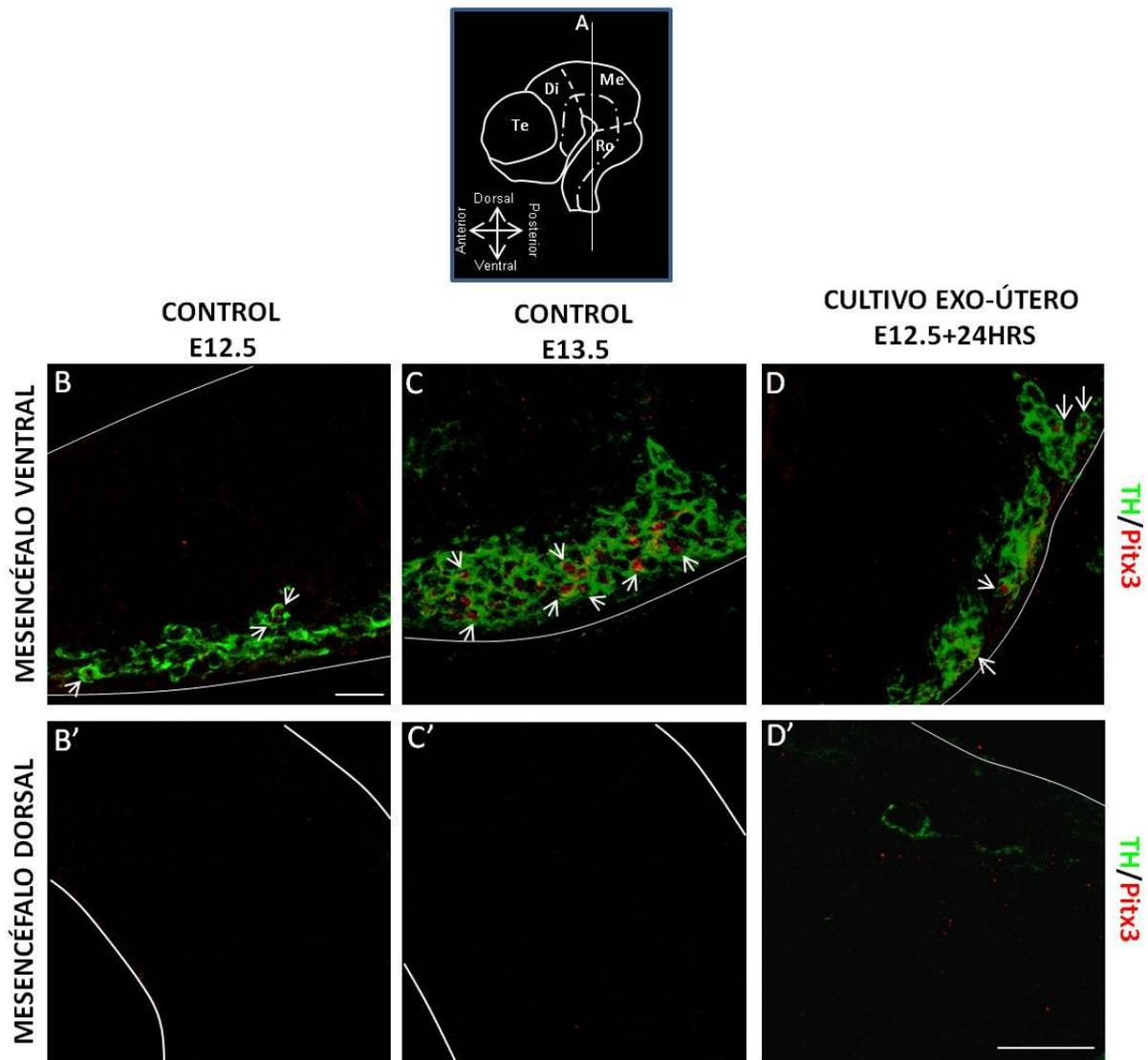


Figura 14. Análisis de la expresión de TH y Pitx3 en el Mesencéfalo Ventral (MV) y Mesencéfalo Dorsal (MD). A) Esquema de la región del neuroepitelio donde se realizó el corte histológico de manera coronal incluyendo la región del MV y MD. B-B') Embrión control E12.5 en el cual se observa la región del MV donde algunas células TH⁺ colocalizan con Pitx3 (flechas blancas), no así en el MD donde no hay expresión de ni de TH ni de Pitx3. C-C') Control E13.5 donde se observa mayor número de células TH⁺ colocalizando con Pitx3 (flechas blancas), sin embargo no se observa expresión ni de TH ni de Pitx3 en el MD. D-D') Embrión incubado exo-útero por 24 hrs, donde se observan algunas células TH⁺ colocalizando con Pitx3 en el MV (flechas blancas), mientras que en el MD se observa una célula TH⁺ ectópica pero que no colocaliza con Pitx3. TH, Tirosina Hidroxilasa; Di, Diencefalo; Me, Mesencéfalo; Ro, Romboencéfalo. Barras de calibración: 20 μm.

8. DISCUSIÓN

8.1 Aparición de células TH en el mesencéfalo dorsal de cerebros embrionarios cultivados *in vitro*

El inicio de la expresión de TH en los núcleos A8-A10, ocurre aproximadamente en E10.5 en ratón y E12 en rata (Shults et al., 1990). En estudios realizados en ratones transgénicos y por medio de HIS, se ha analizado la ontogenia de las neuronas mDA, encontrando expresión de TH en zonas dorsales del mesencéfalo de ratón en E9.5, siendo en rata E11.5 el estadio equivalente (Son et al., 1996; Marin et al., 2005). Sin embargo, la presencia de TH en el MD es transitoria y no se observa en estadios posteriores ni en el cerebro adulto, además de que estas poblaciones no fueron caracterizadas.

En el presente trabajo, se describe la aparición de células TH ectópicas en la parte dorsal del mesencéfalo, en cerebros de embriones de rata en E12.5 que fueron cultivados por 24 horas en diferentes medios de cultivo. La inducción de la expresión de TH en células del MD parece no estar directamente relacionada con los componentes del medio de cultivo, ya que en los cerebros cultivados con los componentes por separado también se encontraron células TH en el MD. Estos resultados descartan la posibilidad de que tanto los medios de cultivo como la colágena estuvieran influyendo de manera relevante en la expresión de TH en el MD. Sin embargo, cuando se cultivaron los cerebros embrionarios con el medio conteniendo todos los componentes, se observó mayor número de células TH en el mesencéfalo así como una amplia distribución.

Se ha reportado que la adición de ácido ascórbico incrementa la supervivencia de células precursoras dopaminérgicas en cultivo, posiblemente debido a su efecto antioxidante (Yan et al., 2001; Volpicelli et al., 2004; Maciaczyk et al., 2008).

De igual manera, se ha visto que la adición de suplementos como N2 y B27 al medio de cultivo NB (medio utilizado especialmente para cultivos de células de tipo neuronal), incrementan el crecimiento y supervivencia de neuronas post-mitóticas. El suplemento N2 contiene transferrina humana, insulina recombinante, progesterona,

putrescina y selenito, así como vitaminas. Por su parte, el suplemento B27, además de los elementos mencionados para N2, también contiene catalasa, superóxido dismutasa. En particular B27 incrementa la supervivencia y mantenimiento de neuronas cultivadas *in vitro* provenientes de la sustancia nigra (Brewer, 1995). Esto sugiere que la utilización del medio completo conteniendo todos los componentes favorece la supervivencia de las células TH del MD, y resulta en mayor abundancia de células TH ectópicas en los cerebros cultivados en este medio.

8.2 El cultivo *in vitro* de los cerebros y embriones completos favorece la expresión ectópica de TH en el mesencéfalo dorsal, no así la expresión del marcador noradrenérgico DBH

Las células ectópicas encontradas en los dos sistemas de cultivo son positivas a TH pero negativas a DBH. Cabe mencionar que tampoco se observó expresión de DBH en regiones de expresión normal de la enzima, como lo sería el locus ceruleus (LC), el cual se encuentra ubicado en la rombómera 1 del romboencéfalo y es el principal núcleo noradrenérgico del sistema nervioso central (Aroca et al., 2006). Estos resultados indican que en los dos sistemas de cultivo se produce un efecto inhibitor específico en la expresión de DBH en toda esta zona sugiriendo que la diferenciación terminal de estas neuronas (de TH a DBH) se ve alterada por las condiciones “medioambientales” del cultivo, generando quizás alteraciones en la disponibilidad de oxígeno, factores parácrinos, etc.

Así, por ejemplo, mediante la utilización de células tipo I del cuerpo carotideo, células cromafines de la médula adrenal y células de una línea clonal derivada de feocromocitoma PCL2, se ha visto que en condiciones de hipoxia, la expresión de TH se ve incrementada (Norris y Millhorn, 1995; Schnell et al., 2003). Según estos estudios, el incremento en la expresión de TH se debe a un mecanismo que involucra la activación de factores de transcripción inducidos por hipoxia o HIFs (por sus siglas en inglés), los cuales interactúan con un elemento responsivo a hipoxia (HRE) en la región 5' proximal del promotor del gen de TH, estimulando la expresión del gen, además de incrementar la estabilidad del mRNA correspondiente (Schnell et al., 2003; Kvetnansky et al., 2009). Por otra parte, el promotor de DBH carece de un

HRE, por lo tanto su expresión en este caso no puede ser inducida por hipoxia (Kvetnansky, 2009).

8.4 Células ectópicas TH del mesencéfalo dorsal se encuentran asociadas a fibras β -III tubulina

La expresión de β -III tubulina indica un cierto grado de maduración neuronal, ya que esta proteína es característica de axones maduros o en proceso de maduración (Baizabal y Covarrubias, 2009). Los progenitores mesencefálicos dopaminérgicos empiezan a expresar β -III tubulina conforme se vuelven células postmitóticas (Gale y Li, 2008). Lo observado en el presente trabajo indica que las células TH⁺ ectópicas del MD no colocalizan con este marcador neuronal, lo cual podría deberse a que se encuentran en proceso de maduración. Quizás si el tiempo de cultivo se prolongara, se podría observar expresión de β -III tubulina en estas células.

Otra observación importante fue el de la morfología de las células TH⁺ ectópicas del MD, presentando un soma ovalado y un proceso celular orientado en dirección ventral. Dicha morfología es similar a la de neuronas en migración (Marin et al., 2006). Cuando se realizó un análisis más fino de los resultados por medio de proyecciones ortogonales, encontramos que algunas células TH⁺ se encontraban asociadas a fibras β -III tubulina⁺ provenientes de la región dorsal del mesencéfalo y que probablemente corresponden a neuronas que forman parte del núcleo mesencefálico del V par craneal o trigémino, ubicado a lo largo de la región dorsal del mesencéfalo (Mastick y Easter, 1996; Chedotal y Richards, 2010). Estos datos sugieren una posible migración neurofílica de estas células, utilizando como sustrato axones y fibras del TmesV, aunque debido al tiempo en el que se observa su aparición, no se sabe si realmente estas células se desplazan a otros sitios dentro del neuroepitelio o si simplemente su presencia es transitoria.

8.5 Células TH ectópicas del mesencéfalo dorsal no expresan el marcador mesencefálico dopaminérgico Pitx3

Pitx3 es un factor de transcripción que durante el desarrollo del SNC se expresa exclusivamente en los precursores neuronales mesencefálicos dopaminérgicos a

partir de E12.5. Además, su expresión se mantiene hasta la adultez, tanto en humanos como en roedores (Smidt et al., 1997). En etapas tempranas del desarrollo, primero se expresa en los precursores neuronales que darán lugar a la SNpc en la región ventrolateral, los cuales posteriormente expresan TH. Por otra parte, en la región dorsomedial correspondiente al VTA, primero se expresa TH y posteriormente Pitx3. Sin embargo, en estadios posteriores como E13.5 y E14.5 la mayoría de las células en estas regiones ya son Pitx3⁺/TH⁺ (Maxwell et al., 2005). Esta heterogeneidad sugiere que la expresión de TH durante el desarrollo de las neuronas mDA en las etapas tempranas se da de manera dependiente (SNpc) e independiente (VTA) de Pitx3. También se ha sugerido que Pitx3 tiene un papel fundamental en la supervivencia de las neuronas mDA en etapas tardías del desarrollo y en la vida adulta (Smidt et al., 1997; Papanikolaou et al., 2009).

En nuestros estudios, se encontraron células Pitx3⁺/TH⁺ en la región ventral del mesencéfalo de los embriones incubados exo-útero, lo cual indica que la expresión de Pitx3 se mantiene de manera normal. Sin embargo no se encontró expresión de Pitx3 en las células TH ectópicas del MD. Estas observaciones sugieren que las células TH ectópicas podrían tener un fenotipo similar al de las neuronas mDA del VTA, expresando primero TH y posteriormente Pitx3 (Maxwell et al., 2005). Estudios posteriores con tiempos de incubación más prolongados, podrían ser relevantes para estudiar el fenotipo de estas células TH del MD.

9. CONCLUSIONES

El cultivo *in vitro* de cerebros embrionarios y la incubación exo-útero de embriones completos de rata de 12.5 días de gestación, induce expresión ectópica de TH en el mesencéfalo dorsal.

Las células TH ectópicas del MD observadas en los dos sistemas de cultivo no expresan DBH, pero tampoco hay expresión de la enzima en el LC. Esto sugiere un efecto negativo sobre la expresión de DBH ocasionado por los sistemas de cultivo.

Las células TH ectópicas generadas *in vitro* no expresan β -III tubulina, probablemente debido a que todavía son inmaduras.

10. REFERENCIAS

- Abeliovich, A. y R. Hammond. 2007. Midbrain dopamine neuron differentiation: factors and fates. *Dev Biol* 304(2): 447-454.
- Andersson, E., U. Tryggvason, Q. Deng, S. Friling, Z. Alekseenko, B. Robert, T. Perlmann y J. Ericson. 2006. Identification of intrinsic determinants of midbrain dopamine neurons. *Cell* 124(2): 393-405.
- Aroca, P., B. Lorente-Canovas, F. R. Mateos y L. Puelles. 2006. Locus coeruleus neurons originate in alar rhombomere 1 and migrate into the basal plate: Studies in chick and mouse embryos. *J Comp Neurol* 496(6): 802-818.
- Baizabal, J. M. y L. Covarrubias. 2009. The embryonic midbrain directs neuronal specification of embryonic stem cells at early stages of differentiation. *Dev Biol* 325(1): 49-59.
- Bayer, S. A., K. V. Wills, L. C. Triarhou y B. Ghetti. 1995. Time of neuron origin and gradients of neurogenesis in midbrain dopaminergic neurons in the mouse. *Exp Brain Res* 105(2): 191-199.
- Brewer, G. J. 1995. Serum-free B27/neurobasal medium supports differentiated growth of neurons from the striatum, substantia nigra, septum, cerebral cortex, cerebellum, and dentate gyrus. *J Neurosci Res* 42(5): 674-683.
- Chedotal, A. y L. J. Richards. 2010. Wiring the brain: the biology of neuronal guidance. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2(6): a001917.
- Di Porzio, U., A. Zuddas, D. B. Cosenza-Murphy y J. L. Barker. 1990. Early appearance of tyrosine hydroxylase immunoreactive cells in the mesencephalon of mouse embryos. *Int J Dev Neurosci* 8(5): 523-532.
- Echevarria, D., C. Vieira, L. Gimeno y S. Martinez. 2003. Neuroepithelial secondary organizers and cell fate specification in the developing brain. *Brain Res Brain Res Rev* 43(2): 179-191.
- Gale, E. y M. Li. 2008. Midbrain dopaminergic neuron fate specification: Of mice and embryonic stem cells. *Mol Brain* 1: 8.
- García Peña Acosta, CM. 2007. Estudio de la respuesta quimiotrópica de neuronas positivas a Hidroxilasa de tirosina generadas in vitro a partir de células troncales embrionarias. Tesis, Instituto de Neurobiología, UNAM campus Juriquilla.
- Hynes, M., J. A. Porter, C. Chiang, D. Chang, M. Tessier-Lavigne, P. A. Beachy y A. Rosenthal. 1995. Induction of midbrain dopaminergic neurons by Sonic hedgehog. *Neuron* 15(1): 35-44.
- Kandel, ER., Schwartz, JH y Jessell, TM. 2000. Principles of neural science. New York. McGraw-Hill.
- Kawano, H., K. Ohyama, K. Kawamura y I. Nagatsu. 1995. Migration of dopaminergic neurons in the embryonic mesencephalon of mice. *Brain Res Dev Brain Res* 86(1-2): 101-113.
- Kvetnansky, R., E. L. Sabban y M. Palkovits. 2009. Catecholaminergic systems in stress: structural and molecular genetic approaches. *Physiol Rev* 89(2): 535-606.
- Maciaczyk, J., I. Singec, D. Maciaczyk y G. Nikkhah. 2008. Combined use of BDNF, ascorbic acid, low oxygen, and prolonged differentiation time generates tyrosine hydroxylase-expressing neurons after long-term in vitro expansion of human fetal midbrain precursor cells. *Exp Neurol* 213(2): 354-362.
- Marin, F., M. T. Herrero, S. Vyas y L. Puelles. 2005. Ontogeny of tyrosine hydroxylase mRNA expression in mid- and forebrain: neuromeric pattern and novel positive regions. *Dev Dyn* 234(3): 709-717.
- Marin, O., M. Valdeolmillos y F. Moya. 2006. Neurons in motion: same principles for different shapes? *Trends Neurosci* 29(12): 655-661.
- Mastick, G. S. y S. S. Easter, Jr. 1996. Initial organization of neurons and tracts in the embryonic mouse fore- and midbrain. *Dev Biol* 173(1): 79-94.

- Maxwell, S. L., H. Y. Ho, E. Kuehner, S. Zhao y M. Li. 2005. Pitx3 regulates tyrosine hydroxylase expression in the substantia nigra and identifies a subgroup of mesencephalic dopaminergic progenitor neurons during mouse development. *Dev Biol* 282(2): 467-479.
- Milosevic, J., S. C. Schwarz, K. Krohn, M. Poppe, A. Storch y J. Schwarz. 2005. Low atmospheric oxygen avoids maturation, senescence and cell death of murine mesencephalic neural precursors. *J Neurochem* 92(4): 718-729.
- Norris, M. L. y D. E. Millhorn. 1995. Hypoxia-induced protein binding to O₂-responsive sequences on the tyrosine hydroxylase gene. *J Biol Chem* 270(40): 23774-23779.
- Papanikolaou, T., T. Amano, J. Lenington, K. Sink, A. M. Farrar, J. Salamone, X. Yang y J. C. Conover. 2009. In-vitro analysis of Pitx3 in mesodiencephalic dopaminergic neuron maturation. *Eur J Neurosci* 29(12): 2264-2275.
- Prakash, N. y W. Wurst. 2004. Specification of midbrain territory. *Cell Tissue Res* 318(1): 5-14.
- Prakash, N. y W. Wurst. 2006. Development of dopaminergic neurons in the mammalian brain. *Cell Mol Life Sci* 63(2): 187-206.
- Puelles, E. 2007. Genetic control of basal midbrain development. *J Neurosci Res* 85(16): 3530-3534.
- Puelles, E., A. Annino, F. Tuorto, A. Usiello, D. Acampora, T. Czerny, C. Brodski, S. L. Ang, W. Wurst y A. Simeone. 2004. Otx2 regulates the extent, identity and fate of neuronal progenitor domains in the ventral midbrain. *Development* 131(9): 2037-2048.
- Puelles, L. y J. L. Rubenstein. 2003. Forebrain gene expression domains and the evolving prosomeric model. *Trends Neurosci* 26(9): 469-476.
- Riddle, R. y J. D. Pollock. 2003. Making connections: the development of mesencephalic dopaminergic neurons. *Brain Res Dev Brain Res* 147(1-2): 3-21.
- Roussa, E. y K. Kriegstein. 2004. Induction and specification of midbrain dopaminergic cells: focus on SHH, FGF8, and TGF-beta. *Cell Tissue Res* 318(1): 23-33.
- Roussa, E., M. Wiehle, N. Dunker, S. Becker-Katins, O. Oehlke y K. Kriegstein. 2006. Transforming growth factor beta is required for differentiation of mouse mesencephalic progenitors into dopaminergic neurons in vitro and in vivo: ectopic induction in dorsal mesencephalon. *Stem Cells* 24(9): 2120-2129.
- Saucedo-Cardenas, O., J. D. Quintana-Hau, W. D. Le, M. P. Smidt, J. J. Cox, F. De Mayo, J. P. Burbach y O. M. Conneely. 1998. Nurr1 is essential for the induction of the dopaminergic phenotype and the survival of ventral mesencephalic late dopaminergic precursor neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(7): 4013-4018.
- Schnell, P. O., M. L. Ignacak, A. L. Bauer, J. B. Striet, W. R. Paulding y M. F. Czyzyk-Krzeska. 2003. Regulation of tyrosine hydroxylase promoter activity by the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein and hypoxia-inducible transcription factors. *J Neurochem* 85(2): 483-491.
- Shimamura, K., S. Martinez, L. Puelles y J. L. Rubenstein. 1997. Patterns of gene expression in the neural plate and neural tube subdivide the embryonic forebrain into transverse and longitudinal domains. *Dev Neurosci* 19(1): 88-96.
- Shults, C. W., R. Hashimoto, R. M. Brady y F. H. Gage. 1990. Dopaminergic cells align along radial glia in the developing mesencephalon of the rat. *Neuroscience* 38(2): 427-436.
- Sillitoe, R. V. y M. W. Vogel. 2008. Desire, disease, and the origins of the dopaminergic system. *Schizophr Bull* 34(2): 212-219.
- Simeone, A. 2005. Genetic control of dopaminergic neuron differentiation. *Trends Neurosci* 28(2): 62-65; discussion 65-66.
- Smidt, M. P. y J. P. Burbach. 2007. How to make a mesodiencephalic dopaminergic neuron. *Nat Rev Neurosci* 8(1): 21-32.
- Smidt, M. P., S. M. Smits, H. Bouwmeester, F. P. Hamers, A. J. van der Linden, A. J. Hellemons, J. Graw y J. P. Burbach. 2004. Early developmental failure of substantia nigra dopamine neurons in mice lacking the homeodomain gene Pitx3. *Development* 131(5): 1145-1155.

- Smidt, M. P., H. S. van Schaick, C. Lanctot, J. J. Tremblay, J. J. Cox, A. A. van der Kleij, G. Wolterink, J. Drouin y J. P. Burbach. 1997. A homeodomain gene Ptx3 has highly restricted brain expression in mesencephalic dopaminergic neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(24): 13305-13310.
- Son, J. H., N. Min y T. H. Joh. 1996. Early ontogeny of catecholaminergic cell lineage in brain and peripheral neurons monitored by tyrosine hydroxylase-lacZ transgene. *Brain Res Mol Brain Res* 36(2): 300-308.
- Studer, L., M. Csete, S. H. Lee, N. Kabbani, J. Walikonis, B. Wold y R. McKay. 2000. Enhanced proliferation, survival, and dopaminergic differentiation of CNS precursors in lowered oxygen. *J Neurosci* 20(19): 7377-7383.
- Vernay, B., M. Koch, F. Vaccarino, J. Briscoe, A. Simeone, R. Kageyama y S. L. Ang. 2005. Otx2 regulates subtype specification and neurogenesis in the midbrain. *J Neurosci* 25(19): 4856-4867.
- Vitalis, T., O. Cases, D. Engelkamp, C. Verney y D. J. Price. 2000. Defect of tyrosine hydroxylase-immunoreactive neurons in the brains of mice lacking the transcription factor Pax6. *J Neurosci* 20(17): 6501-6516.
- Volpicelli, F., C. Consales, M. Caiazzo, L. Colucci-D'Amato, C. Perrone-Capano y U. di Porzio. 2004. Enhancement of dopaminergic differentiation in proliferating midbrain neuroblasts by sonic hedgehog and ascorbic acid. *Neural Plast* 11(1-2): 45-57.
- Wallen, A., R. H. Zetterstrom, L. Solomin, M. Arvidsson, L. Olson y T. Perlmann. 1999. Fate of mesencephalic AHD2-expressing dopamine progenitor cells in NURR1 mutant mice. *Exp Cell Res* 253(2): 737-746.
- Yan, J., L. Studer y R. D. McKay. 2001. Ascorbic acid increases the yield of dopaminergic neurons derived from basic fibroblast growth factor expanded mesencephalic precursors. *J Neurochem* 76(1): 307-311.
- Ye, W., K. Shimamura, J. L. Rubenstein, M. A. Hynes y A. Rosenthal. 1998. FGF and Shh signals control dopaminergic and serotonergic cell fate in the anterior neural plate. *Cell* 93(5): 755-766.

ANEXOS

1.- PREPARACIÓN DEL GEL DE COLÁGENA

Para la preparación del gel de colágena, se realizó una mezcla que contenía:
200 µl de Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (GIBCO, 10313-039, Carlsbad CA, USA) y 1% de penicilina/streptomycin (GIBCO, 125300-062, Carlsbad CA, USA)

50 µl de colágena (receta en tesis de García Peña Acosta CM, 2007)

15 µl de bicarbonato de sodio 1.547M (GIBCO, 25080-094, Carlsbad CA, USA)

5 µl de cloruro de sodio 10mM (JT Baker, 3624-05).

Volumen total 270 µl para aproximadamente 9 geles (30 µl c/u)

2.- MEDIOS DE CULTIVO

Para la preparación de 10 ml de cada uno:

NEUROBASAL + ÁCIDO ASCÓRBICO + SUERO DE CABRA

Ácido ascórbico concentración final 200 µM (SIGMA, A4403, Lot 108H08875)

5% de suero de cabra

10 ml de medio Neurobasal (NB) (1X, GIBCO, 21103-049, Carlsbad CA, USA)

1% de penicilina/streptomycin

NEUROBASAL + L-GLUTAMINA + SUERO DE CABRA

L-glutamina concentración final 200 µM (100X, GIBCO, 25030-081, Carlsbad CA, USA)

5% de suero de cabra

10 ml de medio Neurobasal

1% de penicilina/streptomycin

NEUROBASAL + B27 + SUERO DE CABRA

200 µl de B27 (50X, GIBCO, 17504-044)

5% de suero de cabra

10 ml de medio Neurobasal

1% de penicilina/streptomycin

NEUROBASAL + N2 + SUERO DE CABRA

100 µl de N2 (100X, GIBCO, 17502-048)

5% de suero de cabra

10 ml de medio Neurobasal

1% de penicilina/streptomycin

NEUROBASAL + B27 + N2+ L-GLUTAMINA + ÁCIDO ASCÓRBICO + SUERO DE CABRA

Ácido ascórbico 200 µM

L-glutamina 200 µM

200 µl de B27

100 µl de N2

5% de suero de cabra

10 ml de medio Neurobasal

1% de penicilina/streptomycin

3.- DABCO- GLICEROL

0.5 g de DABCO se disolvieron en 5 ml de PBS, se agregaron 45 ml de glicerol y se mezclaron con movimientos finos.

Los frascos con los medios de cultivo se mantuvieron a temperatura ambiente y cubiertos con aluminio