



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

CARACTERIZACIÓN DE LA ADQUISICIÓN DEL FENOTIPO
TERMINAL Y LA NEUROGÉNESIS EN LA DIFERENCIACIÓN DE
LAS NEURONAS DOPAMINÉRGICAS

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctor en Ciencias

PRESENTA:

M.C. GILDA GUERRERO FLORES

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Luis Fernando Covarrubias Robles - [Instituto de Biotecnología](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dr. Jean-Louis Charli Casalonga – Instituto de Biotecnología

Dr. Alfredo Varela Echavarría – Instituto de Neurobiología

Cuernavaca, Mor. Abril, 2018



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.

Este trabajo fue financiado por Conacyt con el proyecto No. 131031, la beca de posgrado (CVU/Becario) 208059/202714 y por el proyecto IMPULSA2-UNAM.

Un agradecimiento especial al Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP) por apoyo para cursos y congresos.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Luis Covarrubias por permitirme ser parte de su laboratorio, por darme libertad de expresión, por su apoyo y paciencia en este largo viaje.

A Lilia, má gracias por tu amor, por ser el faro que alumbra mi camino, por darme ánimo y coraje en los momentos difíciles. A René y Ernesto por su cariño y apoyo incondicional.

A Edgardo, porque sin ti no hubiera podido terminar esto. Gracias por todo tu amor y paciencia.

A todos los miembros del laboratorio Covarrubias con los que he tenido la oportunidad de trabajar, en particular a Conchita, Celina, Raúl, Rocío, Aimée, Jorge, Karen y Omar, que además de compañeros han sido buenos amigos.

A Aimée, de forma especial, porque no solo me ayudaste en la realización de este trabajo sino también en todos los demás aspectos de mi vida, has sido un gran apoyo en los momentos más difíciles y has hecho los buenos momentos mejores.

A Itzcóatl, por todos los buenos momentos que compartimos y por siempre estar pendiente de mí. A Alexis, por toda la ayuda técnica y emocional, por las buenas películas que me llevaste a ver. A Baldemar, porque siempre tenías un consejo y palabras de aliento que darme. A Miguel, por todos los años que vivimos juntos, las aventuras que compartimos y todo el apoyo que me brindaste. A Daniela, por los muchos buenos momentos que pasamos juntas, por impulsarme a seguir en este camino.

A la franquicia Panda por los buenos momentos que hemos pasado juntos dentro y fuera de las canchas, en especial a Emma, Roberto, Irving, Inti y Liz.

A todos los que no he mencionado pero que en algún momento de este viaje, de una forma u otra, han compartido momentos conmigo y me han brindado su ayuda cuando la he necesitado.

INDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
ABREVIATURAS	3
INTRODUCCIÓN	7
Desarrollo del Sistema Nervioso Central.....	7
<i>La formación del tubo neural</i>	7
<i>El eje antero – posterior</i>	8
<i>El eje dorso-ventral</i>	9
La diversidad celular del SNC.....	12
<i>El ciclo celular y la proliferación de las CPNs en el desarrollo</i>	12
<i>El mantenimiento de las CPNs versus la diferenciación neuronal</i>	14
<i>Diferenciación de las CPNs</i>	17
<i>Cambio de potencial neurogénico a astrogénico</i>	20
<i>La especificación y determinación de las CPNs</i>	22
Las neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo.....	26
<i>Establecimiento de la línea media ventral mesencefálica</i>	27
<i>Especificación dopaminérgica de las CPNs</i>	30
<i>Neurogénesis DAm</i>	32
<i>Diferenciación de las neuronas DAm</i>	34
<i>Determinación de las neuronas DAm</i>	37
HIPÓTESIS	40
OBJETIVO GENERAL	40
Objetivos particulares.....	40
MATERIALES Y MÉTODOS	41
Animales y tratamientos con BrdU.....	41
Tratamientos con BrdU.....	42
Disección de mesencéfalos.....	42
Cultivo de explantes en colágena.....	43
Implantes de células.....	44
Agregación celular.....	45

Cultivo en monocapa de precursores neurales mesencefálicos.....	45
Trasplantes en ratas adultas	46
Procesamiento de los tejidos y cultivos celulares	46
Inmunofluorescencia.....	47
<i>Inmunofluorescencia en cortes de tejido</i>	47
<i>Inmunocitoquímica fluorescente</i>	48
<i>Inmunofluorescencia en tejido completo</i>	49
Extracción de ARN y qPCR	51
Cuantificación.....	52
RESULTADOS	54
La expansión de los precursores DAm anticipa la diferenciación	54
El flujo de diferenciación DAm se modifica al adelantar la neurogénesis	61
Las CPNs DAm tempranas retienen Lmx1a pero no diferencian a neuronas DA fuera de su nicho.....	65
<i>La señal de Shh no es suficiente para promover la diferenciación de las CPNs ventrales de E9.5 cuando se encuentran fuera de su nicho</i>	69
Los precursores DAm comprometidos surgen después de E10.5	72
La proporción de CPNs comprometidas al linaje DAm se mantiene en E11.5	77
Las CPNs comprometidas al linaje DAm comienzan a disminuir a partir de E12.5	77
La superficie ventricular de los explantes favorece la integración de las CPNs	80
Los progenitores DAm y las neuronas inmaduras pueden sobrevivir y diferenciar en el cerebro adulto	82
El potencial astrogénico es una propiedad intrínseca de las CPNs DAm después de la diferenciación	84
DISCUSION	90
Dinámica de diferenciación DAm.....	90
Las CPNs tempranas están en un estado intermedio del compromiso DAm pero la diferenciación neuronal prosigue de forma independiente	91
Las CPNs se comprometen al destino DAm en E10.5 y su número comienza a decaer a partir de E12.5.....	94
Posibles Factores importantes en la determinación DAm	95
El potencial astrogénico de las CPNs DAm	98
CONCLUSIONES	101

PERSPECTIVAS	102
BIBLIOGRAFIA	104
ANEXO I	119
ANEXO II	131
APENDICE. MEDIOS, SOLUCIONES Y PROCEDIMIENTOS GENERALES	146
Cultivo de Células Troncales Embriónicas (CTE) y Formación de Cuerpos Embrioides (CE).....	146
Cultivo de células STO	148
Cultivo de CTE	150
Formación de cuerpos embrioides	151
Suspensión celular de los cuerpos embrioides	152
Congelación y descongelación de células.....	152
Conteo en la cámara de Neubauer.....	153
Cultivo de células precursoras neurales	154
Cultivo de explantes e implantes	157
Inmunofluorescencias	158
Extracción de ARN y qPCR	160

RESUMEN

Durante el desarrollo las células definen su destino progresivamente a través de diversos mecanismos que van restringiendo su plasticidad (e.g. competencia, especificación, compromiso). Aunque los marcadores moleculares son buenos indicadores de la especificación y diferenciación, para determinar el momento en el que una célula se compromete a su destino se necesitan ensayos funcionales.

En este trabajo nos enfocamos en definir cuándo se determina el destino de las células precursoras neurales del mesencéfalo ventral (CPNmv) al fenotipo dopaminérgico (DAm). Analizamos la diferenciación de CPNmv de distintas etapas del desarrollo al ser trasplantadas a explantes de mesencéfalo de E10.5. Encontramos que cuando las CPNmv de E9.5 se integran en regiones dorsales, estas retienen el marcador de especificación DAm Lmx1a y se diferencian eficientemente a neuronas; sin embargo, no logran expresar marcadores específicos de neuronas DAm como la Tirosina hidroxilasa (Th). Una porción de las CPNmv de E10.5-E11.5 se encuentran comprometidas y generan neuronas Th⁺ en sitios ectópicos. De forma interesante, las células de E12.5 no generaron un número significativamente mayor de neuronas Th⁺ en los explantes; no obstante, cuando se trasplantan en el cerebro adulto logran generar un número similar de neuronas Th⁺ que las de E10.5, además de astrocitos, que no se observan con las de E10.5. En línea con esto, cultivos primarios de CPNmv y de explantes tratados con Fgf2+LIF revelan que existe potencial astrogénico en las células desde E11.5. Con base en nuestros resultados, proponemos que durante la diferenciación DAm las CPNs comprometidas emergen en E10.5 y van perdiendo su capacidad neurogénica, al mismo tiempo que van emergiendo CPNs con potencial astrogénico.

ABSTRACT

It is considered that cells define their fate progressively during development by going stepwise through mechanisms that restrict their plasticity (e.g., competence, specification, commitment). Although molecular markers are good indicators of specification and differentiation, functional assays are required to define the signals involved and the time at which cells become fully committed.

In this work, we focus in defining when neural precursor cells of the ventral mesencephalon (vmNPC) determine their fate into dopaminergic neurons (mDA). We analyzed the differentiation of vmNPC from different stages after transplantation to E10.5 mesencephalic explants. We show that E9.5 vmNPCs implanted in an ectopic area of explants, retained their specification marker *Lmx1a* and efficiently differentiated into neurons but did not express the gene encoding tyrosine hydroxylase (*Th*), the limiting enzyme for dopamine synthesis. A proportion of E10.5-E11.5 implanted vmNPCs behaved as committed, deriving into Th^+ neurons in ectopic sites. Interestingly, implanted cells from E12.5 embryos were unable to give rise to a significant number of Th^+ neurons. Despite this, a full suspension of E12.5 vmNPCs give rise to DA neurons in a similar proportion as those of E10.5 when they were transplanted into adult brain, but astrocytes were only detected with the former population. Concomitantly, differentiation assays in culture and in mesencephalic explants treated with Fgf2+LIF detected vmNPCs with astrogenic potential since E11.5. Based on our findings we propose that during DA differentiation committed vmNPCs emerge at E10.5 and they exhaust their neurogenic capacity with the rise of NPCs with astrogenic potential.

ABREVIATURAS

A-P	Antero – posterior
ABCA1	Del inglés <i>ATP-binding cassette transporter isoform A1</i>
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
Aldh1a1	Del inglés <i>Aldehyde dehydrogenase 1a1</i>
Aldoc	Del inglés <i>Brain type aldolase</i>
ApoE	Del inglés <i>Apolipoprotein E</i>
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
Arntl	Del inglés <i>Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like protein 1</i>
Ascl1	Del inglés <i>Achaete-scute homolog 1</i>
AVT	Área Ventral Tegmental
bHLH	Del inglés <i>basic Helix-Loop-Helix</i>
Bdnf	Del inglés <i>Brain-derived neurotrophic factor</i>
BMP	Del inglés <i>Bone Morphogenetic Protein</i>
BrdU	Bromodeoxiuridina
Brn1/2	Del inglés <i>Brain 1/2</i>
Cdkn1c	Del inglés <i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 1C</i>
CE	Cuerpos Embrioides
Co-Rest	Del inglés <i>Rest corepressor 1</i>
CPN	Célula Precursora Neural
CPNmv	Células Precursoras Neurales del mesencéfalo ventral
CTE	Células Troncales Embriónicas
CTNa	Células Troncales Neurales adultas
CTNF	Del inglés <i>Ciliary Neurotrophic Factor</i>
D – V	Dorso – ventral
DAPI	4',6-diamino-2-fenilindol
DAPT	N-[(3, 5-Difluorofenil) acetil]-L-alanil-2-fenil] glicina-1, 1-dimetiletal éster
Dat	Del inglés <i>Dopamine transporter</i>
Ddc	Dopa descarboxilasa

DICN	Dominio Intracelular de Notch
Dll1	Del inglés <i>Delta-like 1</i>
Dmrt5	Del inglés <i>Doublesex and Mab-3-Related Transcription Factor 5</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
dNTP	desoxirribonucleótidos trifosfato
dpc	Días post coito
Drd2	Del inglés <i>Dopamine receptor d2</i>
E	Día embrionario
EGFP	Del inglés <i>Enhanced Green Fluorescent Protein</i>
Egr2	Del inglés <i>Early growth response 2</i>
Emx2	Del inglés <i>Empty spiracles homeobox 2</i>
En1/2	Engrailed ½
Ferd3l	Del inglés <i>Fer3-like bHLH transcription factor</i>
Fgf	Del inglés <i>Fibroblast Growth Factor</i>
Foxa1/2	Del inglés <i>Forkhead box A2</i>
Foxg1	Del inglés <i>Forkhead box G1</i>
GABA	Ácido γ -aminobutírico
Gbx2	Del inglés <i>Gastrulation brain homeobox 2</i>
Gfap	Del inglés <i>Glial fibrillary acidic protein</i>
Glast	Del inglés <i>Astrocyte-specific glutamate transporter</i>
Gli1-3	Del inglés <i>Glioma-associated oncogene 1-3</i>
GR	Glia Radial
Helt	Del inglés <i>Hes/Hey-like transcription factor</i>
Hes	Del inglés <i>Hairy and enhancer of Split</i>
Igfbp1	Del inglés <i>Insulin like Growth Factor Binding Protein like 1</i>
Jag	Jagged
LIF	Del inglés <i>Leukemia Inhibitory Factor</i>
Lmx1a/b	Del inglés <i>LIM homeobox transcription factor 1 alpha/beta</i>
Lxr	Del inglés <i>Liver X receptor</i>
MAP2	Del inglés <i>Microtubule- Associated Protein 2</i>
miR	Del inglés <i>microRNA</i>

Msx1/2	Del inglés <i>Msh homeobox 1/2</i>
NCOR	Del inglés <i>Nuclear receptor co-represor</i>
NeuN	Del inglés <i>Neuronal Nuclei</i>
NeuroD1	Del inglés <i>Neuronal Differentiation Factor 1</i>
Neurog2	Neurogenina2
NFI	Del inglés <i>Nuclear factor 1</i>
Nkx2.2	Del inglés <i>Nk2 homeobox 2</i>
<i>Nkx6.1</i>	Del inglés <i>Nk6 homeobox 1</i>
Nr1h2/3	Del inglés <i>Nuclear receptor subfamily 1 group H member 2/3</i>
Nr4a2	Del inglés <i>Nuclear receptor subfamily 4 group A member 2</i>
Otx2	Del inglés <i>Orthodenticle homeobox 2</i>
Ptch1	Del inglés <i>Patched 1</i>
Pax	Del inglés <i>Paired box containing homeodomain</i>
PBS	Del inglés <i>Phosphate buffer saline</i>
PCR	Del inglés <i>Polimerase chain reaction</i>
PFA	Paraformaldehído
pH3	Histona H3 fosforilada
Pitx3	Del inglés <i>Paired like homeodomain 3</i>
r	Rombómero
Rest	Del inglés <i>RE1 Silencing Transcription Factor</i>
SAHM1	Del inglés <i>Series of stapled α-helical peptides derived from MAML1</i>
SAG	Del inglés <i>Smoothened agonist</i>
Scp1	Del inglés <i>Synaptonemal Complex Protein 1</i>
Shh	Sonic Hedgehog
Slc18a2	Del inglés <i>Solute carrier family 18 member A2</i>
Slc6a3	Del inglés <i>Solute carrier family 3 member A3</i>
SN	Sustancia Nigra
Smo	Del inglés <i>Smoothened</i>
Sox	Del inglés <i>Sex determining region Y-box</i>
SNC	Sistema Nervioso Central
SREBF1	Del inglés <i>Sterol Regulatory Element Binding Transcription Factor 1</i>

TGF- β Del inglés *Transforming Growth Factor Beta*
Tnc Del inglés *Tenascin C*
Th Tirosina Hidroxilasa
Vmat Del inglés *Vesicular monoamine transporter*
Wnt1 Del inglés *Wingless-Type MMTV Integration Site Family, Member 1*

INTRODUCCIÓN

Desarrollo del Sistema Nervioso Central

La formación del tubo neural

La formación del sistema nervioso central (SNC) de los vertebrados inicia con la inducción de la placa neural a partir de una sección del ectodermo, mediada por señales emanadas de la notocorda adyacente. Además de determinar la posición del SNC, la notocorda es requerida para enviar señales inductivas a las células del neuroectodermo para que se especifiquen las células precursoras neurales (CPNs) a lo largo del eje dorso-ventral (Peterson, 2002).

Una vez neuralizadas estas células, ahora CPNs, comienzan una expansión rápida. Debido a este proceso, la parte media del neuroectodermo se engruesa, formando la placa neural, que se distingue por sus células de apariencia columnar. Los márgenes laterales de la placa neural posteriormente se doblan para transformar la placa en un tubo, mediante un proceso llamado neurulación. Existen dos mecanismos que convierten a la placa neural en el tubo neural, el primero es la neurulación primaria, en la cual las células que rodean a la placa neural inducen su proliferación y, posteriormente, la placa se invagina para separarse de la superficie y formar un tubo hueco. El segundo es la neurulación secundaria, donde el tubo neural se forma a partir de una cuerda sólida de células que se hunden en el embrión y que posteriormente cavitan para formar un tubo hueco. En general, la región anterior del tubo neural se crea por neurulación primaria, mientras que la parte posterior lo hace por neurulación secundaria (Colas and Schoenwolf, 2001; Smith and Schoenwolf, 1997).

Durante el desarrollo, una célula tiene que pasar por dos procesos importantes para poder generar una neurona específica. Primero, durante la neurulación temprana, las células epiblasticas deben ganar el potencial para generar neuronas (convertirse en CPNs), de tal forma que la neurogénesis (la diferenciación a neuronas de las CPNs) pueda ocurrir en etapas tempranas del desarrollo del SNC. Y segundo, las CPNs deben obtener la habilidad de adquirir los determinantes (neurotransmisor, receptores para guiar sus axones y regular su actividad) que caracterizan a una neurona en particular. Ambos procesos parecen ocurrir simultáneamente en el desarrollo.

El eje antero – posterior

En sus etapas más tempranas, el tubo neural se divide en tres vesículas primarias: cerebro anterior (prosencefalo), cerebro medio (mesencefalo), y cerebro posterior (romboencefalo) (Fig. 1A). El prosencefalo se subdivide en dos: la región más rostral, el telencefalo, y la más caudal, diencefalo. El telencefalo, eventualmente, formará de su región dorsal la corteza, el hipocampo y los lóbulos olfatorios, y de la ventral la eminencia gangliónica lateral (que genera el estriado), la media y la caudal. El diencefalo da origen al tálamo e hipotálamo, que reciben estímulos nerviosos de la retina (la cual también se deriva del diencefalo). El mesencefalo no sufre ninguna subdivisión, en él se generan estructuras involucradas en el control del movimiento y su lumen eventualmente se convierte en el acueducto cerebral (ver adelante). El romboencefalo se divide en mielencefalo, la parte posterior, y en metencefalo, más anterior. El mielencefalo se convertirá en la médula oblongata (cuyas neuronas generan los nervios que regulan los movimientos respiratorios,

gastrointestinales y cardiovasculares), y el metencéfalo, en el cerebelo (la parte del cerebro responsable de coordinar los movimientos, la postura y el balance) (Kiecker and Lumsden, 2005)(Fig. 1B).

La creación del patrón en el eje antero-posterior (A-P) aún no se comprende del todo bien. Se cree que el establecimiento y mantenimiento de patrones más refinados en el romboencéfalo y prosencéfalo se logra gracias a una compartimentalización en unidades morfogenéticas (los rombómeros en el caso del romboencéfalo y prosómeros en el prosencéfalo), las cuales mantienen su identidad posicional (Kiecker and Lumsden, 2005). Además, algunos centros de señalización secundarios podrían refinar las identidades locales a lo largo de todo el eje A-P. Estos centros organizadores son: la cresta anterior neural, que se encuentra en la conexión entre el prosencéfalo y el ectodermo anterior, necesaria para el mantenimiento de las identidades del cerebro anterior; la zona limitans intertalámica, localizada en la interface entre el primordio talámico y pretalámico; y el organizador del istmo, que yace entre el cerebro medio y el posterior, el cual es necesario y suficiente para el desarrollo de las estructuras mesencefálicas y metencefálicas (Kiecker and Lumsden, 2005; Wurst and Bally-Cuif, 2001) (Fig. 1).

El eje dorso-ventral

El tubo neural se divide a lo largo de su eje dorso-ventral (D-V) influenciado por el tejido meso-endodermal subyacente y por el efecto de estructuras ectodermales no neurales. Así, la placa del piso, la placa basal, la placa alar y la placa del techo se desarrollan en el tubo neural de la región ventral a la dorsal; como resultado de

estos eventos, una gruesa red tridimensional de identidades posicionales se establece en el tubo neural, montando las bases de toda la especialización regional. El establecimiento del patrón a lo largo del eje D-V ha sido caracterizado principalmente en la médula espinal; éste depende de la concentración de factores de dorsalización de la superfamilia de TGF- β (“Transforming Growth Factors”), que emanan del ectodermo no neural, y de factores de ventralización como Sonic Hedgehog (Shh), que son producidos por la notocorda y la placa del piso (Fig. 2) (Liu and Niswander, 2005).

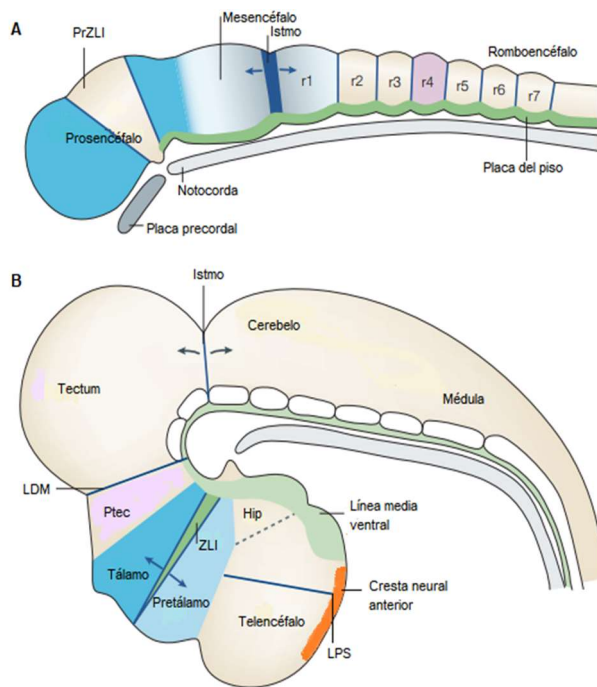


Figura 1. Diferenciación en el eje A-P. Vista lateral de un embrión de pollo. (A) Etapa HH13 (ratón E9). El tubo neural se divide en tres estructuras: prosencefalo, mesencéfalo y romboencéfalo. Los principales centros organizadores son el istmo, los límites entre rombómeros, el rombómero 4 (r4) y la placa del piso. Las flechas representan la bidireccionalidad de la señalización. La notocorda y la placa precordal son centros señalizadores no neurales que tienen influencia en el establecimiento del patrón D-V. (B) Etapa HH24 (ratón E13). El prosencefalo se ha dividido en telencéfalo y diencéfalo (tálamo e hipotálamo) y el romboencéfalo en cerebelo (metencéfalo) y médula espinal (mielencéfalo). Los centros señalizadores son la Zona Limitans Intratalámica (ZLI), el istmo y la línea media ventral. Hip, hipotálamo; LDM, límite diencéfalo-mesencéfalo; LPS, Límite Palial-subpalial; PrZLI, presunta zona limitans intratalámica; Ptec, pretectum (Modificado de Kiecker and Lumsden (2005)).

Shh es secretado por la notocorda e induce la formación de la placa del piso, cuyas células también secretan Shh, lo cual forma un gradiente, encontrándose la mayor concentración en la zona más ventral del tubo neural (Yamada et al., 1991). Las concentraciones diferenciales de Shh provocan que diferentes grupos de CPNs

expresen distintos tipos de factores transcripcionales, estos factores, en consecuencia, activan genes cuyas proteínas les dan identidad a las células. Shh podría también activar una vía represora sobre la expresión de genes que codifican factores de transcripción del tubo neural dorsal, lo cual evitaría que estos genes sean expresados a través de todo el tubo neural (Roelink, 1995).

Los destinos dorsales se establecen por proteínas de la superfamilia de TGF- β , especialmente BMP4 (“Bone Morphogenetic Protein”) y BMP7, dorsalina y activina. Inicialmente los BMPs se encuentran en la epidermis, pero así como la notocorda establece la placa del piso, la epidermis establece otro centro de señalización, la placa del techo, inducida por BMP4. La proteína BMP4, a su vez, es secretada por las células de la placa del techo y genera un gradiente, similar a lo que ocurre en la placa del piso, lo cual induce la expresión de diferentes tipos de factores de transcripción que generan diferentes identidades dorsales (Liem, 1995) (Fig. 2).

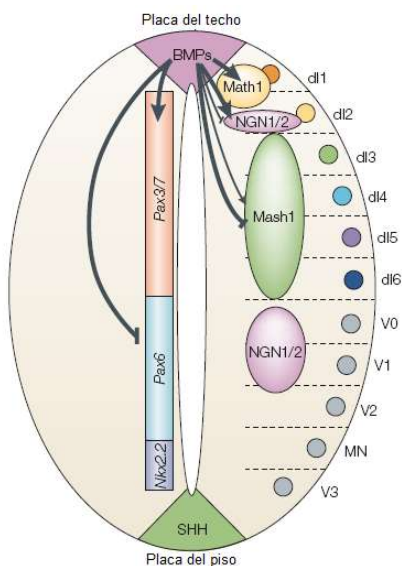


Figura 2. Especificación de la médula espinal a lo largo del eje D-V. Esquema de la placa del techo que expresa BMPs, así como otras proteínas de la familia de los TGF- β ; y la placa del piso, la cual expresa Shh. Las CPNs están divididas en dominios ventrales muy amplios, gracias a la expresión diferencial de los genes *Pax*. Después, la médula espinal se subdivide por la expresión de los factores de transcripción de la familia bHLH y factores de transcripción con homeodominio. La regionalización de los precursores lleva a la formación de distintos tipos neuronales dorsales y ventrales, llamados interneuronas dorsales (di1-6), interneuronas ventrales (V0-3) y motoneuronas (MN) (Modificado de Liu and Niswander (2005)).

La diversidad celular del SNC

El ciclo celular y la proliferación de las CPNs en el desarrollo

La pared del tubo neural está constituida por un epitelio pseudoestratificado formado por células neuroepiteliales que expresan marcadores como *Sox1/2* (“Sex determining region Y-box 1/2”) las cuales mantienen contacto con la región ventricular (zona apical) y la región pial (zona basal), mientras que su núcleo muestra una migración intercinética entre las dos regiones (Zhong and Chia, 2008). La posición del núcleo a lo largo del eje radial del tubo neural indica la etapa del ciclo celular en el que se encuentran las células. De esta forma, las células entran en fase G1 cuando el núcleo comienza su migración desde el ventrículo, llegando a la fase S en el extremo más basal del recorrido para, posteriormente, regresar hacia la capa apical durante la fase G2 y alcanzar la mitosis en esta zona (Takahashi et al., 1993) (Fig. 3a). Se cree que este movimiento intercinético funciona para maximizar el número de mitosis que ocurren en la pequeña superficie ventricular (Taverna and Huttner, 2010). Además, sirve para exponer diferencialmente a las células a señales presentes a lo largo del eje apico–basal, entre mayor sea la distancia que recorre el núcleo hacia la región pial, las células se encuentran más tiempo en G1 y receptivas a señales de diferenciación, por lo que existe una mayor posibilidad de que la célula salga del ciclo celular y diferencie (Baye and Link, 2007). Previo al inicio de la neurogénesis, el neuroepitelio comienza a engrosarse por la alta proliferación de las células y estas adquieren la expresión de *Nestina*, gen que codifica para una proteína de filamentos intermedios (Lendahl et al., 1990), y comienzan a producir una proteína de unión a ARN, Musashi, necesaria para la proliferación y el mantenimiento de las CPNs (Sakakibara et al., 2002).

Al inicio de la neurogénesis, las células neuroepiteliales cambian su identidad y se convierten en glia radial (GR) que generará, directa o indirectamente, todas las neuronas y, posterior en el desarrollo, las células gliales (Anthony et al., 2004). En conjunto, las células neuroepiteliales y las de la GR son llamadas CPNs. La GR comienza a expresar marcadores de astrocitos como *Glast* (“Astrocyte –specific glutamate transporter”) y *Blbp* (“Brain lipid–binding protein”) (Campbell and Gotz, 2002); el mecanismo que regula esta transición neuroepitelio – glia radial no se conoce del todo pero se sabe que la expresión de miembros de la familia *Hes* (“Hairy and enhancer of Split”) y de *Fgf10* (“Fibroblast growth factor”) es necesaria (Hatakeyama et al., 2004; Sahara and O'Leary, 2009).

Durante la neurogénesis, las células de la GR cambian de divisiones simétricas proliferativas a divisiones asimétricas de diferenciación, dando lugar a una célula tipo GR y a una diferenciada (Fig. 3b). La duración del ciclo celular de la GR cambia durante el desarrollo, donde las células que llevan a cabo divisiones proliferativas tienen una fase S más larga que las células con divisiones neurogénicas, las cuales exhiben una fase G1 más prolongada (Arai et al., 2011; Lange et al., 2009). Las células que se mantienen indiferenciadas y proliferando se quedan en el ventrículo, mientras que las que diferencian pierden sus contactos apico–basales y migran hacia la zona pial donde terminan su diferenciación a neuronas (Gotz and Huttner, 2005). Este fenómeno define a la región ventricular del tubo neural como el nicho de las CPNs (Fig. 3); el mantenimiento de este nicho y el crecimiento simultáneo del neuroepitelio se regula controlando el número de divisiones simétricas y asimétricas de las CPNs.

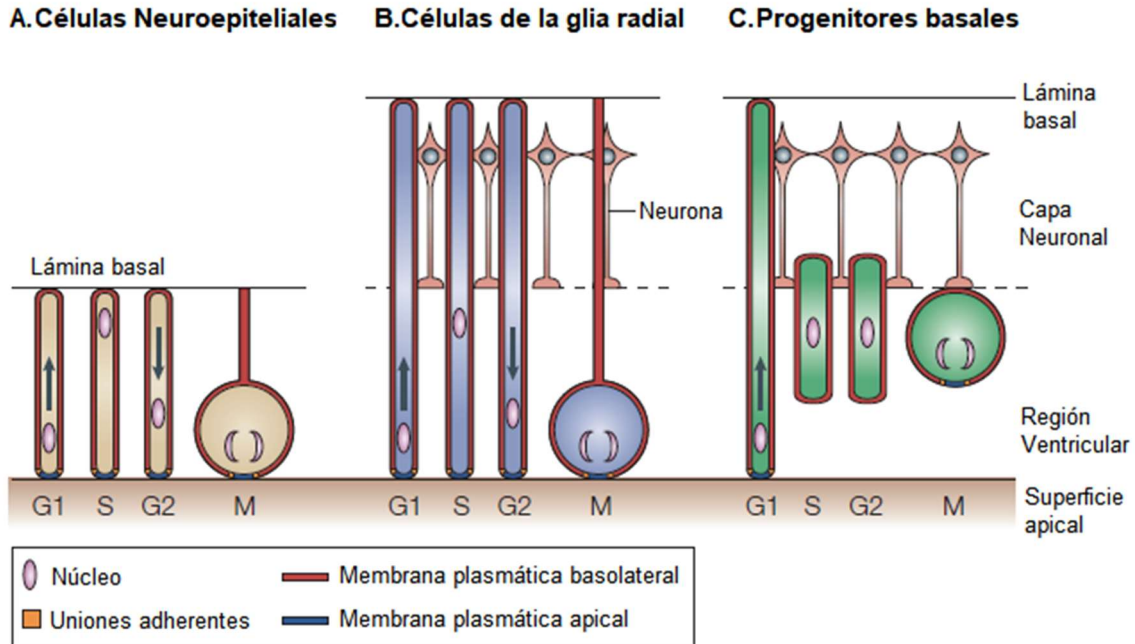


Figura 3. Movimiento intercinético y polarización de las células neuroepiteliales, la glia radial y los progenitores basales. Esquema de la organización polarizada y la migración nuclear intercinética de las células neuroepiteliales, la GR y los progenitores basales. (A) En las células neuroepiteliales el movimiento intercinético se da a lo largo del eje apico-basal, con el núcleo migrando al lado basal en G1 y la mitosis ocurriendo en la superficie apical. (B) En la GR, la migración nuclear no se extiende totalmente al lado basal y se confina a la porción de la célula entre la superficie apical y el límite basal de la región ventricular. (C) En los progenitores basales, el núcleo migra de la superficie apical al límite basal de la zona ventricular (línea punteada) durante la fase S y la mitosis. (Modificado de Gotz and Huttner (2005)).

El mantenimiento de las CPNs versus la diferenciación neuronal

Uno de los reguladores maestros de la neurogénesis es el factor de transcripción Pax6 (“Paired box containing homeodomain”) que se expresa en varias regiones del SNC como el cerebro anterior, la retina y el cerebro posterior (Osumi et al., 2008). Además de regular patrones de regionalización en ciertos territorios, Pax6 promueve la proliferación de la GR, pero también la neurogénesis a través de la inducción de genes proneurales del tipo bHLH (del inglés “basic helix–loop–helix”) como las Neurogeninas (Sansom et al., 2009). Estos efectos, parcialmente opuestos, están mediados por *splicing* alternativo (Walcher et al., 2013) y su interacción con otros factores de transcripción como Sox2 y Hes1 (Osumi et al.,

2008; Sansom et al., 2009). Los genes proneurales regulados por Pax6 son, generalmente, región–específicos, como *Brn1/2*, miembros de la familia SoxC como *Sox4* y *Sox11*, que inician programas neuronales específicos y reprimen otras identidades regionales (Bergsland et al., 2006). Por ejemplo, las CPNs del telencéfalo dorsal expresan *Neurog1/2*, los cuales instruyen la generación de neuronas piramidales glutamatérgicas que dan a lugar a la sexta capa de la corteza en mamíferos, y reprimen genes ventrales telencefálicos. En contraste, el telencéfalo ventral expresa *Gsh1/2*, *Nkx2.1* y *Ascl1* (“Achaete-scute homolog 1”) que instruyen la generación de neuronas gabaérgicas de los ganglios basales e interneuronas corticales y reprimen destinos dorsales (Fode, 2000).

Otra vía importante en la regulación de la neurogénesis es la de Notch, que lo hace a través de inhibición lateral. Notch es una familia de receptores transmembranales que son activados por los ligandos, también proteínas transmembranales, tipo Delta (Dll1, Dll3 y Dll4) y Jagged (Jag1 y Jag2). Al unirse a sus ligandos, la fracción citoplásmica de los receptores sufre un corte proteolítico mediado por las proteasas presenilina y γ -secretasa, liberando el dominio intracelular de Notch (DICN) el cual se transloca al núcleo, donde forma un complejo con la proteína de unión al ADN RBPj (Pierfelice et al., 2011). En el SNC, el complejo DICN-RBPj induce la expresión de *Hes1* y *Hes5*, factores de transcripción del tipo bHLH que, a su vez, reprimen la expresión de genes proneurales (y de los ligandos de Notch), inhibiendo la diferenciación neuronal y manteniendo la poza de CPNs (Ohtsuka et al., 1999). Así, el bloquear la vía causa una diferenciación prematura de las CPNs y una reducción en el número y espectro de tipos neuronales que se generan (Hatakeyama et al., 2004; Louvi and Artavanis-Tsakonas, 2006; Ohtsuka et al., 1999). En la corteza, la

expresión de *Hes1* en la GR oscila en periodos de 2–3 h debido a un circuito autoinhibitorio (Shimojo et al., 2008), estas oscilaciones inducen, a su vez, oscilaciones en la expresión de *Delta* y *Neurog2*, por lo que ha sido propuesto que la expresión diferencial de los niveles de *Hes1* median la respuesta de las células a las señales que regulan proliferación versus diferenciación.

Otros genes que regulan el mantenimiento de los precursores neurales y la diferenciación son los factores de transcripción de la familia de proto-oncogenes Myc (C-Myc, N-myc y L-myc). Estas proteínas regulan la expansión de poblaciones celulares en una amplia variedad de tejidos. C-myc y N-myc son esenciales para para el desarrollo normal del cerebro del ratón (Knoepfler et al., 2002). Todo el crecimiento del cerebro está alterado en los ratones dobles *knockout* para C- y N-myc, este fenotipo está asociado con un decremento en la proliferación y la migración de las CPNs (Wey and Knoepfler, 2010). Notablemente, el mesencéfalo de estos ratones no parece estar afectado, lo que sugiere que L-myc podría controlar su desarrollo, mientras que C- y N-myc regulan el cerebro anterior y posterior (Wey and Knoepfler, 2010).

N-myc se expresa en la zona ventricular donde reside la GR Sox2⁺, la pérdida de su función provoca una disminución en el número de neuronas sin que se afecte la proliferación, y su sobreexpresión induce la diferenciación prematura de las CPNs. Estos efectos no están regulados a través de la represión de la troncalidad, determinada por la expresión de Sox2, ni por la activación de genes proneurales (Zinin et al., 2014). N-myc además, regula negativamente la expresión de genes de la vía de Notch y, positivamente, la de genes reguladores de la orientación del plano

de división celular, por lo cual su sobreexpresión aumenta las divisiones de diferenciación (Zinin et al., 2014).

Diferenciación de las CPNs

Las CPNs responden a diversas señales espaciales y temporales que definen los patrones genéticos que las especifican y les dan identidad, lo cual genera la gran diversidad neuronal del SNC a lo largo de los ejes A–P y D–V (Wurst and Bally-Cuif, 2001). Los astrocitos y oligodendrocitos también se derivan de estas CPNs pero éstas tienen que cambiar significativamente su potencial antes de poder diferenciarse a estos destinos (Hirabayashi and Gotoh, 2010; Rowitch and Kriegstein, 2010).

Durante el proceso de diferenciación, las CPNs transitan a través de distintos estados de compromiso (Fig. 4):

- Competencia: las células pueden convertirse en CPNs si son expuestas a la combinación apropiada de señales.
- Especificación: las células ya han recibido las señales adecuadas para convertirse en CPNs, pero la vía de diferenciación puede reprimirse por otras señales.
- Compromiso (determinación): las CPNs han comenzado la diferenciación y se convertirán en neuronas aún ante la presencia de señales inhibitorias.
- Diferenciación: las células ya no son mitóticamente activas y ahora expresan genes característicos de neuronas.

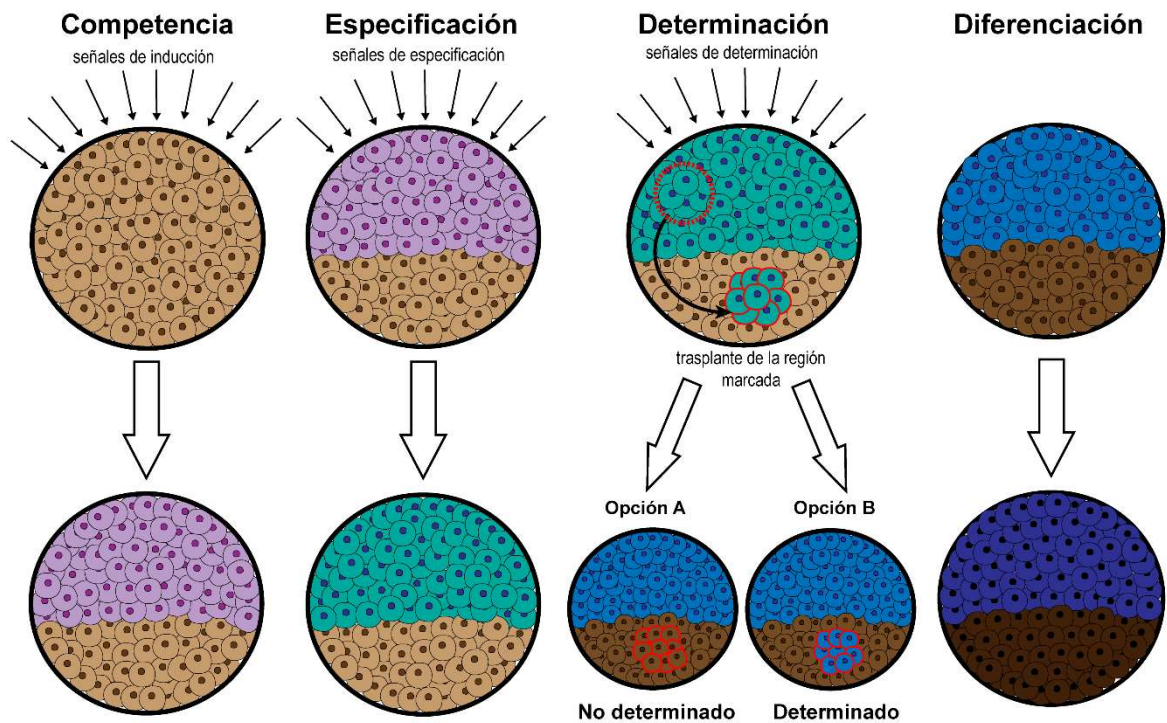


Figura 4. Estados de compromiso durante la diferenciación. Representación de los estados de compromiso por los que transitan las células durante su diferenciación. Compromiso: las células son capaces de interpretar las señales inductivas del entorno para diferenciar. Especificación: señales extrínsecas dirigen a las células hacia un linaje particular pero la diferenciación aún puede reprimirse (no determinado). Determinación: señales extrínsecas determinan a las células a un fenotipo particular y cuando son trasplantadas a otras regiones mantienen su destino original. Diferenciación: las células ya no son mitóticamente activas y se convierten en células totalmente diferenciadas del fenotipo al cual se determinaron. El potencial de diferenciación disminuye al ir transitando por estas etapas y su grado de diferenciación va aumentando.

El fenotipo final de una neurona comprende características neuronales genéricas que son compartidas por todas las neuronas, algunas comunes a varios tipos, y otras únicas de una clase, como la proyección de axones a una región específica; además, cada neurona debe activar los genes que codifican las enzimas que sintetizan el neurotransmisor específico del sitio donde se localizan. Para lograr esto, las células tienen que activar dos programas de diferenciación, uno es el programa neuronal, en el cual las células adquieren las características neuronales

comunes, y el otro es el del fenotipo específico (producir el neurotransmisor específico y poseer características de cierta región), el desarrollo de ambos programas pasa por las etapas antes mencionadas. Experimentos con células troncales embrionarias (CTE) han mostrado que la especificación neural (primer paso en el programa neuronal donde las células aún tienen la plasticidad para generar células de los tres linajes neurales) y la especificación hacia un fenotipo neuronal particular deben ocurrir al mismo tiempo, o en una ventana de tiempo muy corta (Andersson et al., 2006; Baizabal and Covarrubias, 2009; Wichterle et al., 2002). Posterior en el desarrollo están la neurogénesis y la adquisición de las características moleculares de un tipo neuronal en particular (la etapa de determinación), las cuales, en la mayoría de los estudios, se observa que se encuentran acopladas, especialmente en etapas tempranas de la diferenciación (Trujillo-Paredes et al., 2016; Yun et al., 2002).

La especificación es un proceso asociado con la localización de una célula, la cual identifica a la célula con un destino particular, el cual puede ser modificado gracias a la interacción con otras células u otras señales (como factores de crecimiento). La determinación se podría considerar una propiedad intrínseca de las CPNs ya que no depende de señales del ambiente, aunque la diferenciación a un estado más maduro aún podría requerir señales extrínsecas (Edlund and Jessell, 1999). Si bien se espera que la determinación se establezca poco después de que una CPN haya salido del ciclo celular, en algunos casos se ha observado un cambio de destino en células postmitóticas. Por ejemplo, un subgrupo de neuronas simpáticas pierde su fenotipo noradrenérgico inicial y adquiere propiedades colinérgicas al entrar en contacto con proteínas tipo CNTF ("Ciliary neurotrophic factor") (Habecker et al.,

1997; Landis, 1990). Del mismo modo, se ha observado este fenómeno en los fotorreceptores de la retina, los cuales salen del ciclo celular muchos días antes de que expresen algún marcador de diferenciación como la rodopsina, cuya expresión aún puede ser inhibida también por miembros de la familia CTNF/LIF (“Leukemia inhibitory factor”) (Ezzeddine et al., 1997; Neophytou et al., 1997).

El estudio de estos estados es importante para el entendimiento de la diferenciación y su relación con los factores extrínsecos e intrínsecos indispensables para la generación de un tipo neuronal particular.

Cambio de potencial neurogénico a astrogénico

La GR diferencia a neuronas y a macroglia (astrocitos y oligodendrocitos), como se ha mostrado en experimentos de mapeo de destino, siguiendo a las células de la GR B1bp⁺ (Anthony et al., 2004). Después de la neurogénesis comienza la generación de células gliales, este cambio de destino se ha estudiado principalmente en la médula espinal y en la corteza (Rowitch and Kriegstein, 2010). En la médula espinal, la producción de precursores oligodendrocíticos es precedida por la reducción en la expresión de *Neurog2* (Lee et al., 2005), lo que sugiere que esta represión es un determinante del cambio neuronal–glial (los factores proneurales, en general, son represores gliogénicos). En la corteza se ha mostrado que *Neurog1* interfiere con la transducción de señales gliogénicas de la vía Jak–Stat al asociarse directamente con p300/CBP-Smad1 e impidiendo que éste forme complejo con Stat1/3 (Sun et al., 2001). Es interesante notar que *Ascl1* y *Neurog2* también se expresan en precursores oligodendrocíticos y astrogénicos,

respectivamente (Kondo and Raff, 2000; Nieto et al., 2001), lo cual sugiere que podrían tener funciones también en la especificación de estos linajes.

Temprano en el desarrollo, los promotores de genes astrocíticos como *Gfap* (“Glial fibrillary acidic protein”) y *S100B* se encuentran metilados, haciendo a las células neuroepiteliales insensibles a las citosinas que inducen astrogénesis (Molne et al., 2000; Temple, 2001). Después, paulatinamente, la GR se vuelve competente para responder ya que comienza la desmetilación de los promotores de genes astrocíticos (Takizawa et al., 2001); sin embargo, en estas etapas existen señales extrínsecas que reprimen la gliogénesis. Por ejemplo, *Fgf2* activa al co-represor de receptores nucleares (NCOR, por sus siglas en inglés) para que se una al promotor de *Gfap* e inhiba su transcripción (Hermanson et al., 2002). Por otro lado, *Neuregulina1* se expresa durante la neurogénesis, la cual, a su vez, activa la señalización dependiente de presenilina mediada por ERBB4, un miembro de la familia de los receptores de factor de crecimiento epidermal, esta vía antagoniza con señales astrogénicas como la de CNTF (Sardi et al., 2006).

La vía de señalización de Notch también está involucrada en gliogénesis, en la médula espinal, las CPNs en el dominio pMN (dominio donde nacen motoneuronas) producen solo neuronas en los mutantes de Notch, mientras que una expresión forzada de *Notch1* bloquea la neurogénesis y resulta en un exceso de precursores oligodendrocíticos (Itoh et al., 2003; Yang et al., 2006). Estos estudios indican que el papel de la señalización de Notch es más bien permisivo que instructivo en la adquisición del destino glial. Los efectos de Notch en la astrogénesis se deben, en parte, a la acción de las proteínas Hes que inhiben a los factores proneurales, y también a la activación mediada por citosinas de la vía Jak–Stat, lo cual promueve

la desmetilación de los promotores y, por lo tanto, la expresión de genes astrocíticos (Kamakura et al., 2004; Namihira et al., 2009).

El inicio de la gliogénesis en la médula espinal y la diferenciación de astrocitos en etapas posteriores, son controlados por el factor nuclear I (NFI por sus siglas en inglés). NFIA es suficiente para inducir gliogénesis y su pérdida conlleva a una disminución en el número de progenitores gliales y un incremento en la neurogénesis, que resulta de la pérdida en la actividad de Notch (Deneen et al., 2006). Así mismo, ratones *knockout* en *Nfia* o *Nfib* presentan una baja expresión de *Gfap* lo cual indica que los NFI regulan directamente la expresión de este gen (Cebolla and Vallejo, 2006; Wilczynska et al., 2009).

Asimismo, la gliogénesis se regula por otro mecanismo de retroalimentación, las citosinas que secretan las neuronas se ha propuesto que inducen gliogénesis (Barnabe-Heider et al., 2005). Entre las citosinas secretadas se encuentran miembros de la familia de interleucina 6 (IL-6) como LIF, CNTF y Cardiotrofina 1, las cuales activan la vía Jak – Stat (Barnabe-Heider et al., 2005; Bonni et al., 1997).

La especificación y determinación de las CPNs

Las CPNs provenientes de tejido neural embrionario se identificaron, inicialmente, en ensayos *in vitro*, siendo los más comunes el cultivo en monocapa y la formación de neuroesferas (agregados celulares enriquecidos en CPNs). Midiendo la capacidad proliferativa de las células en presencia de mitógenos y, posteriormente, la generación de células de los tres linajes neurales se ha determinado la presencia de CPNs en distintas regiones y etapas del desarrollo del SNC (Kilpatrick and Bartlett, 1993; Reynolds et al., 1992).

La identidad posicional de una CPN está definida por el código de factores transcripcionales que expresa esa célula en relación con su ubicación en el tubo neural. Algunos estudios han mostrado que las CPNs de neuroesferas mantienen solo parcialmente la identidad posicional de su región de origen (Parmar et al., 2002; Santa-Olalla et al., 2003). Además, la expansión *in vitro* también puede promover la activación ectópica de algunos genes. De esta forma, las neuroesferas obtenidas a lo largo del eje A-P del tubo neural expresan *Emx2* (“Empty spiracles homeobox 2”), *En2* (“Engrailed 2”), y *Egr2* (“Earle growth response 2”) los cuales, *in vivo*, se localizan exclusivamente en el telencéfalo, mesencéfalo–metencéfalo y mielencéfalo, respectivamente (Hitoshi et al., 2002; Santa-Olalla et al., 2003). La expresión de algunos genes de identidad de las CPNs puede cambiarse al colocar las neuroesferas en rebanadas de cerebro embrionario (Hitoshi et al., 2002), estos datos indican que las CPNs requieren señales del entorno en el tubo neural para preservar completamente su identidad y mantienen cierto grado de plasticidad que les permite cambiar su identidad en presencia de señales extrínsecas.

A pesar de que los cultivos celulares son una herramienta útil para poder expandir CPNs, evaluar su compromiso específico en estas condiciones es complicado debido a la falta de conocimiento acerca de los factores requeridos para el mantenimiento de las células sin que mueran o cambien su identidad original (Bang et al., 2015; Santa-Olalla et al., 2003). Asimismo, aunque recientemente se han logrado avances significativos, aún no se conocen todos los factores ni la temporalidad requeridos para la diferenciación específica de la mayoría de los linajes neuronales.

Si bien, el estado de especificación y de compromiso de una CPN puede ser estimado por un código de expresión genético (Bang and Goulding, 1996), una evaluación definitiva solo puede provenir de un ensayo funcional. En teoría, una célula especificada continuaría su diferenciación en ausencia de factores externos, sin embargo, experimentalmente esta evaluación está limitada por la poca sobrevivencia que tienen las células en ausencia de factores de crecimiento. Por lo tanto, la evaluación de un cambio de destino de una célula presuntamente especificada es preferible hacerla utilizando un ensayo de trasplante ectópico; así, la plasticidad de las CPNs ha sido estimada, con más precisión, trasplantando fragmentos de tejido de una región del SNC a otra, una estrategia principalmente usada en embriones de fácil acceso (pollo o rana) (Alvarado-Mallart et al., 1990; Grapin-Botton et al., 1997; Itasaki et al., 1996). No obstante, en estas condiciones las células todavía estarían expuestas a las señales de su nicho que pudieran permanecer en el tejido trasplantado, lo cual evitaría que se pudiera evaluar su potencial real.

En el ratón, la determinación de la plasticidad de CPNs disociadas, tomadas de diferentes regiones y etapas de desarrollo, ha sido valorada al reintroducirlas en el SNC embrionario inyectándolos en el ventrículo o directamente en el parénquima (Campbell et al., 1995; Fishell, 1995; Olsson et al., 1998; Olsson et al., 1997), donde se observó que las células se integran en varias regiones, preferentemente en su lugar de origen, pero con muy baja eficiencia.

Con el propósito de incrementar la eficiencia de la integración específica en un sitio, en nuestro laboratorio se desarrolló un protocolo de trasplantes en explantes embrionarios. El cultivo de explantes organotípicos ha sido una de las estrategias

principales para evaluar el potencial *in vitro* de CPNs trasplantadas al cerebro embrionario y adulto (Benninger et al., 2003; Carletti et al., 2002; Fishell, 1995), sin embargo, en la mayoría de los casos no se compara el desarrollo del tejido con la neurogénesis *in vivo*. Un sistema óptimo tiene que mostrar un desarrollo muy similar al del tejido en el embrión durante la etapa relevante para la neurogénesis del tipo neuronal a analizar.

En nuestro caso, comprobamos que los explantes de mesencéfalo y telencéfalo de E10.5 recapitulan el pico de neurogénesis embrionaria, basados en la presencia de células β -III Tubulina⁺, que se observan desde la zona ventricular hasta la superficie pial del explante, y en la poca o nula cantidad de células gliales existentes, coincidente con la etapa del desarrollo que alcanzan los explantes *in vitro* (~E14.5) (Baizabal and Covarrubias, 2009; Baizabal et al., 2010). En el caso del mesencéfalo, al inicio del cultivo no se observan neuronas dopaminérgicas (positivas para la enzima limitante en la síntesis de dopamina, tirosina hidroxilasa, Th), pero al término aparecen muchas neuronas alrededor de la línea media ventral (Baizabal, 2009). En el telencéfalo seguimos el desarrollo de las neuronas gabaérgicas de la eminencia gangliónica media en la región ventral, que, de la misma forma que las neuronas dopaminérgicas en los explantes de mesencéfalo, aparecen durante el cultivo (Baizabal et al., 2010). Usando este sistema se ha determinado el potencial de diferenciación de diferentes poblaciones de CPNs cultivadas o provenientes del embrión (Baizabal et al., 2012; Baizabal and Covarrubias, 2009; Baizabal et al., 2010). En particular, se evaluó el momento en que las CPNs del telencéfalo ventral se determinan. Se trasplantaron células disociadas de embriones de E8.5 y E10.5

a la línea media ventral de explantes de mesencéfalo y se evaluó su diferenciación, encontrando que las CPNs de E8.5 pueden re-especificarse al nuevo sitio mientras que las de E10.5 ya están comprometidas y mantienen marcadores de su sitio de origen (Baizabal et al., 2010).

Las neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo

El estudio del desarrollo de las neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo (DAm) es de particular interés debido a que su pérdida está relacionada con la enfermedad del Parkinson, una de las enfermedades neurodegenerativas más comunes. Las neuronas DAm constituyen alrededor del 75% de todas las neuronas dopaminérgicas en el cerebro adulto (Wallen and Perlmann, 2003). Se localizan en la región ventral del mesencéfalo donde se organizan lateralmente en el campo retrorubal y la sustancia nigra pars compacta (SN), y medialmente en el área ventral tegmental (AVT) (Fig. 5). Las neuronas de la SN proyectan al estriado, formando la vía nigroestriatal que controla los movimientos involuntarios; la degeneración de este grupo de neuronas provoca los síntomas característicos de la enfermedad de Parkinson (von Bohlen und Halbach, 2004). Las neuronas del AVT proyectan al estriado ventromedial y a las áreas corticales y subcorticales, formando el sistema límbico mesocortical, el cual está envuelto en la regulación del comportamiento emocional y mecanismos de motivación y recompensa; su desregulación se asocia con la adicción a sustancias y depresión (Kelley and Berridge, 2002), y contribuye a algunos síntomas de la esquizofrenia (Egan and Weinberger, 1997). Las neuronas del campo retrorubal proyectan al estriado dorsal y también conectan con neuronas de la SN y AVT (Arts et al., 1996) (Fig. 5).

El nacimiento de las neuronas DAM inicia en el área rostral al organizador del istmo y depende de la integración de señales A-P y D-V. Estas señales promueven dos procesos relacionados pero diferentes: la especificación del mesencéfalo en general, y la especificación de los precursores DAM en particular. La distinción entre estos dos procesos es esencial para la definición de la cascada de señalización que lleva a la generación de las neuronas DAM.

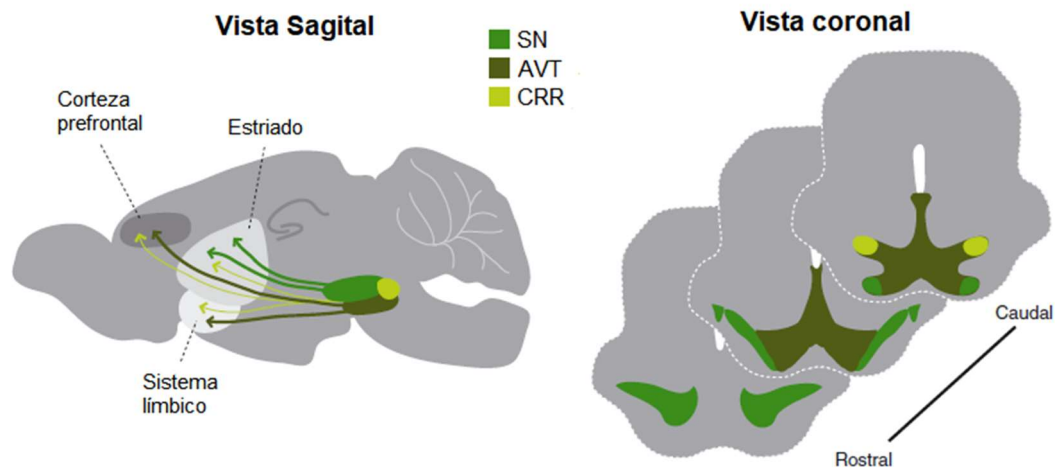


Figura 5. Las neuronas DAM en el cerebro adulto. Representación esquemática de un corte sagital y coronal del cerebro adulto murino, donde se ilustra el lugar donde residen los 3 tipos de neuronas DAM y hacia donde dirigen sus proyecciones. AVT, área ventral tegmental; CRR, campo retrorubal; SN, sustancia nigra. (Modificado de Blaess and Ang (2015)).

Establecimiento de la línea media ventral mesencefálica

Uno de los eventos más cruciales y tempranos en el desarrollo del tubo neural es la formación del istmo en la frontera entre el mesencéfalo y el metencéfalo, alrededor de E7.5, al final de la gastrulación. El istmo se forma debido a la acción complementaria de *Otx2* (“Orthodenticle homeobox 2”) y *Gbx2* (“Gastrulation brain homeobox 2”) en el epiblasto anterior y posterior, respectivamente (Wurst and Bally-Cuif, 2001). Subsecuentemente, *Pax2* se expresa en la interfase entre los dominios *Otx2/Gbx2* y *Wnt1* (“Wingless–type MMTV integration site family member 1”) en los

territorios *Otx2*⁺. La expresión de *Fgf8*, mediada por *Pax2*, comienza en E8 en la región *Gbx2*⁺ (Ye et al., 1998) y después se restringe al istmo alrededor de E9, formando una imagen especular con el dominio *Wnt1*⁺. La activación de *Fgf8* es controlada también por *Lmx1b* (“LIM homeobox transcription factor 1 beta”) el cual, directa o indirectamente, es importante para el mantenimiento de la expresión de otros genes del istmo como *Wnt1*, *En1/2*, *Pax2* y *Gbx2* (Guo et al., 2007). Los factores de transcripción *En1/2* se expresan a través de los límites de los dominios *Otx2/Gbx2*, donde son requeridos para el mantenimiento de la expresión de *Fgf8*, aunque su expresión temprana no depende de ellos. La pérdida de función de *En1/2* genera una severa disminución en el tamaño del mesencéfalo y de la parte anterior del cerebro posterior; y, aunque un pequeño número de neuronas *Th*⁺ se encuentran en los mutantes en E11.5, para E14.5 estas neuronas se pierden, lo que sugiere que no están propiamente especificadas (Simon et al., 2004). Es de notar que la mayoría de la actividad morfogenética del istmo se debe a *Fgf8* y *Wnt1* que, además de su rol en la formación del mesencéfalo, tienen una función directa en el desarrollo de las neuronas DAm. Un entrecruzamiento entre estas vías de señalización contribuye a establecer la identidad y el número de precursores comprometidos a diferenciar a neuronas DAm (Lee et al., 1997; Liu and Joyner, 2001; Matsunaga et al., 2002). *Fgf8* regula la expresión de *Wnt1* en el istmo (Chi et al., 2003) y una actividad de *Fgf* también lo hace en el mesencéfalo ventral, como lo revelan los ratones doble y triple *knockout* para los genes que codifican a los receptores de *Fgf* (Saarimaki-Vire et al., 2007). Importantemente, *Wnt1* es requerido para la inducción ectópica de neuronas DAm por acción de *Fgf8* y *Shh* en el cerebro anterior y posterior (Prakash et al., 2006) (Fig. 6).

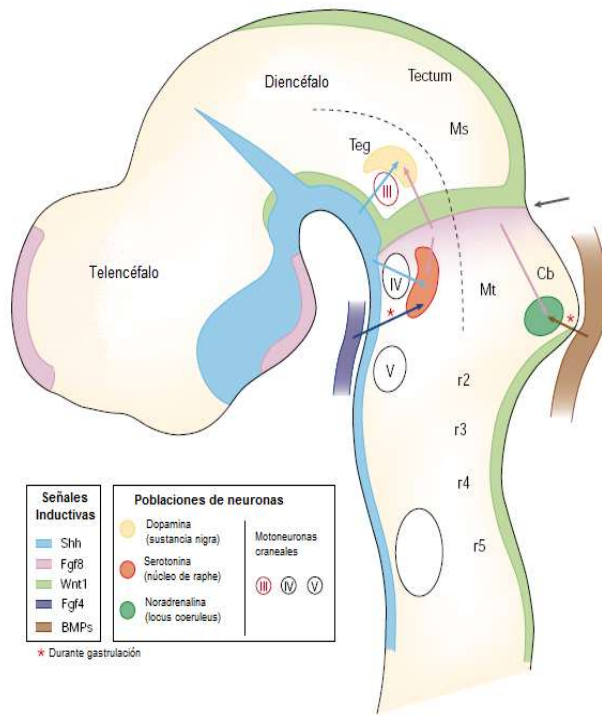


Figura 6. La interacción de las señales que especifican a las neuronas DAM en los ejes D-V y A-P. Vista sagital de un ratón E11. Las señales inductivas mostradas (factores secretados, flechas) se originan de la placa neural en la unión mes-metencefálica (Fgf8 y Wnt1) y la placa del piso (Shh), así como de tejidos no neurales durante la gastrulación (Fgf4 del mesodermo anterior, y BMPs del ectodermo dorsal no neural). Las motoneuronas del nervio craneal III y las neuronas dopaminérgicas en la región ventral responden a la combinación de Shh y Fgf8. Las neuronas serotoninérgicas del puente requieren la señalización temprana de Fgf4, seguida de Shh y Fgf8. Las neuronas noradrenérgicas del locus coeruleus requieren Fgf8 y Bmp4. La flecha señala el istmo. (Cb, cerebelo; Ms, mesencéfalo; Mt, metencéfalo; r, rombómeros; Teg, tegmento; Tel, telencéfalo) (tomado de Wurst and Bally-Cuif (2001)).

Al mismo tiempo de la formación del istmo, Shh, secretado por la notocorda, está promoviendo la formación de la placa del piso, al inducir la expresión de *Foxa2* (“Forkhead box A2”) en E8.0 (Placzek and Briscoe, 2005; Sasaki et al., 1997). *Foxa2*, a su vez, reprime la expresión de *Gli1-3* (“Glioma-associated oncogene 1-3”) y activa la de *Shh* (Metzakopian et al., 2012). La vía de señalización de Shh comienza cuando este se une a su receptor Ptch1 (“Patched 1”), el cual libera la inhibición en su co-receptor Smo, esta señal evita que los factores de transcripción Gli1 y Gli2 se procesen y se conviertan en represores (Blaess et al., 2006). Altas concentraciones de Shh inducen la expresión de *Foxa2* en la placa del piso (Sasaki et al., 1997), importante para la especificación DAM; mientras que en la placa basal, situada adyacente a la placa del piso, los niveles más bajos de Shh y *Foxa2* activan a *Nkx6.1* (“Nk6 homeobox 1”) (Nakatani et al., 2010). Como es de esperarse, la falta

de *Foxa2*, y del factor de transcripción *Foxa1* de la misma familia, reduce el número de neuronas DA en el mesencéfalo (Lin et al., 2009) (Fig. 7A).

Especificación dopaminérgica de las CPNs

Lmx1a (“LIM homeobox transcription factor 1 alpha”) y *Lmx1b* están entre los primeros marcadores que identifican a las CPNs DAm, y son reguladores clave de su diferenciación. Junto con *Fgf8* y *Wnt1*, *Lmx1b* tiene dos roles; uno está relacionado con la formación y el mantenimiento del istmo, como se describe arriba, y, en consecuencia, es esencial para el desarrollo del mesencéfalo ya que la expresión de *Lmx1b* es detectada antes del surgimiento de los precursores DAm (E7.5). El otro tiene que ver directamente con la generación y mantenimiento de las neuronas DAm ya que su expresión se mantiene en las neuronas hasta el adulto en la SN y AVT (Smidt et al., 2000). Por otro lado, *Lmx1a*, que se expresa en la línea media ventral del mesencéfalo alrededor de E9, parece ser esencial para la diferenciación DAm en el pollo pero su ausencia causa solo una reducción de estas neuronas en el ratón (Andersson et al., 2006; Ono et al., 2007). *Otx2* es necesario para la expresión de *Lmx1a* en la placa del piso pero, aparentemente, no para *Lmx1b* (Omodei et al., 2008; Ono et al., 2007). Asimismo, *Foxa2* también se requiere para inducir y/o mantener la expresión de *Lmx1a* y *Lmx1b* (Lin et al., 2009). Por lo tanto, *Foxa2* y *Otx2* podrían cooperar para definir la expresión de *Lmx1a*, y posiblemente *Lmx1b*, en los precursores ventrales del mesencéfalo. Estudios *in vitro* muestran que cuando *Foxa2*, *Lmx1a* y *Otx2* se sobreexpresan en precursores neurales derivados de CTE en ausencia de *Shh*, se induce robustamente la producción de neuronas Th^+ que además expresan *Lmx1a* y *Nr4a2* (“Nuclear

receptor subfamily 4 group A member 2) (Chung et al., 2009). Esta generación tan eficiente de neuronas DAm no se observa cuando *Foxa2* u *Otx2* son introducidos solos en las células. Con esto, es aparente que *Lmx1a* es un factor determinante de la especificación DAm y, junto con *Otx2*, daría identidad mesencefálica a las CPNs; a su vez, *Foxa2* podría requerirse para activar la vía de señalización de *Shh*, importante para la diferenciación DAm. Conjuntamente, se ha identificado un circuito de regulación entre *Wnt1* y *Lmx1a/b* relevante para la especificación DAm. En las CTE *Wnt1* induce la activación de *Lmx1a* independientemente de *Shh* y *Otx2*, mientras que *Lmx1a* y *Lmx1b* regulan positivamente a *Wnt1* uniéndose directamente a su promotor (Chung et al., 2009). Este circuito autorregulatorio, además, regula la expresión de *Otx2* a través de la vía de señalización canónica de *Wnt*, y también la expresión de *Nr4a2* y *Pitx3* ("Paired-like homeodomain 3") por medio de *Lmx1a*. *Lmx1a* y *Lmx1b* parecen regularse también entre ellos y, en la ausencia de uno, el otro puede compensar la función perdida en la regulación de sus genes blanco (Chung et al., 2009) (Fig. 7A).

Río debajo de la señalización de *Shh*, *Foxa1/2* inhiben la expresión de *Nkx2.2* ("Nk2 homeobox 2") y *Helt* ("Hes/Hey-like transcription factor") (Lin et al., 2009), factores de transcripción presentes en el dominio adyacente al de *Lmx1a* en etapas tempranas, cuya expresión se limita después a las células localizadas en los dominios dorsal y ventral al de *Nkx6.1*, las cuales darán lugar a neuronas gabaérgicas (Nakatani et al., 2007). Por otro lado, *Nkx6.1* está presente en el dominio DAm al inicio de la expresión de *Lmx1a*, pero después es reprimido por *Msx1* ("Msh homeobox 1"), que es activado por *Shh* (Andersson et al., 2006). Así,

la expresión de *Nkx6.1* se limita a las regiones adyacentes al dominio *Lmx1a*⁺, donde se generan motoneuronas (Fedtsova and Turner, 2001).

Varios factores relevantes para la neuralización y especificación de las CPNs DAm han sido probados en CTE. La sobreexpresión solo de *Msx1* en CTEs no promueve la generación de neuronas DAm, aunque es suficiente para inducir la expresión de *Neurog2* (Andersson et al., 2006). En contraste, la sobreexpresión de *Lmx1a* bajo el control del promotor de *Nestina* en CTE tratadas con Fgf8 y Shh provoca un gran aumento en el número de células que expresa *Msx1* y una reducción en las que expresan *Nkx6.1*. También, hay una generación robusta de neuronas inmaduras Th⁺, muchas de las cuales expresan otros genes DAm como *Lmx1a*, *Lmx1b*, *En1/2*, *Nr4a2*, *Pitx3*, *Foxa2*, *Slc18a2* (“Solute carrier family 18 member A2”) y *Slc6a3* (“Solute carrier family 3 member A3”) (Andersson et al., 2006; Friling et al., 2009).

Neurogénesis DAm

Una característica única de las neuronas DAm es que sus precursores se originan de la placa del piso, mientras que en otras regiones del tubo neural estas células no tienen propiedades neurogénicas (Bonilla et al., 2008; Kittappa et al., 2007; Ono et al., 2007; Placzek and Briscoe, 2005). Esto se ha establecido claramente gracias a experimentos de mapeo de destino donde se observa que las células que expresan *Shh* en la placa del piso son las que se convierten en neuronas DAm (Blaess et al., 2011; Hayes et al., 2011; Ono et al., 2007). Esta diferencia en el potencial neurogénico se debe en parte a la acción de *Ferd3l* (“Fer3-like bHLH transcription factor”), marcador de la placa del piso que es regulado positivamente por *Foxa1/2* (Mansour et al., 2011; Metzakopian et al., 2012); si bien *Ferd3l* parece no tener un

efecto sobre la especificación de los precursores DAm, si lo tiene en el control de su ciclo celular a través de *Hes1*, el cual es regulado negativamente por *Fzd3* (Ono et al., 2010). Los genes *Hes* son efectores de la vía de señalización de Notch la cual media interacciones célula-célula que regula la diferenciación de las células (Louvi and Artavanis-Tsakonas, 2006; Pierfelice et al., 2011). En el mesencéfalo *Notch1*, 2 y 3, *Dll1* y *Jag1* se expresan en la región ventricular (Lindsell et al., 1996). La pérdida de *Notch1* en el mesencéfalo genera neurogénesis prematura (Lutolf et al., 2002), mientras que *Notch2* parece tener un papel más relevante en el desarrollo de la placa del techo del diencefalo y mesencéfalo (Kadokawa and Marunouchi, 2002). En contraste con otras regiones del SNC, las células de la placa del piso del mesencéfalo expresan *Dll1* (Ono et al., 2007), lo cual también está asociado con la peculiar actividad neurogénica de esta región (Joksimovic et al., 2009; Ono et al., 2007).

Además de los factores mencionados, esta transición también podría ser guiada por la acción de la vía canónica de Wnt, activada por *Otx2* en el mesencéfalo (Omodei et al., 2008; Ono et al., 2007). Alrededor de E10.5, *Wnt1* suprime los niveles de expresión de *Shh*, posiblemente mediado por *Msx1* (Joksimovic et al., 2009), y, en consecuencia, se induce la expresión de *Neurog2* (Ono et al., 2007), un gen proneuronal que regula la salida del ciclo celular y la expresión de otros marcadores neuronales como *NeuroD* y β -III *Tubulina* (Lacomme et al., 2012; Mizuguchi et al., 2001). *Foxa1/2* aparentemente también contribuyen a la activación de *Neurog2* (Ferri et al., 2007), lo cual refuerza esta vía regulatoria de la diferenciación DAm. *Neurog2* y *Ascl1*, además, controlan la expresión de *Dll1* y, en consecuencia, algunos genes asociados con la señalización de Notch, como *Hes5* (Castro et al.,

2006; Kele et al., 2006). Así, la inducción de *Neurog2* junto con la de *Ascl1* marcan el inicio de la neurogénesis en si misma (Kele et al., 2006).

La familia de receptores de hígado X (por sus siglas en inglés Lxr) también tiene una función en la neurogénesis DAm. Ambos, Nr1h3 (“Nuclear receptor subfamily 1 group H member 2/3”) (Lxr α) y Nr1h2 (Lxr β), son receptores nucleares que son activados por oxisteroles, derivados oxidados del colesterol; sus transcritos aumentan su expresión en las CPNs alrededor del momento de la neurogénesis DAm. La pérdida de *Nr1h2/3* lleva a un decremento en *Lmx1b*, *Wnt1* y *Neurog2* y en la neurogénesis DAm (Sacchetti et al., 2009). Además, la activación de Nr1h2/3 por el ligando endógeno del mesencéfalo 24, 25-epoxicolesterol promueve específicamente la neurogénesis DAm *in vivo* y en CTE humanas (Theofilopoulos et al., 2013).

Diferenciación de las neuronas DAm

Después de la neurogénesis, las células postmitóticas localizadas en la región intermedia comienzan su diferenciación y migración hacia la zona del manto. Este proceso es regulado por los factores descritos previamente como Otx2, Lmx1a/b, Foxa1/2 y En1/2, los cuales se mantienen en las células DAm postmitóticas. Estas proteínas regulan la actividad de factores de transcripción tardíos como Nr4a2 y Pitx3, involucrados en la definición de las características fenotípicas dopaminérgicas, así como el mantenimiento de las neuronas. *Wnt5a* también promueve la diferenciación de los progenitores a neuronas DAm funcionales, los ratones nulos en *Wnt5a* tienen un exceso de neuronas inmaduras Nr4a2⁺/Th⁻ pero

no en neuronas maduras, lo que indica un defecto en la diferenciación (Andersson et al., 2008).

Foxa1/2 funcionan cooperativamente con *Lmx1a/b* para regular la expresión de *Nr4a2* y *Pitx3* en las neuronas inmaduras (Chung et al., 2009) y también activan directamente a *Th*, *En1* y *Ddc* (dopa descarboxilasa) (Ferri et al., 2007; Stott et al., 2013). *Nr4a2* se requiere para la supervivencia de las neuronas inmaduras DAm y la diferenciación a neuronas Th^+ (Zetterstrom et al., 1997), además regula la expresión de varios genes que definen a una neurona DAm madura como *Slc18a2* (transportador vesicular de monoaminas 2, *Vmat*), *Slc6a3* (transportador de dopamina, *Dat*), *Ddc*, *Bdnf* ("Brain-derived neurotrophic factor") y *Cdkn1c* ("cyclin-dependent kinase inhibitor 1C") (Gil et al., 2007; Jankovic et al., 2005; Joseph et al., 2003; Saucedo-Cardenas et al., 1998; Smits et al., 2003; Volpicelli et al., 2007).

Pitx3 es uno de los primeros marcadores de neuronas DAm (Chung et al., 2005; Nunes et al., 2003; Smidt et al., 2004), aunque, a diferencia de *Nr4a2*, su pérdida no cambia el número de neuronas DAm en el AVT, pero si en el de la SN, las cuales lo necesitan para sobrevivir (Smidt et al., 2004). Un blanco directo de *Pitx3* es el gene de *Aldh1a1* (Aldehído deshidrogenasa 1a1), el cual incrementa la síntesis de ácido retinoico y activa la transcripción de *Th* y *Drd2* (Receptor de dopamina 2), asimismo, *Pitx3* actúa independientemente del ácido retinoico para regular positivamente a *Slc18a2* y *Slc6a3* (Jacobs et al., 2011). Además, *Nr4a2* y *Pitx3* se regulan entre ellos (Jacobs et al., 2009; Volpicelli et al., 2012) y son necesarios para el mantenimiento de las neuronas DAm en el adulto (Kadkhodaei et al., 2009; van den Munckhof et al., 2003). *En1* y *En2*, aparte de participar en el establecimiento de los límites entre cerebro medio y posterior en etapas tempranas, también juegan un

papel relevante en la supervivencia de las neuronas DAm (Alberi et al., 2004; Simon et al., 2001; Simon et al., 2004) (Fig. 7A).

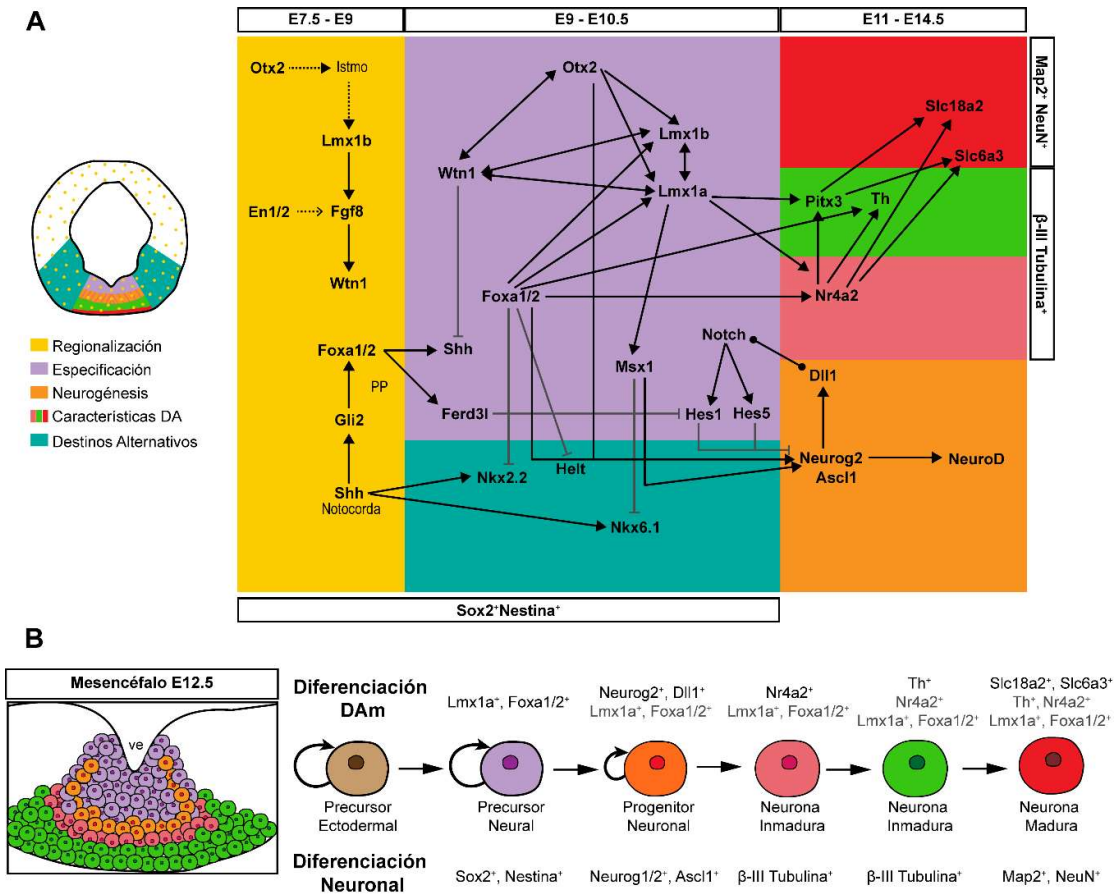


Figura 7. Regulación de la diferenciación DAm. (A, izquierda) Representación de un corte coronal de un mesencéfalo embrionario en el cual se muestran las regiones donde se llevan a cabo distintos eventos regulatorios que se durante el desarrollo de las neuronas DAm. (A, derecha) Interacciones entre los diferentes determinantes de los eventos claves que dan lugar a la generación de las neuronas DAm (los cuadros de colores representan lo mismo que en el panel izquierdo). Las flechas representan regulaciones directas o indirecta confirmadas. Las flechas con líneas punteadas representan regulaciones indirectas. Las líneas con círculos representan interacciones proteína-proteína. PP; placa del piso. (B) Representación de un corte coronal de mesencéfalo de E12.5 donde se muestran las distintas poblaciones celulares que se forman durante la diferenciación DAm. Las CPNs llevan a cabo dos programas de diferenciación al mismo tiempo, el DAm y el neuronal, con marcadores característicos en cada una de las etapas de diferenciación.

La función de algunos de estos factores de transcripción tardíos ha sido probada en diferentes sistemas de cultivo. La sobreexpresión de *Nr4a2* en CPNs embrionarias de distintas regiones del cerebro cultivadas en monocapa o después de la formación de neuroesferas, induce la generación de células Th^+ (Kim et al., 2007; Kim et al.,

2003); sin embargo, otras características DAM no fueron reportadas. Cuando la sobreexpresión se induce en CPNs derivadas de CTEs, *Th* y otros marcadores neuronales DAM como *Slc6a3* se detectan pero *Nr4a2* no logra inducir a los factores de especificación (Martinat et al., 2006; Sonntag et al., 2004). Por otro lado, la sobreexpresión de *Pitx3* en CPNs derivadas de CTEs no es suficiente para inducir completamente el fenotipo DAM, pero promueve algunos marcadores, particularmente *Aldh2* (Chung et al., 2005; Martinat et al., 2006). Incluso *Nr4a2* y *Pitx3* juntos no son capaces de inducir diferenciación DAM en CTE y solo aparecen algunos marcadores terminales (Martinat et al., 2006). Las observaciones previas van de acuerdo con rol directo de estos factores de transcripción en la expresión de *Th* y otros genes que contribuyen al fenotipo terminal DAM.

Determinación de las neuronas DAM

A pesar de que recientemente se han elucidado muchos de los factores necesarios para la diferenciación de las neuronas DAM, no ha sido determinado el momento en el que una CPN mesencefálica se compromete al linaje dopaminérgico. Se ha visto que las CPNs DAM de E12.5 cultivadas *in vitro*, ya sea en monocapa o como neuroesferas, generan muy pocas neuronas DA (Bang et al., 2015; Chung et al., 2006; Meyer et al., 2012; Yan et al., 2001). A pesar de que las CPNs pierden el potencial de generar neuronas *Th*⁺ al poco tiempo de iniciar su cultivo, logran mantenerse proliferando durante varios pases y, notablemente, conservan la expresión de algunos marcadores de especificación DAM como *Otx2*, *En2* y *Foxa2* (datos no publicados Covarrubias, L.); sin embargo, tienen una tendencia a producir más astrocitos que neuronas al inducirse su diferenciación, lo que sugiere que han

perdido potencial neuronal pero no totalmente su identidad DAm (Chung et al., 2006; Meyer et al., 2012) Es notable que *Lmx1a* y otros factores de transcripción importantes para la generación de las neuronas DAm no son capaces de promover diferenciación específica cuando se sobreexpresan en las neuroesferas de rata de etapa similar, lo cual sugiere que estas CPNs ya no son competentes a responder a estos factores (Roybon et al., 2008). Esta pérdida de potencial puede deberse al estado intrínseco de las células o a las inadecuadas condiciones de cultivo, por lo que, como se mencionó antes, experimentos de trasplantes arrojan información más atinada sobre el estado de especificación/determinación de las CPNs.

Estudios previos han mostrado que cuando tejido del mesencéfalo caudal de embriones de pollo del estadio 10 (alrededor de E9 en ratón) es trasplantado al cerebro anterior, mantiene su identidad regional (la expresión de *En1*) (Alvarado-Mallart et al., 1990; Gardner and Barald, 1991), incluso llega a influenciar al tejido huésped induciendo la expresión de *En1*; sin embargo, cuando se trasplanta el mesencéfalo medio las células pierden la expresión de *En1*. Estos resultados podrían deberse a dos razones, una es que las células del mesencéfalo caudal estén comprometidas al destino mesencefálico y las medias no, lo cual hace que sean más plásticas y logren re-especificarse. La segunda es que el nicho caudal tiene las señales necesarias para mantener e inducir la expresión de *En1*, y al ser trasplantado el tejido completo el nicho como tal permanezca intacto.

Experimentos utilizando las células disociadas del mesencéfalo de E10.5 inyectadas en el ventrículo del SNC embrionario, muestran que las células tienden a integrarse con mayor frecuencia al mesencéfalo que a otras regiones del cerebro y las que logran integrarse al telencéfalo ventral embrionario son capaces de re-

especificarse, mientras que las de embriones de E13.5 retienen su identidad original (Campbell et al., 1995; Olsson et al., 1997). Estos datos sugieren que la determinación del destino DAm comienza después de E10.5.

El estado de compromiso de los precursores DAm ha sido molecularmente estimado por la expresión de diversos genes a través del proceso de diferenciación. Por ejemplo, las CPNs Lmx1a⁺Foxa2⁺ identifican a la población especificada que parece comprometerse una vez que adquieren la expresión de *Neurog2*, mayoritariamente presente en progenitores postmitóticos (Lacomme et al., 2012; Thompson et al., 2006); no obstante, no está claro si las CPNs pueden estar comprometidas al linaje DAm antes de salir del ciclo celular. Hasta la fecha no se ha reportado la expansión de CPNs comprometidas a un linaje neuronal particular, lo cual sugiere que el compromiso de las células se adquiere al dejar de estar mitóticamente activas. El lograr obtener CPNs específicas de un tipo neuronal que logren mantener sus cualidades durante varios pases *in vitro* ayudaría a obtener mayores cantidades de neuronas específicas para fines terapéuticos sin necesidad de hacer modificaciones genéticas.

HIPÓTESIS

La adquisición de las características terminales dopaminérgicas y el establecimiento del fenotipo neuronal son procesos desacoplables en la diferenciación de las neuronas dopaminérgicas.

OBJETIVO GENERAL

Determinar la relación que existe entre la adquisición de adquisición del fenotipo terminal DAm y neuronal en los precursores dopaminérgicos del cerebro medio embrionario de ratón.

Objetivos particulares

- Determinar la etapa del desarrollo en la que los precursores dopaminérgicos del cerebro medio se determinan.
- Evaluar el impacto de señales neurogénicas sobre la diferenciación DAm.
- Determinar el efecto que tiene la astrogénesis sobre la diferenciación DAm
- Evaluar el potencial de diferenciación de cultivos primarios de precursores DAm durante el desarrollo.

MATERIALES Y MÉTODOS

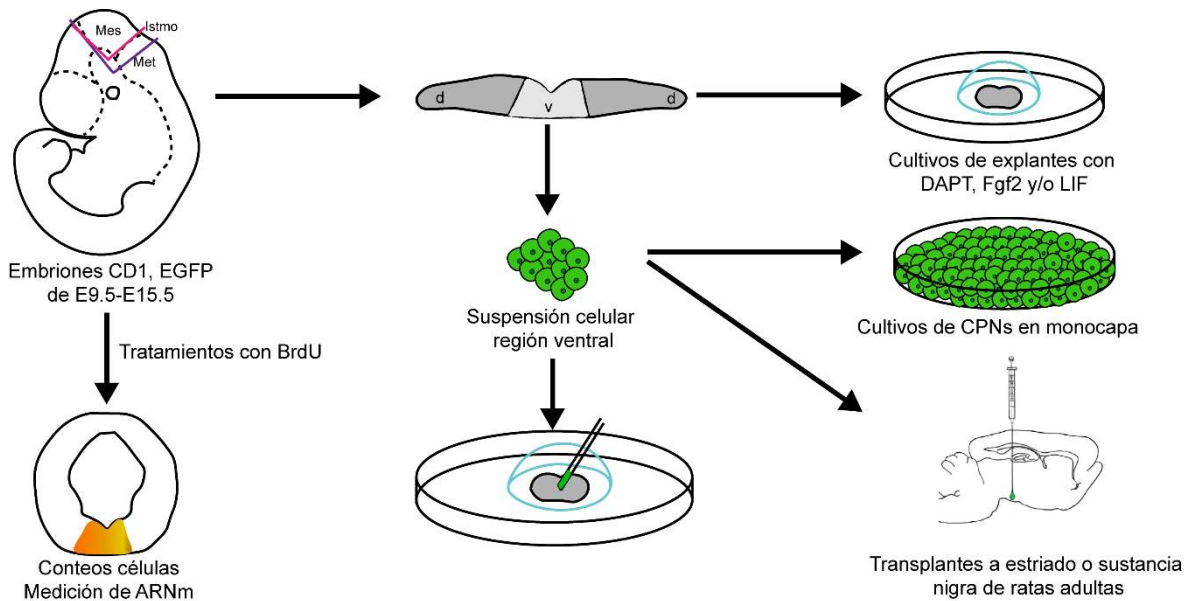


Figura 8. Estrategia experimental. Embriones de la cepa CD1 fueron usados para los tratamientos con BrdU, cultivos de explantes y cultivos en monocapa de CPNs. Embriones de la cepa EGFP se utilizaron para hacer la suspensión celular a trasplantar. Las líneas rosa muestran la región que se diseccó para obtener la suspensión celular, hacer qPCRs y para los cultivos en monocapa. Las líneas moradas muestran la región diseccada para obtener los explantes.

Animales y tratamientos con BrdU

Los ratones utilizados fueron de las cepas CD1, de la línea transgénica EGFP (Hadjantonakis et al., 1998), con fondo genético en la cepa L129 (*Enhanced Green Fluorescent Protein*, que expresa constitutivamente la proteína verde fluorescente), donada por Andras Nagy y la línea mutante $Dll1^{LacZ/+}$ (Hrabe de Angelis et al., 1997), con fondo genético en la cepa CD1, donada por Olivier Pourquié. Los machos homocigotos de la línea EGFP se cruzaron con hembras CD1 para obtener embriones heterocigotos. Los embriones del mutante $Dll1^{LacZ/+}$ se obtuvieron cruzando ratones heterocigotos debido a que la mutación en ambos alelos es letal en E11.5. El día de la detección del tapón vaginal fue considerado como E0.5. Las

hembras fueron sacrificadas por dislocación cervical siguiendo los lineamientos de cuidado animal institucionales, y los embriones fueron extraídos en el día de gestación de interés (E9.5 – E12.5).

Tratamientos con BrdU

Para analizar las células en división en el mesencéfalo ventral embrionario, se hizo una inyección intraperitoneal de 5-Bromo-2-Desoxiuridina (BrdU, Sigma) en hembras preñadas de la etapa deseada y se sacrificaron 0.5, 2, 12, 24 o 48 h después; se disecó el mesencéfalo y se procesó el tejido como se describe abajo. Para los tratamientos de 0.5 y 2 h se inyectaron 80 mg/kg, para 12, 24 y 48 h, 150 - 250 mg/kg. El BrdU se diluyó en PBS 1X estéril (ver apéndice) y se calentó a 37° C para promover la solubilización.

Disección de mesencéfalos

Los embriones de la etapa deseada se extrajeron del útero y se sacaron del saco amniótico con pinzas de disección (Roboz) utilizando un microscopio estereoscópico (Leica). Los mesencéfalos se obtuvieron haciendo un corte en la flexura cefálica y un corte posterior a la altura del “labio rómbico” en el caso de los explantes, o en el límite anterior del istmo para obtener la suspensión celular para trasplantar o cultivar en monocapa (Fig. 8). No se quitaron las meninges para no maltratar el tejido, excepto en los embriones de E12.5. Todos los pasos de la disección de los embriones se hicieron en DMEM/F12 (Gibco, ver apéndice) frío. Los mesencéfalos que se utilizaron directamente para inmunofluorescencia fueron fijados después de su disección (ver “Procesamiento de tejido”). Para cultivos de explantes, monocapa o agregación ver secciones correspondientes.

Cultivo de explantes en colágena

Los mesencéfalos E9.5 – E11.5 se obtuvieron de embriones de la cepa CD1. Después de hacer la disección del mesencéfalo se siguió el siguiente procedimiento, descrito previamente en Baizabal and Covarrubias (2009):

1. La línea media dorsal del mesencéfalo se corta para cultivar los tejidos en forma de “libro abierto”.
2. Con la ayuda de una punta azul recortada se transfirieren los tejidos a una caja Petri de 35 mm (Corning), depositando cada tejido en una pequeña gota de medio.
3. Los mesencéfalos se colocan con la superficie ventricular hacia arriba y se remueve el medio de la gota.
4. Se agregan 35 μ L de la mezcla de colágena que contiene: 25% (v/v) colágena de rata (donada por el Dr. Alfredo Varela), 2.5% (v/v) NaCl 1.5 M (Sigma), 2.5% (v/v) NaHCO₃ al 7.5% (Sigma) y 70% (v/v) de medio para explantes. El medio para explantes se compone de Optimem con Glutamax (72% v/v; Gibco), DMEM-F12 (25% v/v), Glucosa 40 mM (Sigma) y GPS 1x (Glutamax, Penicilina, Estreptomicina, ver apéndice). Los tejidos se acomodan para que estén totalmente embebidos en la colágena y se incuban a 37° C en 5% CO₂ / 95% aire atmosférico para permitir la gelificación de la colágena, aprox. 1 h.
5. Después de este tiempo se añade, suavemente, 2 mL de medio para explantes, cambiando la mitad cada 2 días.

El tiempo de cultivo dependió de cada experimento y etapa de gestación, dejándolo máximo 7 días. Para algunos experimentos los explantes fueron tratados con Shh (400 μ M, Preprotech), el agonista de Shh (SAG; 400 nM, Santa Cruz) Fgf2 (20

ng/mL; Preprotech), LIF (80 μ L/mL; Millipore), el inhibidor de la γ -secretasa N-[(3, 5-Difluorofenil) acetil]-L-alanil-2-fenil] glicina-1, 1-dimetiletil éster (DAPT; 5 μ M; Tocris), el inhibidor de Notch (SAHM1; 10 μ M; Merck). Los explantes para implantar células se obtuvieron de embriones E10.5.

Implantes de células

La región ventral de 10-15 mesencéfalos de embriones EGFP de la etapa deseada fue disecada como se describe arriba y se siguieron los siguientes pasos:

1. Se colectan los mesencéfalos, usando una punta azul cortada, en un tubo eppendorf de 1.5 mL, mientras se juntan todos los tejidos el tubo se mantiene en hielo.
2. Se remueve la mayor cantidad de medio y se le agregan aproximadamente 30 μ L de medio DMEM-F12 fresco.
3. El tejido se disgrega con una micropipeta con punta amarilla intentando hacer la menor cantidad de burbujas, después se continúa con una punta blanca para completar la disgregación.
4. Para trasplantar las células, se adelgaza una pipeta Pasteur utilizando un mechero de alcohol, y se forma un capilar con el cual se toma la suspensión celular y se deposita un pequeño volumen sobre la superficie del explante.
5. Después de 3 h de incubación a 37°C, para permitir que las células se adhieran al tejido, se agrega cuidadosamente el medio de explantes.

Las células de la superficie ventricular del mesencéfalo se obtuvieron cortando los tejidos como en el caso de los explantes, colocando la superficie ventricular hacia

arriba, se aspiró suavemente una porción del tejido usando un capilar y las células fueron depositadas en los explantes como se describe arriba.

Agregación celular

Los mesencéfalos ventrales de E9.5 y E12.5 se obtuvieron como se describe arriba para el caso de la suspensión para trasplantar (los embriones de E9.5 fueron de la línea EGFP). Se mezclaron igual número de mesencéfalos (8 mesencéfalos) de cada etapa y se obtuvo la suspensión celular. 5 μ L de la suspensión celular se mezclaron con la colágena y se permitió que gelificara en un pozo (se utilizaron cajas de 48 pozos, Corning) antes de agregar el medio de explantes. Después de dos días las células fueron fijadas dentro de la colágena y procesadas para inmunofluorescencia.

Cultivo en monocapa de precursores neurales mesencefálicos

Los mesencéfalos se disecaron como se describió arriba y el protocolo que se siguió para el cultivo primario de CPNs fue el siguiente:

1. La suspensión de mesencéfalo ventral se prepara como se describe previamente.
Los 30 μ L se llevaron a 1 mL con medio de precursores y se cuantificaron las células usando la cámara de Neubauer (ver apéndice).
2. Las células se siembran a una densidad de 1×10^5 por pozo, previamente recubierto con ornitina/laminina (ver apéndice), y se agrega el medio de precursores: DMEM-F12 (49% v/v), Neurobasal (49% v/v; Gibco), N2 (1% v/v; ver apéndice), Insulina (10 μ g/mL; Sigma), GPS 0.5x, β -Mercaptoetanol (0.1 mM; Gibco) suplementado con 10 ng/mL de Fgf2.

3. Las células se incuban por 24 h para permitir que se adhirieran al pozo, después se cambia el medio para eliminar las células muertas.
4. En el día deseado se fijan las células como se describe abajo.

Trasplantes en ratas adultas

Ratas Wistar machos de 250 g se usaron para los trasplantes, como se reporta en Maya-Espinosa et al. (2015). Los animales fueron anestesiados con una mezcla de quetamina–xilacina (19 y 1 mg/kg respectivamente, PiSA), posteriormente se realizó una inyección intracraneal de 1 – 2 μ L de una suspensión celular (aproximadamente 150,000 células) usando una jeringa Hamilton de 5 μ L. Después de 6 días las ratas fueron anestesiadas profundamente con pentobarbital (PiSA) y se realizó una perfusión intracardiaca con 100 mL de solución de fosfatos (PBS, 0.1 M), seguida de 100 mL de paraformaldehído (PFA; Sigma; ver apéndice) al 4%.

Procesamiento de los tejidos y cultivos celulares

El tejido embrionario y los explantes fueron fijados con PFA al 4% por 2 horas a 4°C con agitación moderada. Después se hicieron 3 lavados de 15 min a 4°C con PBS y se dejaron en sacarosa (J. T. Baker) al 30% en PBS durante 24 horas para su crioprotección. Los tejidos fueron embebidos en Tissue–Tek® (Sakura Finetek) cortados coronalmente en secciones de 10 μ m de grosor usando un criostato (Microm HM550, Thermo Scientific) y colectados en portaobjetos cargados (Fisher Scientific), los cuales fueron almacenados a -20°C.

Los cerebros de ratas adultas fueron post-fijados con PFA al 4% y deshidratados con incubaciones secuenciales de 24 h en 10%, 20% y 30% de sacarosa/PBS. Posteriormente los cerebros fueron cortados en el plano coronal en rebanadas de

40 μm las cuales fueron colectadas en solución anticongelante (PBS/20% etilenglicol/20% glicerol).

Al término de los días de cultivo, las células se lavaron con PBS 2 veces y se les agregó PFA 4% frío, el cual se dejó a TA por 15 min. Después se hicieron 3 lavados de 10 min con PBS (en este punto se pueden guardar las cajas a 4°C).

Inmunofluorescencia

La evaluación de la diferenciación en los distintos modelos fue hecha mediante inmunofluorescencia. Dependiendo si son cultivos de CPNs, cortes de explantes o explantes completos el protocolo varió. Debajo se describen las particularidades para cada uno. Las diluciones de los anticuerpos primarios y secundarios fueron las mismas en todas las situaciones y se muestran en la Tabla 1. Las imágenes fueron capturadas con un microscopio Zeiss Axio Vision usando el software AxioVision LE y un microscopio confocal Olympus FLUOVIEW FV1000.

Inmunofluorescencia en cortes de tejido

1. Se dejan las laminillas a TA hasta que se quite la humedad generada por el descongelamiento y se pintan los cuadrantes con lápiz hidrofóbico (Vector).
2. Se hace un lavado con PBS durante 10 min, una vez hecho esto los tejidos nunca deben secarse por lo que las laminillas siempre se dejan en una cámara húmeda.
3. Después se lava 3 veces con PBS/0.3% Tritón X-100 (Bio-Rad), 10 min cada lavado a TA.

4. Para los anticuerpos de Neurog2, BrdU y Sox2, se hace una incubación con revelador de antígenos con buffer de citratos 1x (Bio SB) a 65°C por 20 min y posteriormente 15 min a TA. Después se hacen 2 lavados de 5 min con PBS.
5. Se incuba en la solución de bloqueo (10% suero de burro o cabra en PBS/0.3% Tritón) por 1 h a TA.
6. Los anticuerpos primarios se diluyen en la solución de bloqueo y se incuban toda la noche a 4°C, excepto el anticuerpo para BrdU el cual se diluye en una solución con ADNasa: 10% suero de burro; buffer de ADNasa 1x; 10 U ADNasa (Roche) y se incuba 1 h a 37°C y después toda la noche a 4°C.
7. Tras la incubación con el anticuerpo primario se hacen 3 lavados de 10 min con PBS.
8. Se incuba 2 h a TA con el anticuerpo secundario diluido en PBS.
9. Se hace 1 lavado de 10 min con PBS.
10. Se incuba con DAPI (4',6-diamino-2-fenilindol; Invitrogen) por 5 min para teñir núcleos.
11. Se hacen dos lavados con PBS de 10 min.
12. Se agrega la solución de montaje (Prolong gold; Molecular Probes) y se coloca el cubreobjetos tratando de no dejar burbujas.

Inmunocitoquímica fluorescente

1. Si las cajas fueron guardadas a 4°C, se dejan temperar por unos minutos y se hace un lavado con PBS.
2. Posteriormente se hacen 3 lavados de 10 min con PBS/0.3% Tritón X-100.

3. Se incuba en solución de bloqueo (10% suero de burro o cabra, PBS/0.3% Tritón) durante 30 min.
4. El anticuerpo primario se diluye en solución de bloqueo y se incuba durante toda la noche a 4°C con agitación moderada.
5. Después se hacen 3 lavados de 10 min con PBS.
6. Se incuba con el anticuerpo secundario 1 h a TA con agitación.
7. Se hace un lavado con PBS.
8. Se incuba con DAPI por 5 min.
9. Se hacen 2 lavados más con PBS y se cubre con solución de montaje.

Imunofluorescencia en tejido completo

1. Se hacen lavados con PBS/1% Tritón a 4°C a lo largo de un día (mínimo 4 lavados).
2. Se incuba con solución de bloqueo (10% Suero de burro o cabra, PBS/1% Tritón) durante 3 h a TA o toda la noche a 4°C.
3. Se dejan los tejidos con el anticuerpo primario diluido en solución de bloqueo durante 2 h a TA y después 72 h a 4°C.
4. Al término de ese tiempo se hacen lavados con PBS/1% Tritón durante 1 día, de la misma forma que los lavados iniciales (mínimo 4).
5. Se incuba con el anticuerpo secundario diluido en PBS durante 48 h a 4°C.
6. Se hacen lavados con PBS/1% Tritón durante otro día (mínimo 4).

NOTA: Todos los pasos se hacen con agitación.

Tabla 1. Anticuerpos primarios y secundarios utilizados.

Antígeno	Dilución	Especie	Marca	No. Catálogo
BrdU	1:100	Ratón	BD Bioscience	347580
Nestina	1:500	Ratón	Millipore	MAB353
Lmx1a	1:2000	Conejo	Millipore	AB10533
Th	1:500	Conejo	Millipore	AB152
Neurog2	1:75	Cabra	Santa Cruz	Sc-19233
Sox2	1:100	Cabra	Santa Cruz	Sc-17320
β -III Tubulina	1:2000	Conejo	Covance	PRB-435P
Gfap	1:5000	Conejo	Dako	Z0334
Foxa2	1:4000	Conejo	Donado por Ariel Ruiz I. Altaba	
Lmx1a	1:1000	Conejo	Donado por M. German	
Pitx3	1:5000	Conejo	Donado por M. Smidt	
Nkx6.1	1:2	ratón	DSHB	F55A10
Nkx2.2	1:2	ratón	DSHB	74.5A5
Pax7	1:2	ratón	DSHB	Pax7
pHH3	1:1000	Conejo	Upsdate	06-570
DAPI	1:5000		Thermo Fisher Scientific	D1306
Alexa Fluor-488 anti ratón	1:1000	cabra	Thermo Fisher Scientific	A11001
Alexa Fluor-594 anti ratón	1:1000	cabra	Thermo Fisher Scientific	A11005
Alexa Fluor-647 anti ratón	1:1000	cabra	Thermo Fisher Scientific	A21235
Alexa Fluor-488 anti conejo	1:1000	cabra	Thermo Fisher Scientific	A11008
Alexa Fluor-594 anti conejo	1:1000	cabra	Thermo Fisher Scientific	A11012
Alexa Fluor-647 anti conejo	1:1000	cabra	Thermo Fisher Scientific	A21244
Alexa Fluor-488 anti cabra	1:1000	burro	Thermo Fisher Scientific	A11055
Alexa Fluor-594 anti cabra	1:1000	burro	Thermo Fisher Scientific	A11058
Alexa Fluor-647 anti cabra	1:1000	burro	Thermo Fisher Scientific	A21447

Extracción de ARN y qPCR

Para la medición de ARN se utilizaron al menos 3 embriones de cada etapa evaluada o 3 explantes de cada condición y al menos 2 cultivos independientes fueron realizados. La extracción de ARN se realizó de acuerdo a las especificaciones del fabricante del Riboex (GeneAll; ver apéndice).

Teniendo el ARN íntegro y sin ADN genómico se procedió a hacer la síntesis de ADNc utilizando la enzima AMV Reverse Transcriptase (Invitrogen) y oligo-dT₁₆ (Collaborative Research) siguiendo las instrucciones del fabricante (ver apéndice).

El PCR cuantitativo se realizó utilizando KAPA SYBR FAST mix (KAPA Biosystems) utilizando oligonucleótidos específicos para cada gene (Tabla 2), con las cantidades recomendadas por el fabricante (ver apéndice).

Los oligonucleótidos fueron probados previamente por PCR punto final para su especificidad y rango de T_M (ver apéndice), la cual quedó, para todos los oligonucleótidos en 60°C.

Se utilizó un termociclador Rotor-Gene 3000 (Corbett Research). La curva de calibración se realizó utilizando el gen constitutivo *Rplp0*, midiéndolo en 3 diluciones (1:1, 1:10 y 1:100) por muestra. La expresión fue evaluada utilizando el método del ΔC_t que consiste en obtener el C_t de un gen referencia (en este caso *Rplp0*) y del gen problema. El ΔC_t se obtiene restando el C_t del gen problema menos el C_t del de referencia y la expresión se saca de la ecuación $2^{-\Delta C_t}$.

Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados para qPCR.

Gene	Secuencia	Referencias
<i>Foxa2</i>	Forward: CTGGGAGCCGTGAAGATGGA Reverse: ATTCCAGCGCCACATAGGA	(Jaeger et al., 2011)
<i>Hes1</i>	Forward: TGAAGGATTCCAAAAATAAAATTCTCTGGG Reverse: CGCCTCTTCTCCATGATAGGCTTTGATGAC	(Kobayashi et al., 2009)
<i>Hes5</i>	Forward: AGATGCTCAGTCCCAAGGAG Reverse: TAGCCCTCGCTGTAGTCCTG	(Kobayashi et al., 2009)
<i>Lmx1a</i>	Forward: GGACCATAAGCGACCCAAAC Reverse: CTGAACCACACGGACACTC	(Jaeger et al., 2011)
<i>Msx1</i>	Forward: GCCTCTCGCCATTTCTCAG Reverse: CGGTTGGTCTTGCTTGCG	(Jaeger et al., 2011)
<i>Msx2</i>	Forward: CTCGGTCAAGTCGGAAAATTC Reverse: GTTGGTCTTGTTTTCTCAG	(Singh et al., 2013)
<i>Nestina</i>	Forward: TGAGAACTCTCGTTGCAGACAC Reverse: GGTCCTCTGGTATCCCAAGGAAATG	(Jaeger et al., 2011)
<i>Neurog2</i>	Forward: GCTGTGGGAATTTACCTGT Reverse: AAATTTCCACGCTTGCATTC	(Jaeger et al., 2011)
<i>Nr4a2</i>	Forward: TCAGAGCCCACGTCGATT Reverse: TAGTCAGGGTTTGCCTGGAA	(Chao et al., 2007)
<i>Rplp0</i>	Forward: CACTGGTCTAGGACCCGAGAA Reverse: AGGGGGAGATGTTTCAGCATGT	(Wong et al., 2009)
<i>Sox2</i>	Forward: CATGAGAGCAAGTACTGGCAAG Reverse: CCAACGATATCAACCTGCATGG	(Kobayashi et al., 2009)
<i>Th</i>	Forward: TGGGACACGTACCCATGTTG Reverse: ACCAGTACACCGTGGAGAGT	Primer blast
<i>Th</i> (genómico)	Forward: TACGCCACGCTGAAGGGCCTCTAT Reverse: AGGTGAGGAGGCATGACGGATGTA	Primer blast
<i>β-III Tubulina</i>	Forward: ATCAGCAAGGTGCGTGAGGAG Reverse: ATGGACAGGGTGGCGTTGTAG	(Jaeger et al., 2011)

Cuantificación

Para cuantificar las células en los mesencéfalos embrionarios solo se tomaron los cortes de las regiones anteriores y medias. Un promedio de las células positivas en 2 cortes de cada embrión fue considerado para cada marcador y al menos 3 embriones fueron contados. En algunas determinaciones de Sox2, el número de células positivas fue indirectamente cuantificado tomando la zona dentro del nicho dopaminérgico desde el ventrículo hasta el límite inferior del área BrdU⁺ (2 horas

después de la inyección). Las cuantificaciones están representadas por el promedio \pm la desviación estándar.

Los datos de los implantes son de al menos 3 experimentos independientes con mínimo 10 explantes evaluados en cada uno, excepto para los tratamientos con Shh/SAG y los implantes de CPNs de E11.5, en cuyos casos fueron solo 2 experimentos. Para los trasplantes en adultos, 2 experimentos independientes fueron realizados. El número de células positivas para determinado marcador, se obtuvo contando cada plano óptico independientemente en cada grupo de imágenes confocales.

En los cultivos en monocapa de CPNs se llevaron a cabo 3 experimentos independientes. Cada marcador fue contado en 4 campos por pozo por duplicado y el análisis estadístico se realizó por la prueba de Anova de dos vías.

RESULTADOS

La expansión de los precursores DAm anticipa la diferenciación

Para comprender mejor cómo es la dinámica de diferenciación DAm, cuantificamos el número de células de cada población que existe en el nicho DA ($Lmx1a^+$) durante el desarrollo: precursores neurales ($Sox2$), progenitores ($Neurog2$) y neuronas inmaduras (Th) entre E9.5 y E12.5. Debido a que no encontramos anticuerpos confiables de $Msx1/2$ para poder estimar el tamaño de la población precursora DA en el mesencéfalo en desarrollo decidimos usar $Sox2$, ya que esta población en el nicho DA es $Sox2^+$ en etapas tempranas (E9.5). Encontramos que el número de células $Sox2^+$ incrementa linealmente durante este período (Fig. 9A), de acuerdo con una división simétrica de E9.5 a E10.5 y divisiones asimétricas y/o simétricas de diferenciación a partir de ahí; aunque es probable que el número de células $Sox2^+/Msx1/2^+$ comience a disminuir después de E11.5, por lo observado con el mensajero de $Msx1/2$ (ver abajo).

En paralelo con el incremento en las células $Sox2^+$, las células $Neurog2^+$ comienzan a aparecer en E11.5 pero, ya que esta población es transitoria, el número permanece constante al menos hasta E12.5 (Fig. 9A), momento en el que se generan muchas neuronas dopaminérgicas, cuantificadas por la presencia de Th , cuyo número crece exponencialmente entre E12 y E12.5 (Fig. 9A), manteniendo este comportamiento al menos hasta E15.5 cuando casi todas las neuronas DAm se han formado (Altman and Bayer, 1981; Hanaway et al., 1971)

Una estimación más directa del cambio en el número de precursores podría obtenerse contando el número de células que están en división en las diferentes etapas del desarrollo; con este propósito se inyectó BrdU (que se intercala en el

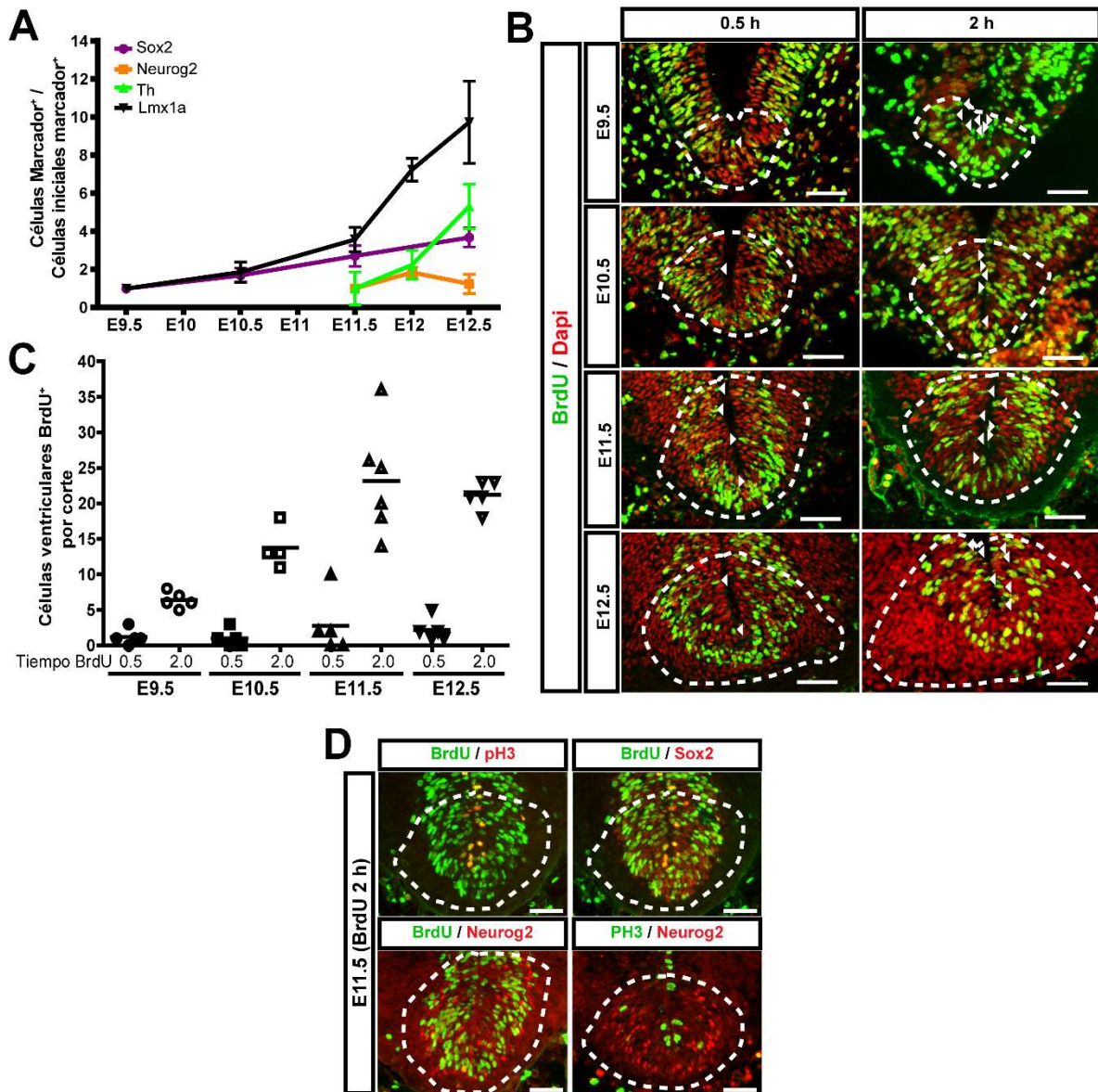


Figura 9. Flujo de diferenciación DA. (A) Marcadores de las diferentes poblaciones de células DAM a través del desarrollo. Se cuantificaron las células Lmx1a⁺ (nicho DA), Sox2⁺ (CPNs), Neurog2⁺ (progenitores) y Th⁺ (neuronas). El número de células positivas para cada marcador se normalizó con el promedio resultante de la primera etapa donde se detecta el marcador. Los valores se muestran como promedio \pm DE, n=4. (B) La proliferación en el nicho DAM (área punteada) fue determinada por la incorporación de BrdU. Las células ventriculares BrdU⁺ (cabezas de flecha) se cuantificaron (C). (D) Las células ventriculares BrdU⁺ colocalizan con Sox2 and pH3 y son Neurog2⁻.

ADN en la fase de síntesis) en distintas etapas y se cuantificaron las células BrdU⁺ 30 minutos y 2 h después de la inyección. Como la división celular en el SNC embrionario se caracteriza por un movimiento intercinético del núcleo, se observó

que la mayoría de los núcleos marcados después de 30 min se encuentran debajo de la superficie ventricular mientras que 90 min después (2 h después de la inyección) el número de núcleos en el ventrículo aumenta (Fig. 9B, C). Para excluir a las células BrdU⁺ que pudieran haber salido del ciclo celular, estimamos el número de CPNs en división contando solo las células BrdU⁺ que se encontraban cerca del ventrículo después de 2 h de la inyección. Todas las células ventriculares BrdU⁺ fueron Sox2⁺ pero solo la mitad fue positiva para pH3 (Histona H3 fosforilada), una marcador de mitosis, y no se encontraron células BrdU⁺/pH3⁺ alejadas de la pared ventricular ni células Neurog2⁺/pH3⁺ en el área ventricular (Fig. 9D). Estos datos nos indican que las células ventriculares BrdU⁺ son un buen indicativo del número de células en división. Así, en correlación con el crecimiento observado de la población Sox2⁺, el número de células en división va en aumento hasta E11.5 y parece no cambiar para E12.5 (Fig. 9C). A pesar de que muchas células Lmx1a⁺/Sox2⁺ se siguen detectando en E12.5 (y tal vez posterior a eso) creemos que estas no retienen el potencial de diferenciación dopaminérgico (ver debajo). Después quisimos evaluar el destino de las CPNs, para lo cual inyectamos BrdU en varias etapas y esperamos distintos tiempos para la evaluación. Ya que en etapas tempranas hay una alta tasa de proliferación no se pudo detectar BrdU en E12.5 cuando este se incorpora en E9.5 pero si se observa si se hace en días posteriores (Fig. 10A). Consistente con la idea de que las CPNs en división no son Neurog2⁺, solo entre el 5-8% del total de células BrdU⁺ fueron también Neurog2⁺ 2 h después de la inyección de BrdU tanto en E11.5 como en E12.5 y no se observó ninguna célula Th⁺/BrdU⁺ (Fig. 10C) Una proporción similar de células Neurog2⁺/BrdU⁺ se encontró cuando la inyección de BrdU se realizó en E10.5 y se analizó 48 h después,

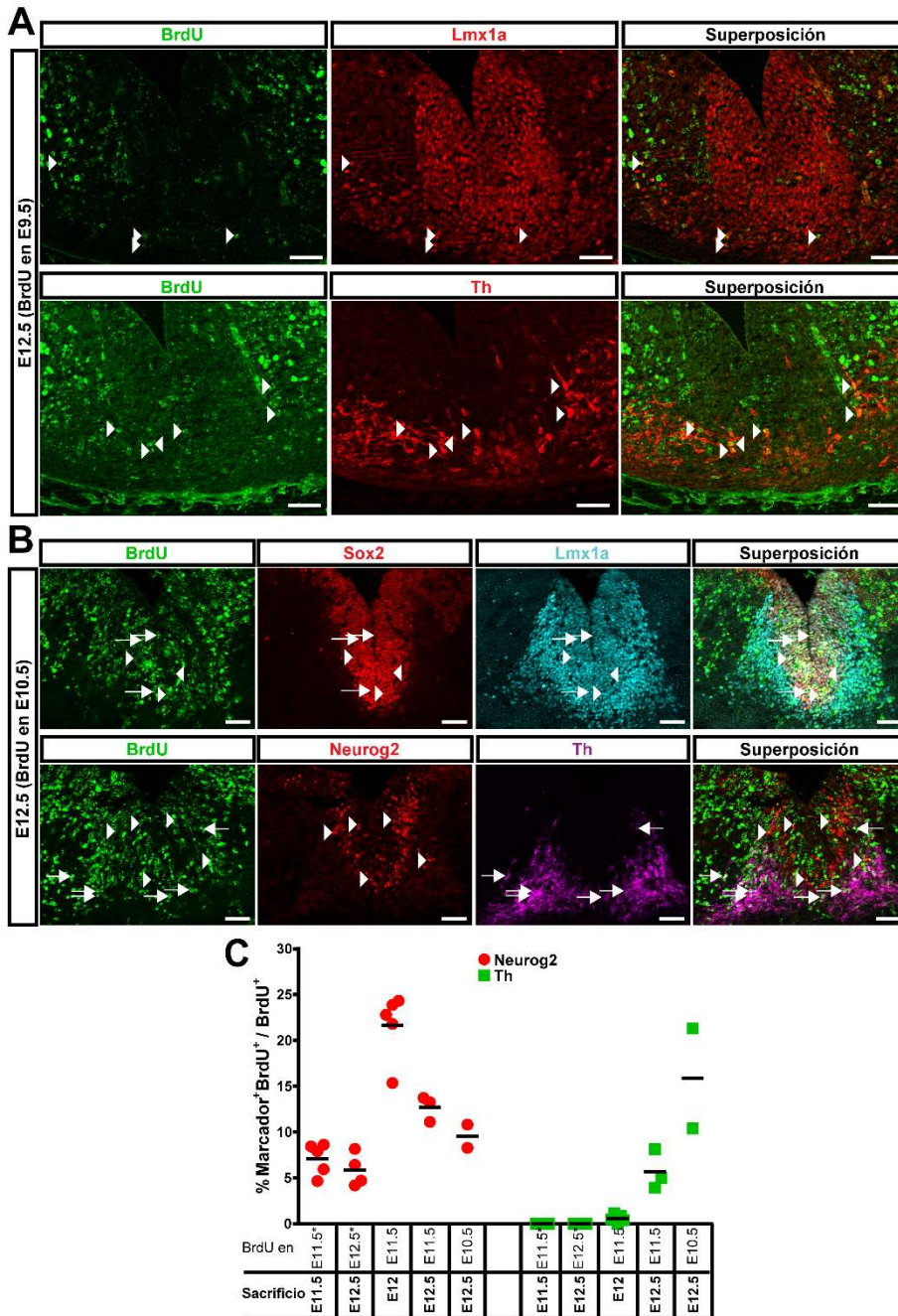


Figura 10. La incorporación de BrdU muestra que la mayoría de las divisiones en etapas tempranas son de proliferación. (A) Inyección de BrdU en E9.5 y sacrificio en E12.5. Se observan pocas células BrdU⁺ en el nicho DAm (Lmx1a⁺, panel superior), la mayoría de ellas fueron Th⁺ y tienen una fuerte señal de BrdU (cabezas de flecha, panel inferior). (B) Se inyectó BrdU en E10.5 y se sacrificaron los embriones en E12.5. La mayoría de las células BrdU⁺ colocalizan con Sox2 (panel superior). Algunas de ellas muestran una marca difusa de BrdU (cabezas de flecha) y otras fuerte (flecha). Neurog2 colocaliza con algunas células BrdU⁺ (cabezas de flecha, panel inferior). Pocas células BrdU⁺ fueron positivas también para Th (flechas, panel inferior), todas presentan una marca intensa de BrdU. Barra de escala 50 μ m. (C) La incorporación de BrdU se permitió por diferentes tiempos en distintas etapas. Las células BrdU⁺/Neurog2⁺ y BrdU⁺/Th⁺ fueron cuantificadas en cada tratamiento y normalizadas con el número total de células BrdU⁺. El asterisco señala la incorporación de BrdU a las 2 h. Barra de escala, 50 μ m.

pero, en este caso, muchas células diferenciaron a neuronas DA ($Th^+/BrdU^+$); en estas neuronas se detecta una señal más intensa de BrdU lo cual sugiere que se derivaron después de solo una división (Fig. 10B-C). En contraste, la proporción de células $Neurog2^+/BrdU^+$ alcanza alrededor del 25% del total de $BrdU^+$ cuando la inyección se hace en E11.5 y se analiza 12 horas después, donde muy pocas células Th^+ se detectan con marca de BrdU (Fig. 10C). Cuando el análisis se efectúa 12 horas después (inyección en E11.5, evaluación en E12.5), la población $Neurog2^+/BrdU^+$ decae al 12% y las neuronas Th^+ incrementan 5 veces (Fig. 10C). Con estos datos concluimos que las células $Neurog2^+$ emergen aproximadamente cada 12 horas de las divisiones asimétricas que se dan a partir de E11, no se dividen y son transitorias. Es de notar que el incremento en las células $Lmx1a^+$ después de E11.5 y el gran aumento en la población $Th^+/BrdU^+$ en tan solo 12 horas no correlaciona con una simple proliferación en las dos dimensiones de un corte, lo cual sugiere que podría haber un movimiento tangencial durante la fase de diferenciación. En este sentido, en un experimento preliminar observamos movimiento antero – posterior de las células ventriculares de explantes de mesencéfalo de E10.5 (datos no mostrados), que fueron marcadas con un colorante fluorescente (CMPTX, 25 μ M, Invitrogen) que entra a la célula por difusión y dentro de esta es modificado a una forma impermeable. Futuros experimentos tendrán que realizarse para determinar si existe movimiento tangencial de los CPNs durante el desarrollo de las neuronas DAm.

Debido a que, al parecer, las células que están diferenciando se esparcen en varias direcciones a partir de su lugar de nacimiento, el conteo en un solo corte podría no tener relación con el número real de las poblaciones, por lo que, para estimar mejor

las transiciones, medimos los niveles de ARNm tomando todo el mesencéfalo ventral de embriones de E9.5 a E15.5. La medición se hizo de varias regiones ventrales del mesencéfalo juntas, porque la cantidad de ARN que obteníamos de un solo mesencéfalo era insuficiente para analizar todos los genes, y por la variabilidad entre los embriones que se genera por a los cambios rápidos en la expresión de algunos genes en ventanas cortas de tiempo. Los mayores niveles de expresión de *Msx1/2* se detectaron en E11.5, que representa un incremento de 30 veces en comparación con E9.5; la expresión decrece rápidamente a partir de E12.5 (Fig. 11A). El comportamiento entre la expresión de *Msx1* y *Msx2* es similar a lo largo del tiempo, pero observamos mayor expresión de *Msx2*, lo cual podría deberse a la eficiencia de los oligonucleótidos usados. El ARNm de *Neurog2* comienza a detectarse a partir de E10.5, alcanzado su máximo en E11.5, y desaparece al E15.5 (Fig.11A). En contraste, el de *Nr4a2* incrementa gradualmente entre el E10.5 y E12.5, después del cual, aparentemente se mantiene estable (Fig. 11B). Ya que *Msx1/2*, *Neurog2* y *Nr4a2* se expresan en poblaciones distintas de células en el linaje dopaminérgico, los niveles de ARNm determinados correlacionan con el flujo de diferenciación, comenzando con un número definido de CPNs *Msx1/2*⁺ que se convierten en neuronas DAM pasando secuencialmente por células *Neurog2*⁺ y *Nr4a2*⁺. Es de notar que el incremento en los niveles del ARNm de *Th* está retrasado en comparación con los de *Nr4a2* (Fig. 11B), lo que representan 2 poblaciones de neuroblastos, recientemente identificadas en ensayos de ARN-seq (La Manno et al., 2016). A diferencia del aumento que vemos a lo largo del tiempo en las células *Lmx1a*⁺, los niveles del ARNm de *Lmx1a* disminuyen considerablemente después de la especificación (E11.5) y para E15.5, después de la diferenciación, se elevan

(Fig. 11C), lo que podría indicar una función de *Lmx1a* en la maduración neuronal. Adicionalmente, aunque observamos un número creciente de CPNs *Sox2*⁺ y que los niveles del mensajero de *Sox2* no decrecen tan rápido como los de *Msx1/2* (Fig. 11C), es probable que el número de células *Sox2*⁺/*Msx1*⁺ comience a disminuir después de E11.5, ya que el mensajero de *Msx1/2* decrecen considerablemente a partir de este día, y que las células *Sox2*⁺/*Msx1/2*⁻ constituyan CPNs con destino glial (ver abajo). Lo anterior sugiere que la expansión de las CPNs DAM está asociada a los niveles de expresión de *Msx1/2*.

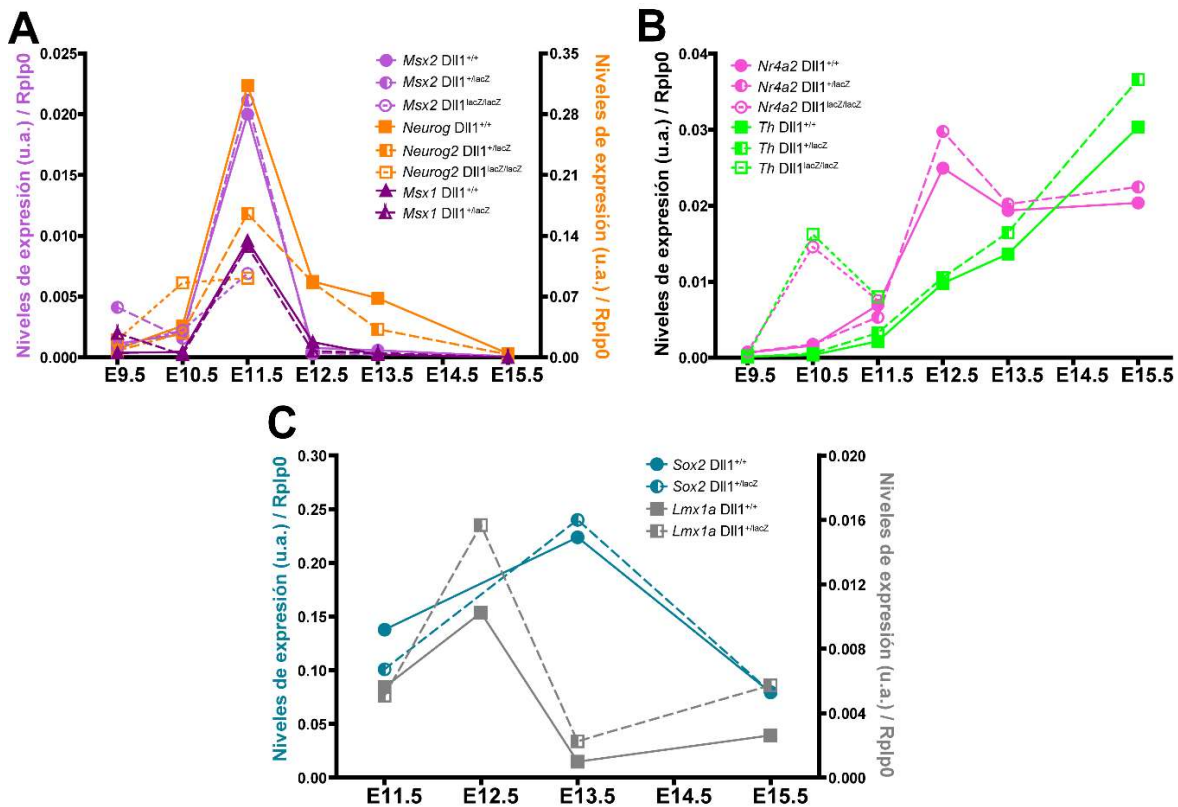


Figura 11. Expresión de diversos genes durante la diferenciación DAM. Progresión de la diferenciación DAM detectando la expresión de genes de distintas poblaciones en la diferenciación DAM: (A) *Msx1/2* (CPNs), *Neurog2* (progenitores); (B) *Nr4a2* y *Th* (neuronas inmaduras); (C) *Sox2* (CPNs en general) y *Lmx1a* (células en el nicho DAM) en ratones silvestre y mutantes para *DII1*.

El flujo de diferenciación DAM se modifica al adelantar la neurogénesis

Se sabe que el momento en el que una CPN se diferencia podría afectar su destino, por ejemplo, tipos distintos de neuronas corticales se generan en diferentes momentos en el desarrollo, lo cual sugiere que su especificación está asociada al tiempo en que una CPN nace (Okano and Temple, 2009; Shen et al., 2006). En concordancia, decidimos evaluar el flujo de diferenciación cuando la neurogénesis está alterada por una desregulación en la vía de señalización de Notch. Utilizamos el ratón mutante en *Dll1* (Hrabe de Angelis et al., 1997), el principal ligando de Notch en el mesencéfalo ventral (Ono et al., 2007). Los ratones mutantes presentan una neurogénesis adelantada en el mesencéfalo, y otras regiones del SNC, pero los patrones de regionalización y la especificación DAM no se ven afectados (Trujillo-Paredes et al., 2016).

Medimos los niveles de expresión de los genes previamente analizados y detectamos un marcado incremento en los mensajeros de *Neurog2*, *Nr4a2* y *Th* en E10.5 (Fig. 11A-B), lo que sugiere que estas poblaciones están emergiendo prematuramente. Notablemente, en E11.5 los niveles de *Msx1/2* y *Neurog2* fueron menores que en los embriones control, y los de *Nr4a2* y *Th* fueron solo ligeramente mayores (Fig. 11A-B). Estos resultados indican que la reducción en la señalización de Notch promueve la diferenciación DAM en asociación con un decremento en las CPNs especificadas al linaje DAM y en paralelo con la reducción de marcadores de CPNs generales (Nestina) y un aumento en las neuronas (β -III Tubulina) en etapas tempranas visto por inmunofluorescencias (Trujillo-Paredes et al., 2016). Es de notar que en etapas tardías *Sox2* no disminuye en los embriones heterocigotos,

probablemente porque la acción de Notch sobre la proliferación/diferenciación de precursores astrogénicos no es tan fuerte como con los precursores neurogénicos.

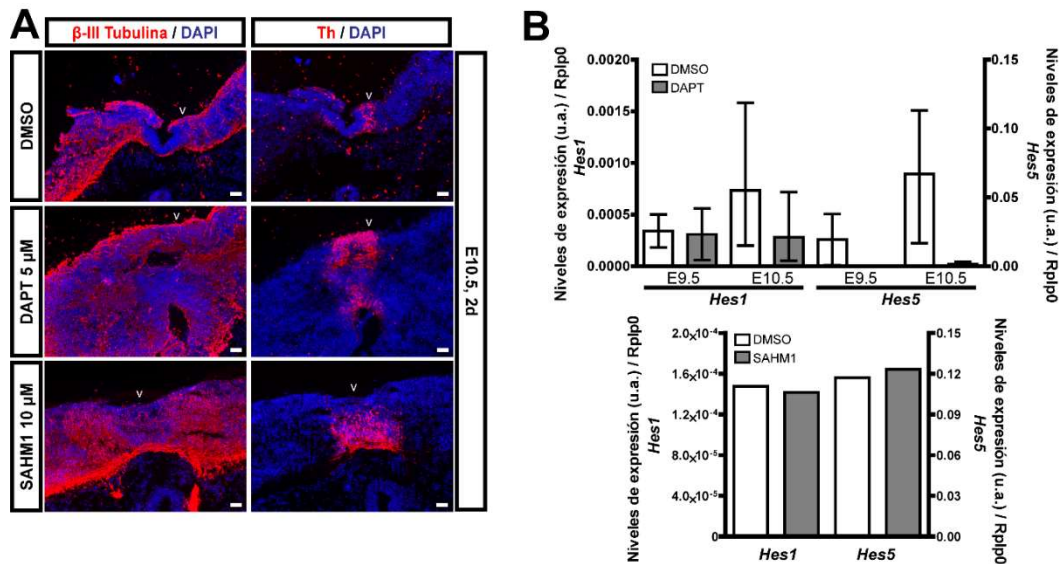


Figura 12. Los inhibidores de la vía Notch adelantan la neurogénesis en explantes. (A) Explantes de mesencéfalos de E10.5 fueron cultivados con DAPT o SAHM1 por 2 d. Neuronas β -III Tubulina⁺ y Th⁺ aparecen prematuramente. Barra de escala, 50 μ m. (B) Niveles de expresión de los principales efectores de la vía de Notch en el SNC, *Hes1* y *Hes5* al tratar los explantes de E9.5 y E10.5 con DAPT (panel superior) o con SAHM1 en explantes de E10.5 (panel inferior) por 2 d.

Ya que los embriones mutantes en *Dll1* mueren alrededor de E11.5, inhibimos la vía de Notch en explantes de mesencéfalo de E9.5 y E10.5 usando DAPT, un inhibidor de la γ -secretasa, (Crawford and Roelink, 2007) o SAHM1, inhibidor del DICN (Moellering et al., 2009). Observamos que, a pesar de que con ambos inhibidores se observa un aumento de células β -III Tubulina⁺ y Th⁺ en explantes de mesencéfalo E10.5 después de 2 días en cultivo (Fig. 12A), solo con DAPT se inhiben los ARNm de *Hes1* y *Hes5* (Fig. 12B), principales efectores de la vía de Notch en el SNC (Ohtsuka et al., 1999). La reducción de los niveles de expresión de *Hes5* fue mayor que la de *Hes1*, lo que es consecuente con la importancia de *Hes5*, y no *Hes1*, en el desarrollo del mesencéfalo, principalmente en el nicho DAm (Trujillo-Paredes et

al., 2016). Por las observaciones anteriores, decidimos inhibir la vía de Notch con DAPT en explantes de E9.5 y E10.5 y medir los niveles de expresión de los genes dopaminérgicos.

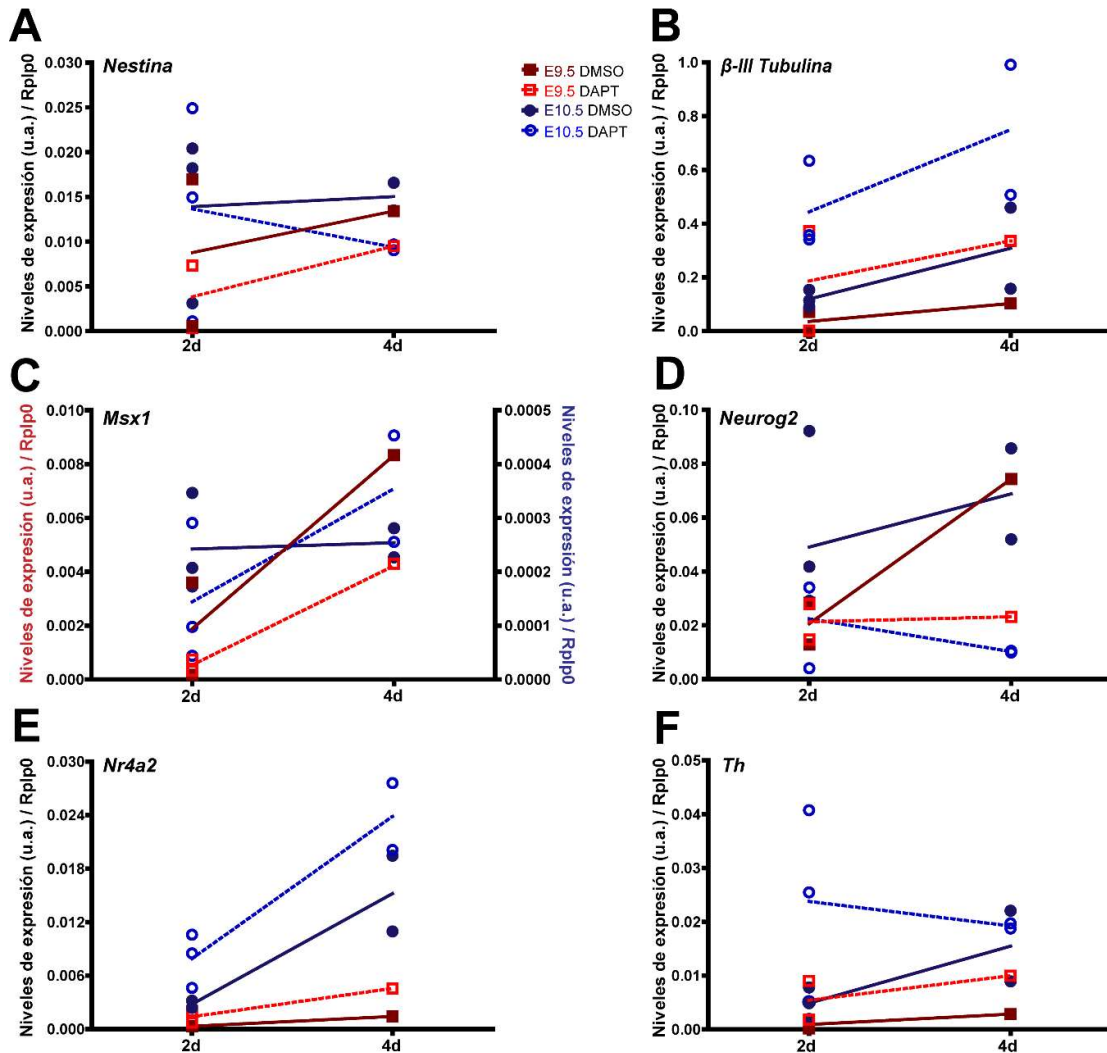


Figura 13. La inhibición de la señalización de Notch adelanta la neurogénesis y la diferenciación dopaminérgica. Explantes de mesencéfalos de E9.5 y E10.5 fueron cultivados por 2 y 4 días con el inhibidor de Notch, DAPT (A) Niveles de expresión del marcador de CPNs, *Nestina*; (B) Neuronas inmadura; β -III *Tubulina*; (C) Precursores DAm, *Msx1*; (D) Progenitores DAm, *Neurog2*; Neuronas inmaduras *Nr4a2* (E) y *Th* (F). Cada punto representa un experimento independiente.

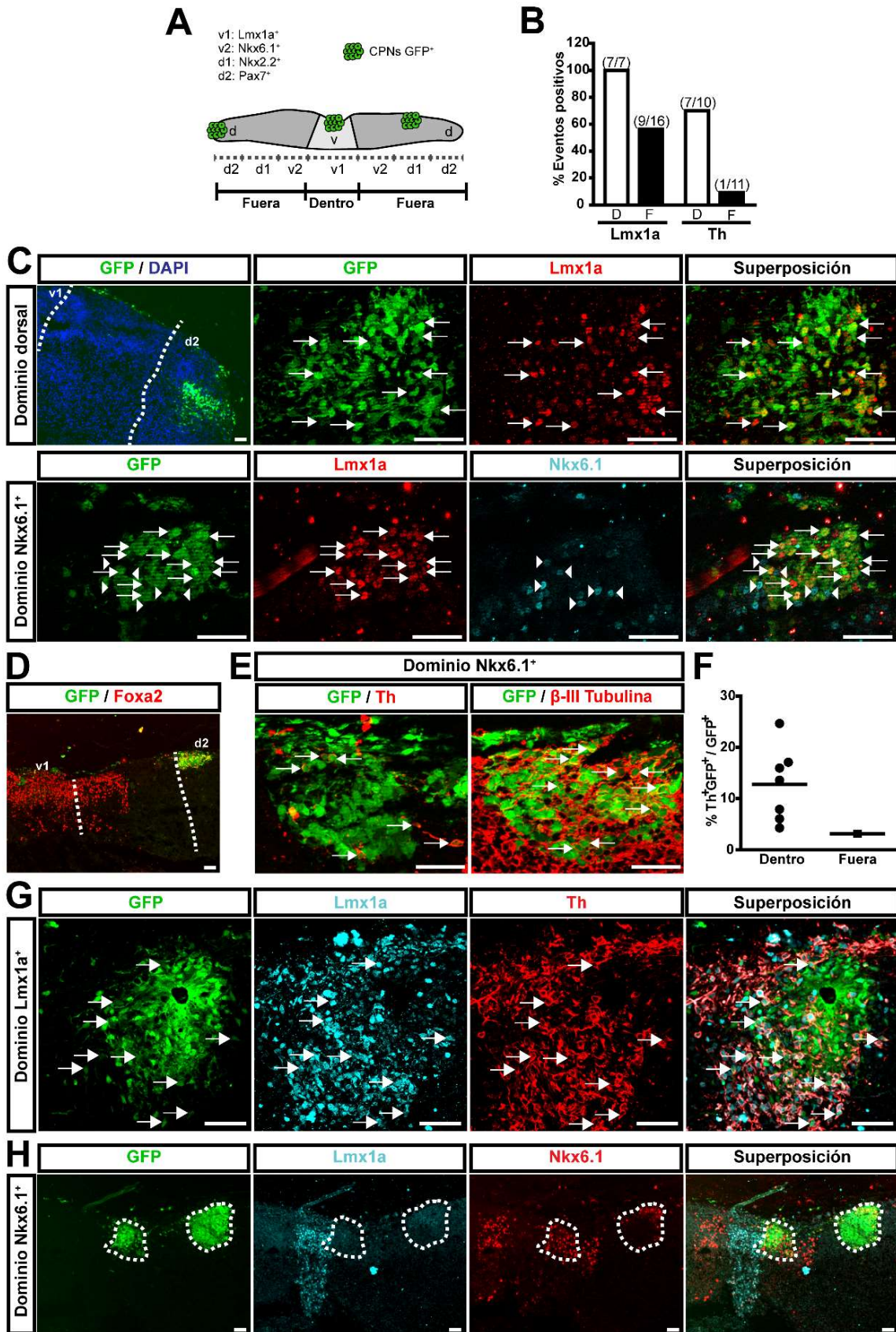
En los explantes control de ambas etapas las células están diferenciando activamente, lo cual se infiere con el aumento en los niveles de expresión de todos los genes evaluados *Nestina*, *Msx1*, *Neurog2*, β -III *Tubulina*, *Nr4a2* y *Th* (Fig. 13).

La dinámica de diferenciación en los explantes de E9.5 y E10.5 es similar, pero el incremento entre los días 2 y 4 de cultivo en los marcadores tempranos *Nestina* y *Msx1* fue menos pronunciado en E9.5, mientras que el de los marcadores tardíos fue mayor en los explantes de E10.5, consistente con lo observado en los embriones mutantes en Dll1. Al inhibir la vía de Notch hay una disminución en los niveles de *Nestina* y *Msx1* (Fig. 13A, C), aunque aún se observa que sus niveles aumentan conforme transcurre el cultivo. En contraste, la inhibición causa un consistente decremento en los niveles de *Neurog2* en los explantes de E10.5, mientras que este efecto solo se nota hasta los 4 días de cultivo en los de E9.5 (Fig. 13D). Los niveles de ARNm de *Nr4a2* y β -III *Tubulina* son casi muy bajos en los cultivos de explantes de E9.5 comparados con E10.5, consecuente con la aparición de estos marcadores en el desarrollo (a partir del día E10.5); y, tras el tratamiento con DAPT se observa un mayor incremento en los explantes de E9.5 comparando con su control (Fig. 13B, E), debido a que en esta etapa aún observamos expansión de algunas CPNs, las cuales seguirían sumando al grupo de neuronas que van diferenciándose después de la inhibición de Notch. Un comportamiento similar se observa con el mensajero de *Th*, sin embargo, sus niveles no aumentan después de 4 días de tratamiento en E10.5, debido tal vez a la extinción de precursores (Fig. 13F). Estos datos en conjunto indican que al inhibir la vía de señalización de Notch la neurogénesis se adelanta y, junto con ella, la dinámica diferenciación DAm, lo que sugiere que ambos procesos se encuentran acoplados dentro del nicho DAm.

Las CPNs DAm tempranas retienen Lmx1a pero no diferencian a neuronas DA fuera de su nicho

Ya que no observamos diferencias notables en la cantidad de precursores entre las diferentes etapas pero si en sus niveles de expresión de *Msx1/2*, decidimos evaluar el estado de compromiso de las CPNS al linaje DAm al trasplantarlas en explante de mesencéfalo E10.5. Cuando las células del mesencéfalo ventral de E9.5, que contiene solo CPNs especificadas (Andersson et al., 2006; Ferri et al., 2007), se implantan en regiones dorsales del explante (Fig. 14A), éstas fallan en re-especificarse y retienen sus marcadores de especificación originales (i.e. Lmx1a y *Foxa2*) en alrededor del 60% de los casos (18/27 eventos para Lmx1a, 8/10 para *Foxa2*) (Fig. 14B, 17G). En algunos de los casos en los que las células no mantienen Lmx1a, estas adquieren marcadores específicos del sitio donde se implantaron (dominios *Nkx6.1* o *Nkx2.2*, Fig. 14H). Inesperadamente, a pesar de la eficiente diferenciación a neuronas (visto por la presencia de β -III Tubulina; Fig. 14E), solo en un caso se detectaron unas pocas neuronas *Th*⁺ (Fig. 14B, E-D). Sin embargo, la misma población implantada en el nicho DA logra diferenciar apropiadamente, confirmando que no hay una pérdida de capacidad de diferenciación debido al proceso de trasplante (Fig. 14G). La población Lmx1a⁺ que no llega a ser *Th*⁺ podrían ser precursores retrasados en su diferenciación, como se observó previamente cuando se trasplantan otras fuentes de CPNs como las generadas *in vitro* a partir de CTE o provenientes del telencéfalo embrionario (Baizabal and Covarrubias, 2009; Baizabal et al., 2010).

Para intentar elucidar si la razón por la cual las CPNs de E9.5 no diferencian a neuronas DAm en las regiones dorsales se debe a una propiedad intrínseca de las



células y no del ambiente, trasplantamos Cuerpos Embrioides (CE), agregados tridimensionales que asemejan al embrión antes de la cavitación, provenientes de una línea de CTE que expresan *Lmx1a* bajo el promotor de *Nestina* (Nes-Lmx1a) similar a la reportada por Andersson et al. (2006), que *in vitro* presentan una mayor diferenciación DAm, ya que logran especificarse eficientemente al momento de su neuralización (Friling et al., 2009). Esta línea fue generada a partir de las CTE R1B5 (que expresan constitutivamente la EGFP), la cual se sabe que logra diferenciar eficientemente a neuronas DAm cuando son trasplantadas al nicho DA en explantes de mesencéfalo (Baizabal and Covarrubias, 2009).

Al trasplantar las células de CE provenientes de la línea Nes-Lmx1a a explantes de mesencéfalo E10.5 observamos que estas logran diferenciar a neuronas DAm dentro del nicho en casi el 100% de los casos, al igual que las células de la línea R1B5 (Fig. 15). Sin embargo, al trasplantarse a regiones dorsales solo las células de la línea Nes-Lmx1a logran mantener *Lmx1a* en el 70% de los casos y solo en la mitad de los casos estas células logran generar neuronas Th^+ pero con muy baja eficiencia (Fig. 15), de forma similar a lo observado con las CPNs de E9.5.

Figura 14. Las CPNs DAm mantienen sus marcadores de origen pero no generan neuronas DAm fuera de su nicho. Una suspensión celular de todo el mesencéfalo ventral de E9.5 fue implantada en explantes de mesencéfalo de E10.5. (A) Representación esquemática de los dominios existentes en el explante donde se integran las células. “Dentro” se refiere al nicho DAm y “Fuera” al resto de los dominios existentes. (B) Cuantificación de los eventos donde se encontraron células *Lmx1a*⁺ o *Th*⁺ dentro y fuera del nicho DAm. (C) Las CPNs implantadas en regiones dorsales mantienen la expresión de *Lmx1a* (flechas, panel superior e inferior) y no adquieren marcadores del sitio donde se integran (*Nkx6.1*, cabezas de flecha, panel superior). (D) Las células implantadas en regiones dorsales también mantienen *Foxa2*. (E) Único caso donde se encontraron neuronas *Th*⁺ fuera del nicho (flechas, panel izquierdo), aunque en todos los casos las células fueron β -III Tubulina⁺ (flechas, panel derecho). (F) Cuantificación de la eficiencia de diferenciación DAm (células *Th*⁺) dentro y fuera del nicho DAm. (G) CPNs implantadas en el nicho DAm diferencian a neuronas *Lmx1a*⁺/*Th*⁺ (flechas). (H) Caso donde las células implantadas fuera no mantienen *Lmx1a* y expresan los marcadores del sitio (células dentro de las líneas punteadas). Las líneas punteadas delimitan los dominios v1 y d2. Cada punto en la cuantificación representa un implante Barra de escala 50 μ m.

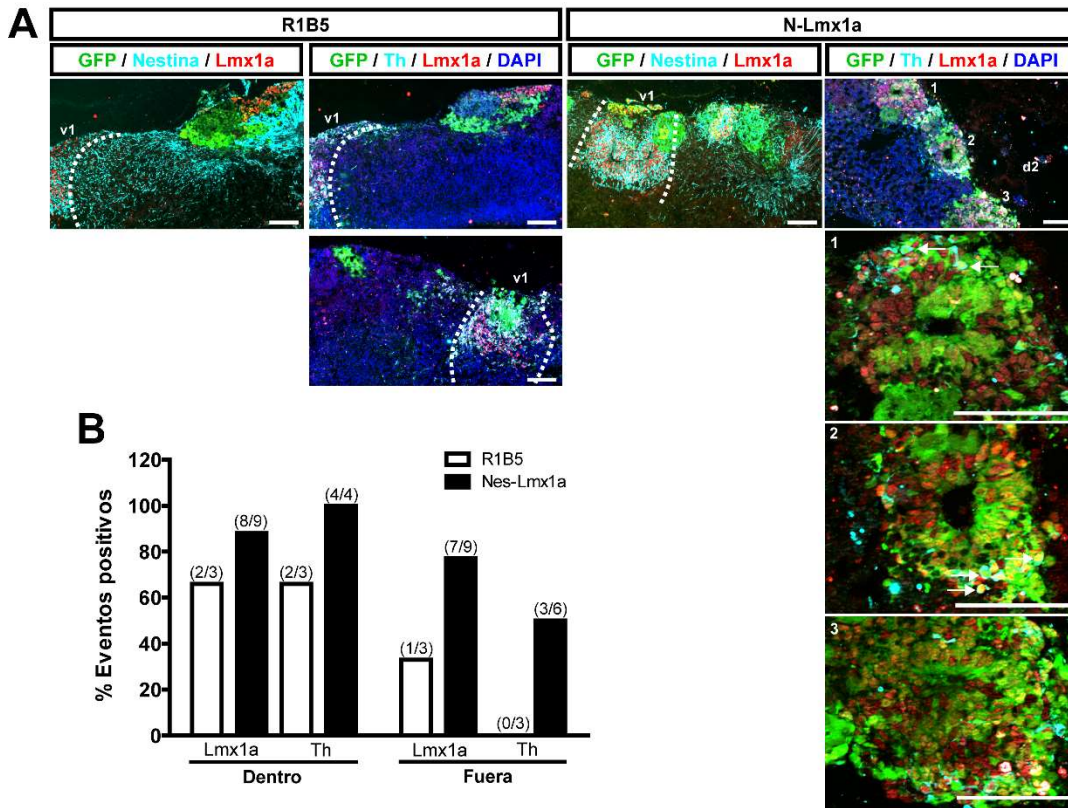


Figura 15. Las células de CE de la línea Nes-Lmx1a tampoco generan neuronas DAm fuera del nicho. Una suspensión celular de CE de la línea R1B5 (control) y de la Nes-Lmx1a fue implantada en explantes de mesencéfalo de E10.5. (A) Las células R1B5 implantadas solo adquieren la expresión de Lmx1a dentro del nicho DAm (panel izquierdo) pero las de la línea Nes-Lmx1a logran hacerlo fuera del nicho (panel derecho). En algunos casos las células Nes-Lmx1a generan pocas neuronas Th⁺. Los cuadros 1, 2 y 3 son magnificaciones del panel superior, las fechas representan células Lmx1a⁺/Th⁺. Las líneas punteadas delimitan los dominios v1 y d2. Barra de escala 50 μm. (B) Cuantificación de los eventos donde se encontraron células Lmx1a⁺ o Th⁺ dentro y fuera del nicho DAm.

Existía la posibilidad de que la poca diferenciación DAm de las CPNs de E9.5 se debiera al ambiente del explante de E10.5, por lo cual utilizamos explantes de E9.5 para trasplantar las células. Observamos un comportamiento similar que cuando son trasplantadas en E10.5, las CPNs ventrales se mantienen Lmx1a⁺ (en alrededor del 80% de los casos) y Foxa2⁺ (en casi el 50%) cuando se integran fuera de la línea media ventral pero no logran diferenciar a neuronas DAm (Fig. 16A-B). No obstante, cuando se reingresan al nicho las células generan neuronas Th⁺ en la mayoría de los casos (Fig. 16A, C). Con estos datos concluimos que el mesencéfalo

de E9.5 contiene CPNs con cierto nivel de compromiso DAM, el cual evita que las células se re-especifiquen pero no logra que se complete la diferenciación específica sin la contribución de señales extrínsecas presentes en el nicho DAM.

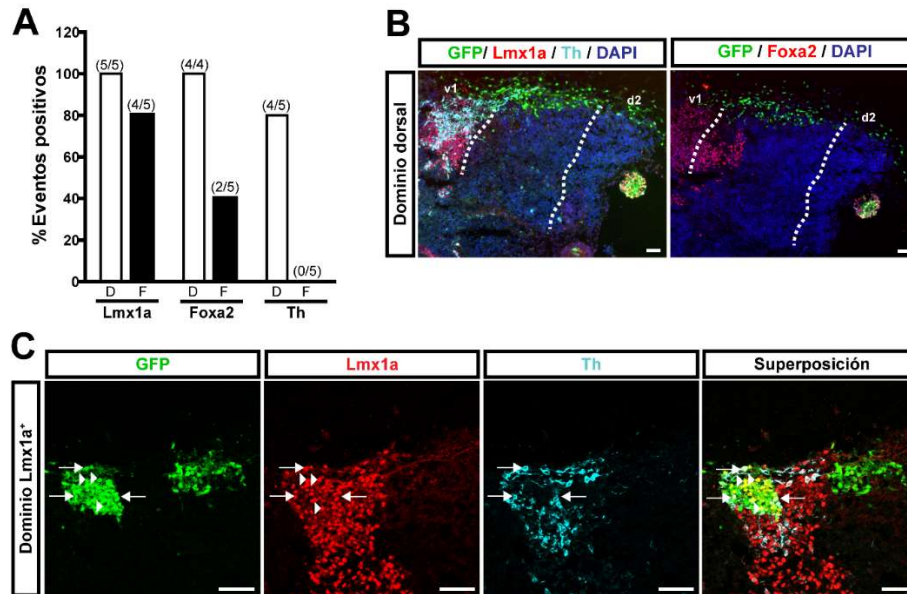
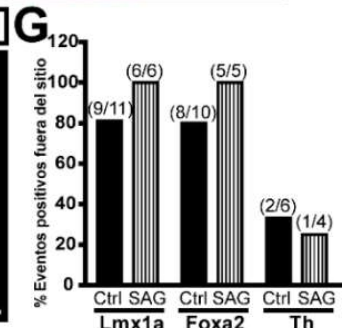
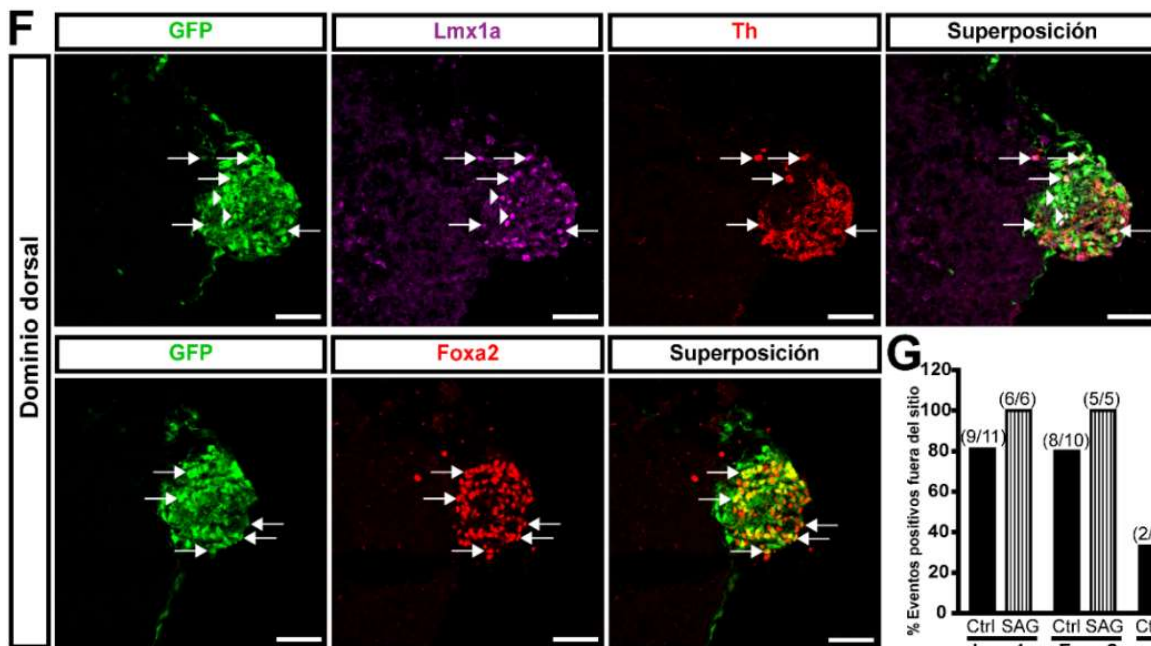
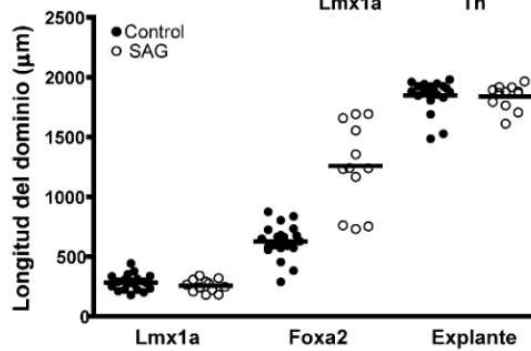
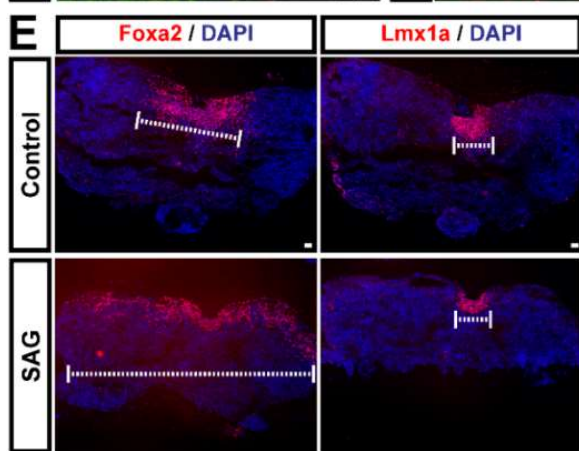
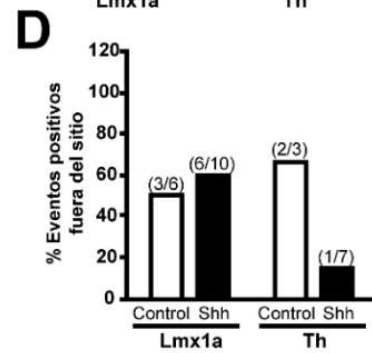
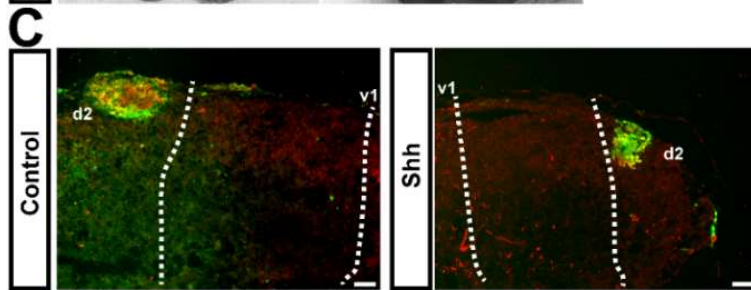
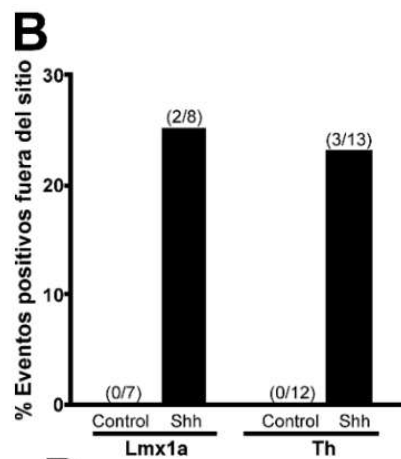
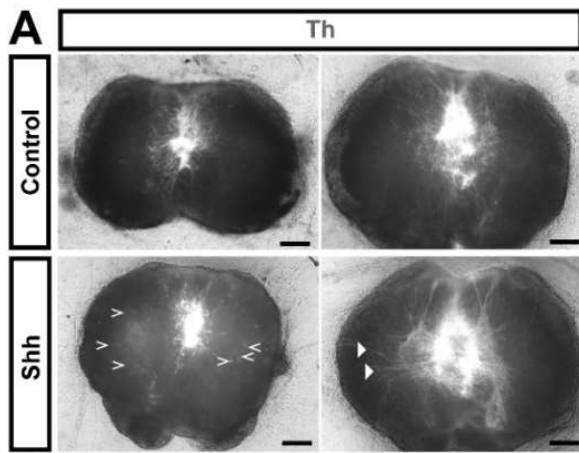


Figura 16. Las CPNs DAM de E9.5 tampoco generan neuronas DAM fuera de su nicho en explantes más temprano. Una suspensión celular de todo el mesencéfalo ventral de E9.5 fue implantada en explantes de mesencéfalo de E9.5. (A) Cuantificación de los eventos donde se encontraron células Lmx1a⁺, Foxa2⁺ o Th⁺ dentro y fuera del nicho DAM. (B) Las CPNs implantadas en regiones dorsales mantienen la expresión de Lmx1a y Foxa2. (C) Las CPNs de E9.5 implantadas en el nicho DAM diferencian a neuronas Lmx1a⁺/Th⁺ (flechas) o mantienen Lmx1a (cabezas de flecha). Las líneas punteadas delimitan los dominios v1 y d2. Barra de escala 50 μ m.

La señal de Shh no es suficiente para promover la diferenciación de las CPNs ventrales de E9.5 cuando se encuentran fuera de su nicho

Se ha visto que los explantes de mesencéfalo tomados antes de la diferenciación DA y que son cultivados en ausencia de la señalización de Shh generan un menor número de neuronas Th⁺ (Ye et al., 1998). Además, Shh puede inducir la generación ectópica de neuronas DAM en el telencéfalo y en el mesencéfalo sin placa del piso (Hynes et al., 1995; Ye et al., 1998). Por tales motivos, decidimos evaluar si Shh es la señal que le falta a las CPNs de E9.5 para poder completar la diferenciación DA. Trasplantamos CPNs de E9.5 en explantes de E10.5 y los cultivamos en presencia



o ausencia de Shh, utilizando la dosis que induce neuronas DA ya reportada por Hynes et al. (1995), o en presencia de SAG, un agonista de la vía de Shh (Chen et al., 2002; Frank-Kamenetsky et al., 2002).

Cuando agregamos Shh a los cultivos no observamos ninguna diferencia en la generación de neuronas DAm cuando se implantan fuera del nicho DA (Fig. 17C-D) lo que podría indicar que Shh no es suficiente para inducir la diferenciación DA en las CPNs de E9.5; sin embargo, debido a que la generación de neuronas ectópicas en explantes de mesencéfalo de E9.5 fue baja (alrededor del 25%, Fig.17A-B) no descartamos que la dosis de Shh fue insuficiente para observar un efecto en la diferenciación. Dado lo anterior, probamos con SAG, el cual indujo una expansión de casi el doble en longitud del dominio Foxa2 (que es regulado positivamente a través de esta vía (Sasaki et al., 1997) en los explantes de E10.5 (Fig. 17E), lo cual indica que el agonista funcionó al activar la vía en las células del explante, aunque el dominio Lmx1a+ permaneció igual, consecuente con otros reportes que muestran que Shh solo tiene influencia en etapas tempranas en el establecimiento y proliferación de las CPNs DAm (Ye et al., 1998). No obstante, al evaluar su efecto sobre las CPNs trasplantadas no observamos diferencia en la generación de neuronas DAm en las células trasplantadas comparadas con las que no fueron

Figura 17. Shh no es capaz de inducir la diferenciación de las CPNs de E9.5 a neuronas DA. (A) Explantes de E9.5 fueron tratados con Shh, después de 7 días se observaron algunas neuronas Th⁺ (cabezas de flecha abiertas) o proyecciones neuronales Th⁺ (cabezas de flecha cerradas) en regiones dorsales. (B) Cuantificación de los casos donde se observaron células Lmx1a⁺ o Th⁺ ectópicas. (C) Las CPNs se trasplantaron en explantes en presencia de Shh, las células mantienen Lmx1a en regiones dorsales. Las líneas punteadas delimitan las regiones v1 y d2. (D) Cuantificación de los eventos donde se observaron células Lmx1a⁺ o Th⁺ integradas en regiones dorsales del explante. (E) Explantes de E10.5 fueron tratados con SAG y cultivados por 7 días. SAG induce una expansión del dominio Foxa2⁺, las líneas punteadas indican la longitud medida representada en la gráfica. (F) SAG se adicionó al medio de los explantes con CPNs implantadas. Las células mantienen Lmx1a (panel superior, flechas y cabezas de flecha) y en un caso las células generan neuronas Th⁺ (panel superior, flechas). Las CPNs también mantienen Foxa2 (panel inferior, flechas). (G) Cuantificación de los casos con células integradas Lmx1a⁺, Foxa2⁺ and Th⁺ en regiones dorsales del explante con SAG. Barra de escala 50 μ m.

tratadas, a pesar de que el número de células trasplantadas que mantienen Lmx1a y Foxa2 fuera del nicho se incrementó (Fig. 17F-G). Esto nos sugiere que Shh no es suficiente para que las CPNs Lmx1a⁺ logren completar su diferenciación DA en el ambiente dorsal del cerebro medio, pero que tiene un rol importante en el mantenimiento de las CPNs DAM.

Los precursores DAM comprometidos surgen después de E10.5

Cuando las CPNs ventrales tomadas de mesencéfalos de E10.5 son implantadas en regiones dorsales del explante de E10.5, estas no se re-especifican en su nueva localización, sin embargo, a diferencia de las CPNs de E9.5, las de E10.5 si logran diferenciar a neuronas Th⁺ en el 46% de los casos (6/13 eventos; Fig.18A, C). En algunos casos donde las células se integraron en los dominios Nkx6.1 o Nkx2.2 se encontraron células positivas para estos marcadores, las cuales podrían representar células comprometidas a esos linajes incluidas en el fragmento de la región ventral obtenido para hacer la suspensión celular para trasplantar (Fig. 18B) ya que no trasplantamos una población pura. A pesar de que la mayoría de las CPNs logran generar neuronas fuera de su nicho, notamos que no todas las células tienen capacidad de generar neuronas DAM ya que la eficiencia de diferenciación fue mayor dentro del nicho que fuera ($42.07 \pm 9.52\%$ neuronas Th⁺ vs $20.13 \pm 12.44\%$; Fig. 18D-E).

Paralelamente, decidimos implantar la población de CPNs del mesencéfalo dorsal para determinar si esta población también se compromete en las mismas etapas que la ventral. Observamos que al reintegrarse a su nicho alrededor del 50% de las células mantienen su marcador de origen, Pax7, pero al implantarse en otros sitios

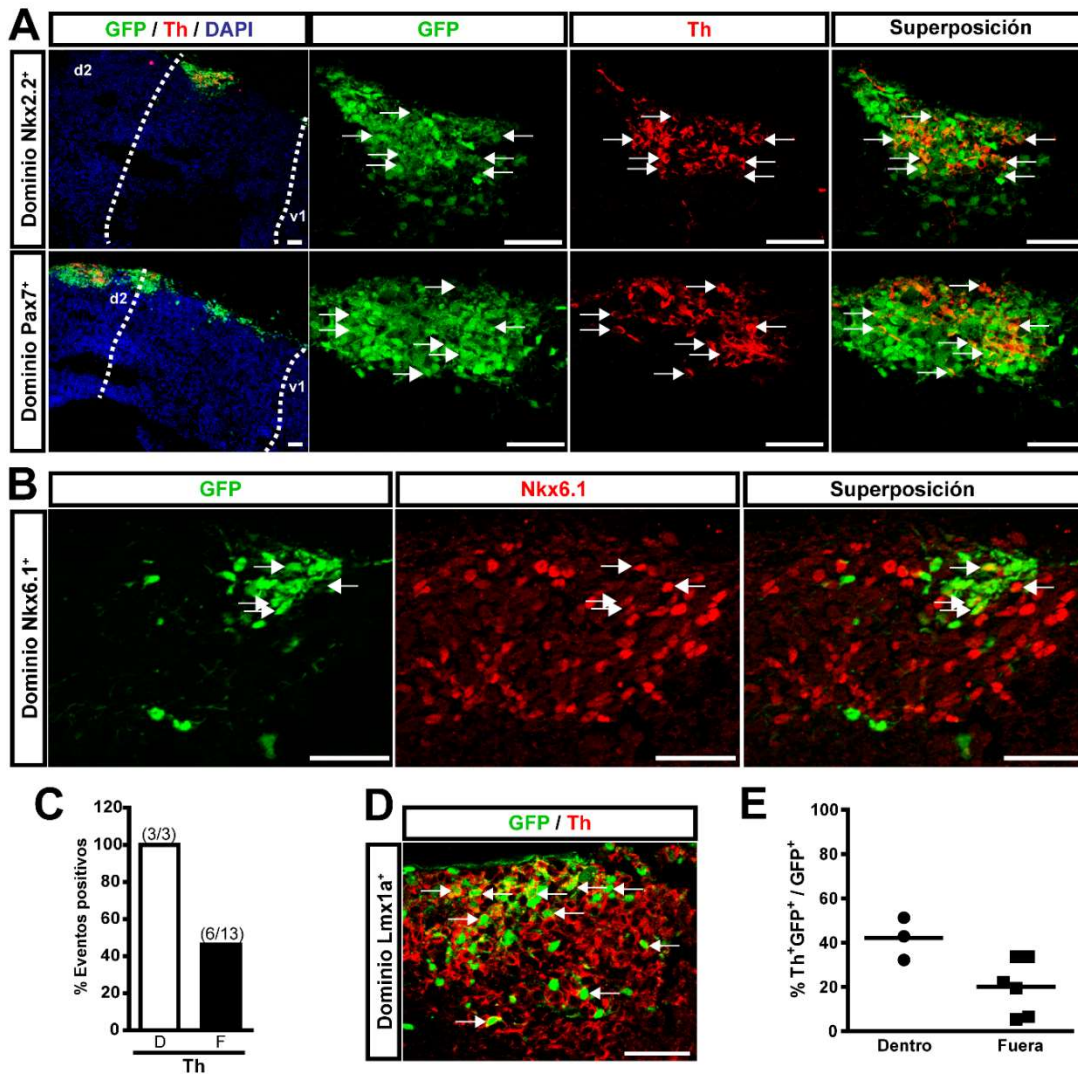


Figura 18. Una población de CPNs DAM comprometidas surge alrededor de E10.5. Una suspensión de toda la región ventral del mesencéfalo de E10.5 se implantó en explantes. (A) Las células implantadas diferencian a neuronas Th⁺ en el dominio Nkx2.2⁺ (flechas, panel superior) y el dominio Pax7⁺ (flechas, panel inferior). (B) Una pequeña parte de las CPNs diferencian a células de otros linajes ventrales cuando se implantan en esos dominios (dominio Nkx6.1⁺, flechas). (C) Cuantificación de los eventos con neuronas Th⁺ dentro y fuera del nicho DAM. (D) Las CPNs diferencian a neuronas Th⁺ en su nicho (flechas). (E) Cuantificación de la eficiencia de diferenciación. Las líneas punteadas delimitan los dominios v1 y d2. Cada punto en la cuantificación representa un implante. Barra de escala 50 μ m.

las células no mantienen la expresión de *Pax7* pero tampoco logran re-especificarse (Fig. 19A). En la mitad de los casos (5/9 casos) donde las células se integran en el dominio DAM éstas logran diferenciar a neuronas Th⁺ pero con muy baja eficiencia (3.6%; Fig. 19B). Esto indica que las CPNs dorsales ya han perdido plasticidad pero

no parecen estar totalmente comprometidas y aún requieren señales para mantener la expresión de Pax7, aunque existe la posibilidad de que su expresión sea transitoria. Es de notar que cuando las CPNs de E9.5 o E10.5 se integran en el dominio dorsal, la expresión de Pax7 disminuye o se pierde, lo cual no ocurre al utilizar la población dorsal, lo que sugiere que las células trasplantadas están influyendo en las células huéspedes.

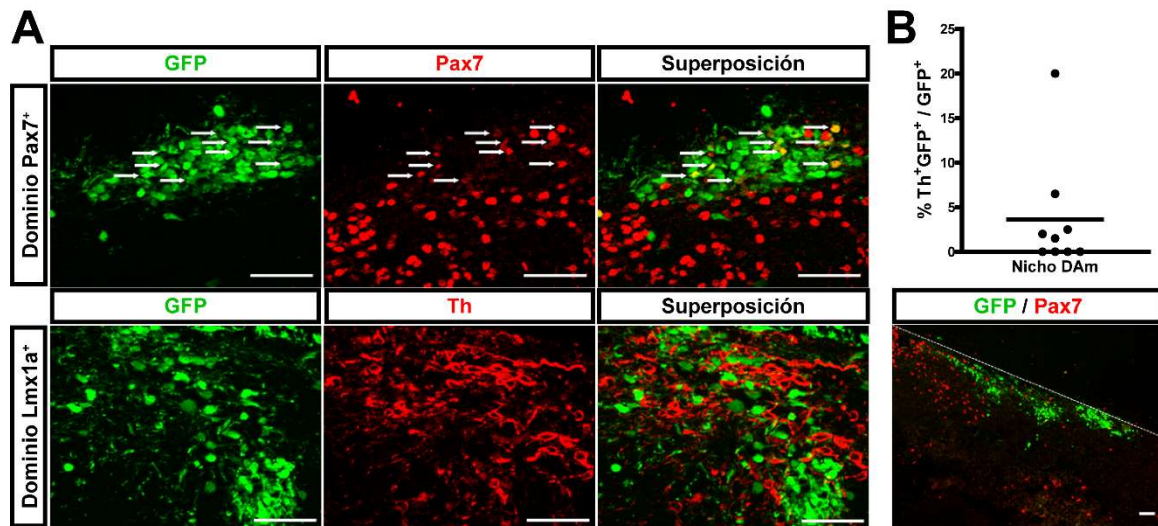


Figure 19. Las CPNs dorsales de E10.5 no se re-especifican en el dominio DAM. (A) CPNs dorsales de E10.5 implantadas en el dominio Pax7⁺ mantienen el marcador (panel superior, flechas). Cuando se integran en el dominio DAM no generan neuronas dopaminérgicas Th⁺ (panel inferior) y no mantienen la expresión de Pax7. La línea punteada delimita la superficie ventricular del explante. Barra de escala 50 μ m. (B) Cuantificación de la eficiencia de diferenciación a neuronas Th⁺ en el nicho DAM.

En E10.5 comienzan a emerger las primeras neuronas inmaduras (β -III Tubulina⁺) en la región más pial del mesencéfalo y, aunque son pocas comparadas con las CPNs que existen en el nicho DAM en esta etapa (Fig. 20A), podría ser que estas neuronas sean las que se comporten como comprometidas hacia el fenotipo DAM. Para evaluar la contribución de estas neuronas inmaduras al total de la población implantada, decidimos trasplantar las CPNs localizados en la región más ventricular del mesencéfalo de E10.5 (ver materiales y métodos). De manera interesante,

encontramos un mayor número de casos que generan células Th⁺ fuera de la región ventral (5/7 casos, 71%; Fig. 20B-C). Además, la diferenciación tiende a ser más eficiente que cuando se utiliza toda la región ventral (48.71 ± 22.61%, Fig. 20D). Todas las neuronas Th⁺ que se generan, cuando se trasplanta toda la región ventral y cuando se usa la región ventricular, son Lmx1a⁺ (99.14%), lo cual apoya que estas células representan realmente neuronas DA mesencefálicas y no de otro tipo. Estos datos sugieren que la población que diferencia a neuronas DAm son principalmente CPNs y esto se debe a una capacidad intrínseca de las células es esta etapa del desarrollo.

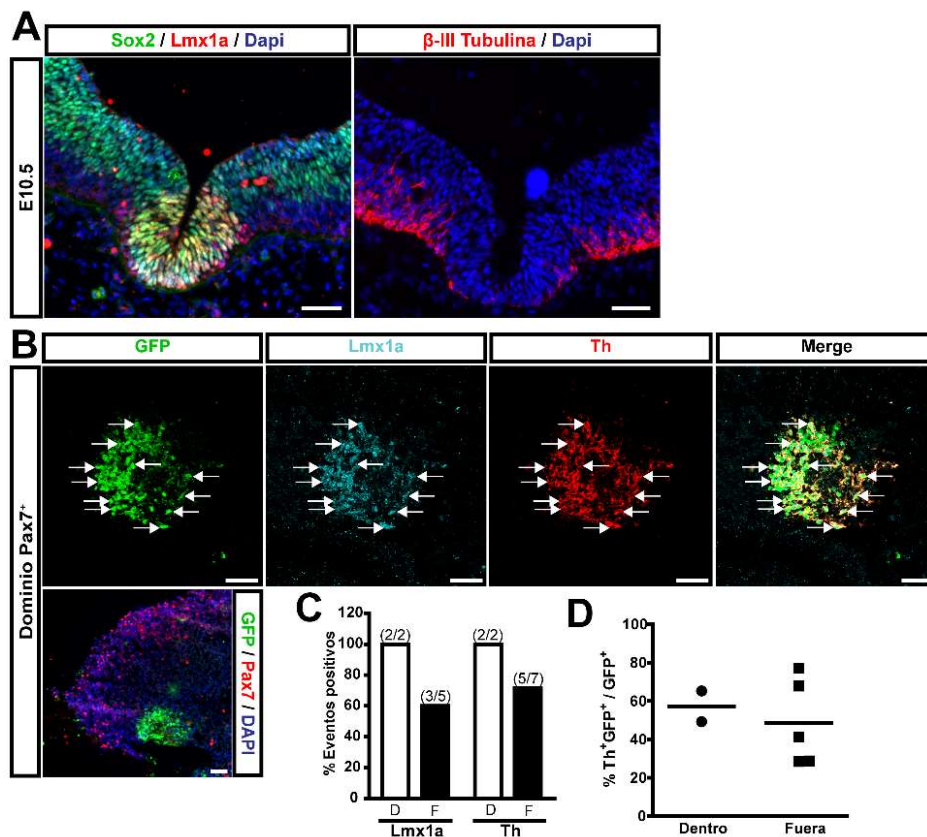


Figura 20. La población comprometida de E10.5 se compone principalmente de CPNs. (A) El nicho DAM en E10.5 se compone principalmente de CPNs Sox2⁺ (panel izquierdo) y algunas neuronas inmaduras β -III Tubulina⁺ (panel derecho). (B) La superficie ventricular de mesencéfalos de E10.5 fue implantada en explantes. Las CPNs mantienen Lmx1a y se diferencian a neuronas Th⁺ en regiones dorsales (flechas). (F) Cuantificación de los eventos con células Lmx1a⁺ o Th⁺. (G) Cuantificación de la eficiencia de diferenciación. Cada punto en la cuantificación representa un implante. Barra de escala 50 μ m.

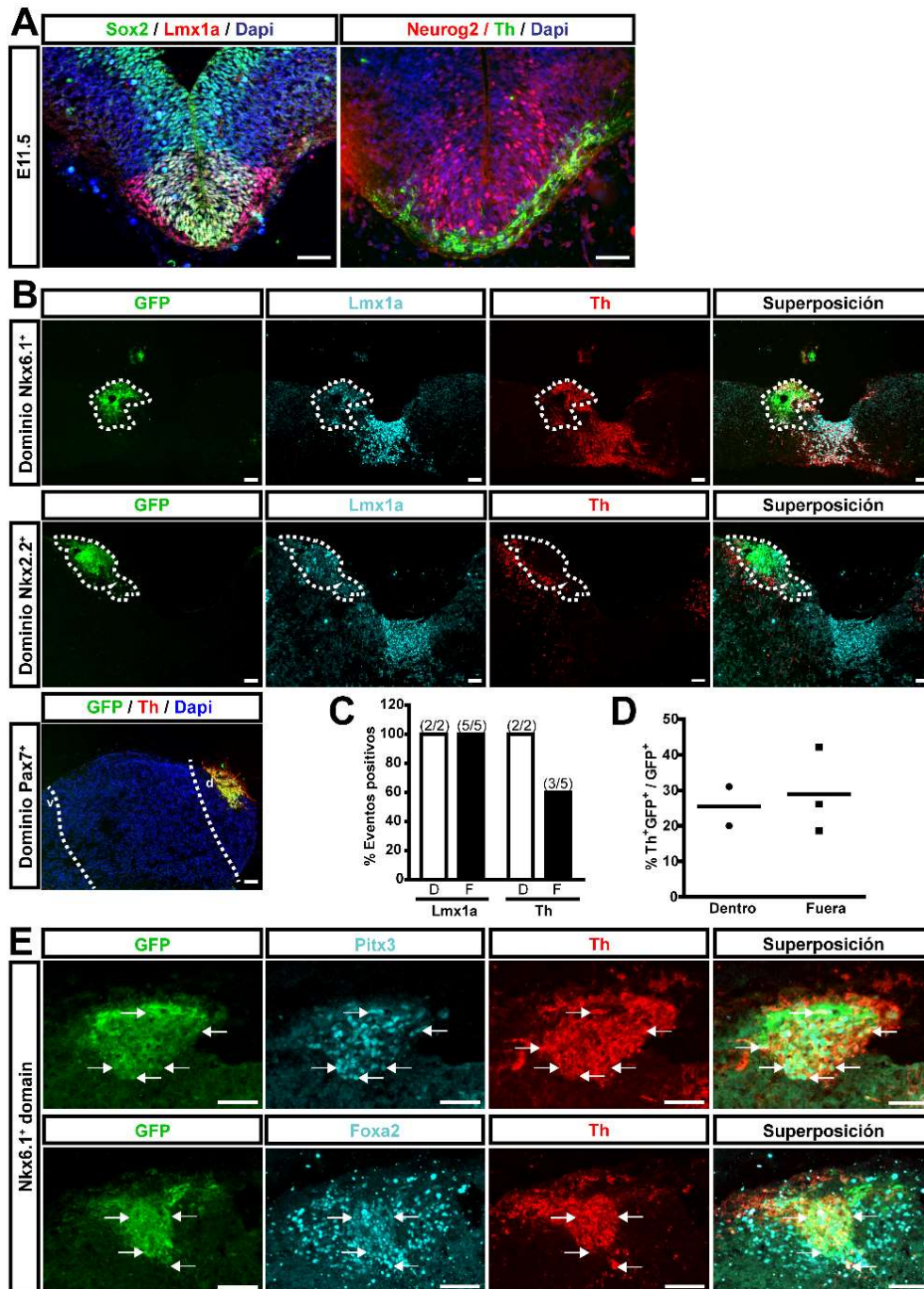


Figura 21. Los precursores DAM de E11.5 se comportan como comprometidos. (A) En el nicho DAM de E11.5 conviven CPNs Sox2⁺ (panel izquierdo), progenitores Neurog2⁺ y neuronas inmaduras Th⁺ (panel derecho). (B) La superficie ventricular de la región ventral de mesencéfalos de E11.5 fue implantada en explantes. Las CPNs mantienen la expresión de Lmx1a cuando se integran fuera del nicho DAM (dominio Nkx6.1⁺, panel superior; dominio Nkx2.2⁺, panel de en medio; dominio Pax7⁺, panel inferior) y diferencian a neuronas Th⁺. (C) Cuantificación de los eventos con células implantadas positivas para Lmx1a o Th. (D) Eficiencia de diferenciación dentro y fuera del nicho DAM, cada punto representa un implante. (E) Las neuronas Th⁺ que se generan fuera del nicho DAM son Pitx3⁺ (flechas, panel superior) y Foxa2⁺ (flechas panel inferior). Las líneas punteadas delimitan los dominios ventral y dorsal; v: ventral, d: dorsal. Barra de escala, 50 μ m.

La proporción de CPNs comprometidas al linaje DAm se mantiene en E11.5

A diferencia de lo que sucede en el nicho DAm en E10.5, en E11.5 los precursores proliferantes *Msx1/2*⁺, los progenitores postmitóticos *Neurog2*⁺ y las neuronas inmaduras *Nr4a2*⁺ y *Th*⁺ se encuentran presentes distribuidos en dominios definidos a lo largo del eje apico – basal (Fig. 21A). Por esta razón, para evaluar el potencial de diferenciación en esta etapa solo tomamos la región ventricular. Encontramos que las CPNs de E11.5 se comportan de manera similar a las de E10.5, generando neuronas *Th*⁺ cuando se implantan en regiones dorsales del explante en 60% de los casos (3/5 eventos; Fig. 21B-E) aunque la eficiencia tiende a ser menor ($28.95 \pm 11.99\%$ vs $48.71 \pm 22.61\%$) que la observada cuando se trasplanta la región ventricular de E10.5. Estas neuronas *Th*⁺ son positivas para varios marcadores de identidad mesencefálica como *Lmx1a* (96.49%, Fig. 21B-C), *Foxa2* y *Pitx3* (Fig. 21E). Tomando estos datos, concluimos que las células comprometidas a convertirse en neuronas DAm se encuentran concentradas en la región ventricular del mesencéfalo ventral en una proporción similar entre E10.5 y E11.5, y parece que muy pocas células *Neurog2*⁺ o *Th*⁺/*β*-III Tubulina⁺ contribuyen a esta población.

Las CPNs comprometidas al linaje DAm comienzan a disminuir a partir de E12.5

En E12.5, las CPNs se están diferenciando activamente, generando progenitores *Neurog2*⁺ alrededor de la línea media ventral y estos, a su vez, neuronas *Th*⁺ en la región pial. No obstante, los niveles de *Msx1/2* y la cantidad de células BrdU⁺ sugieren una disminución en el número y/o la división de las CPNs DAm. Para determinar la contribución de las CPNs o de células más diferenciadas a la población comprometida, trasplantamos una suspensión celular de todo el

mesencéfalo ventral de E12.5 así como la región ventricular enriquecida en CPNs a regiones dorsales del explante. Es de notar que, cuando se hizo la suspensión celular de todo el mesencéfalo ventral, hubo una frecuencia menor de implantes exitosos (alrededor del 50%) en comparación con los experimentos hechos con células de E10.5, lo que sugiere que las células capaces de integrarse al explante son menos que en etapas más tempranas. Inesperadamente, entre los implantes exitosos solo el 30% mostró células Th⁺ (3/9 eventos; Fig. 22A, C) en regiones dorsales del explante.

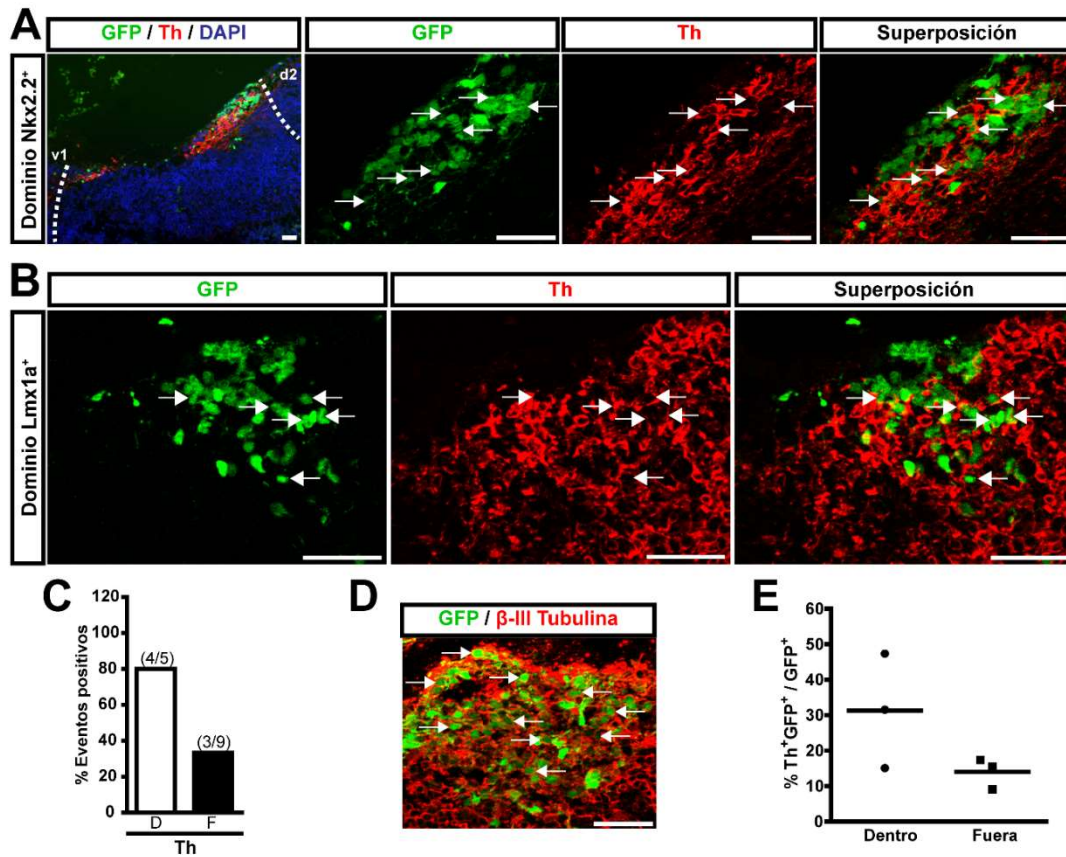


Figura 22. La población de células DAM comprometidos disminuye en E12.5. Una suspensión de toda la región ventral del mesencéfalo de E12.5 se implantó en explantes. (A) Las células implantadas diferencian a neuronas Th⁺ en el dominio Nkx2.2⁺ (flechas). Las líneas punteadas delimitan los dominios v1 y d2. (B) Cuando se reintegran a su nicho las células diferencian a neuronas DAM. (C) Cuantificación de los eventos con células Th⁺ dentro y fuera del nicho DAM. (D) La mayoría de las células implantadas son neuronas β -III Tubulina⁺ (flechas). (E) Cuantificación de la eficiencia de diferenciación a neuronas Th⁺. Cada punto en la cuantificación representa un implante. Barra de escala 50 μ m.

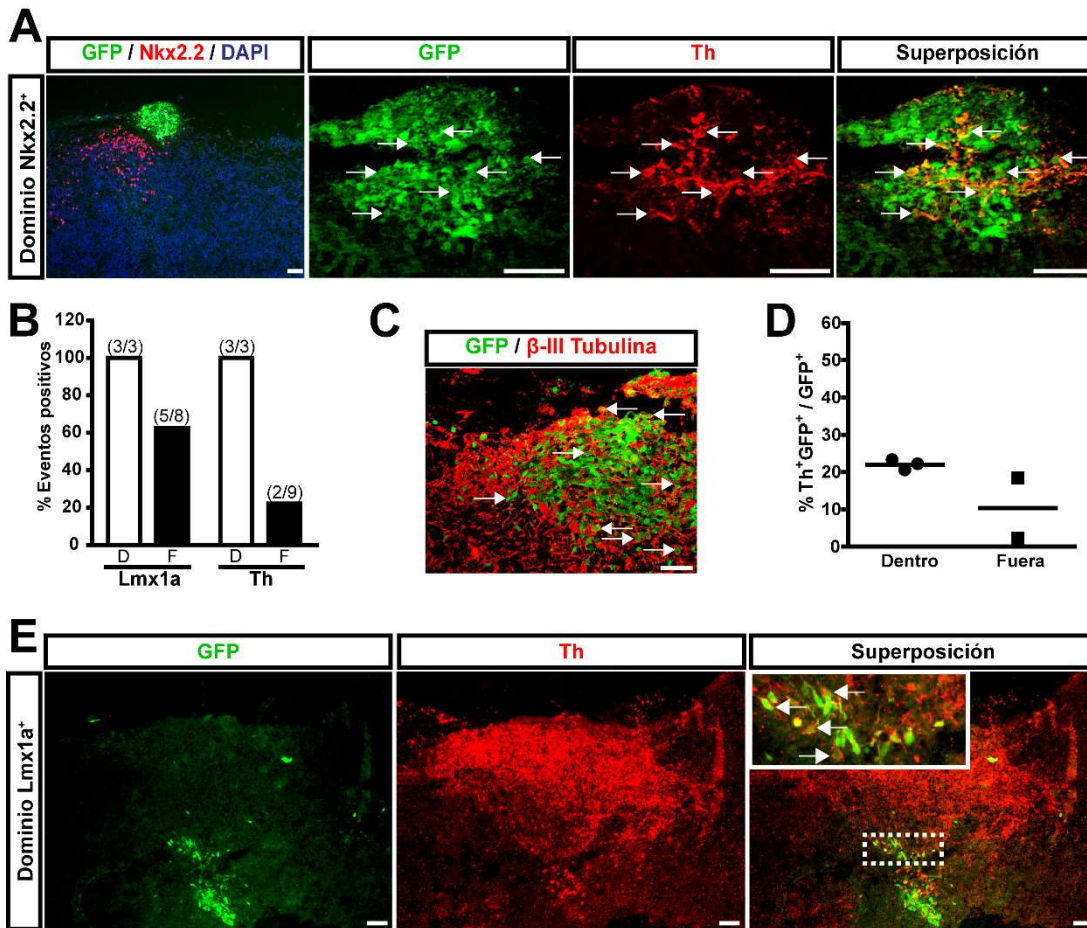


Figura 23. La población de CPNs comprometida en E12.5 es menor que en etapas previas del desarrollo. La superficie ventricular de mesencéfalos de E12.5 fue implantada en explantes. (A) Las CPNs diferencian a neuronas Th⁺ (flechas) cuando se integran en regiones dorsales del explante. (B) Cuantificación de los eventos con células Lmx1a⁺ o Th⁺. (C) Las CPNs diferencian a neuronas β-III Tubulina⁺ (flechas). (D) Cuantificación de la eficiencia de diferenciación. (E) Al reintegrarse al nicho DAm las CPNs generan neuronas Th⁺. Las líneas punteadas delimitan los dominios ventral y dorsal; v: ventral, d: dorsal. Cada punto en la cuantificación representa un implante. Barra de escala 50 μm.

Resultados similares obtuvimos cuando la superficie ventricular fue trasplantada y, aunque la mayoría de las células se diferencian a neuronas β-III Tubulina⁺ (Fig. 22D, 23C) y en el 60% de los eventos las células mantuvieron la presencia de Lmx1a, solo en 22% de los casos (2/9 eventos) se encontraron células Th⁺ (Fig. 23A-B). Observamos que la eficiencia en la diferenciación a neuronas Th⁺, en ambas poblaciones, fue similar a la registrada con las células de E10.5 y E11.5 implantadas tanto fuera como dentro del nicho DAm (Fig. 22E, 23D). Es importante notar que en

los implantes con células de E12.5 hubo 3 veces menos células implantadas en comparación con los de etapas anteriores, lo que concuerda con la disminución en el número de precursores DAm determinada por la expresión de genes DAm (Fig. 11). Estos resultados indican que en E12.5 aún existen CPNs comprometidas a diferenciar a neuronas DAm, sin embargo, la proporción es menor que la que existe en E10.5 o E11.5.

La superficie ventricular de los explantes favorece la integración de las CPNs

Los experimentos de explantes – implantes están basados en la capacidad de las células trasplantadas de interactuar con la superficie ventricular del explante para que pueda haber una integración exitosa. Estudios previos muestran que cuando las CPNs telencefálicas son inyectadas en los ventrículos del cerebro embrionario solo las células en proliferación logran integrarse al tejido, mientras que las células más diferenciadas (neuronas postmitóticas) forman agregados que permanecen anclados a la pared ventricular (Campbell et al., 1995; Cattaneo et al., 1994). Con base en estas observaciones, es de esperarse una mejor interacción entre precursores que entre precursores y células diferenciadas.

Para determinar si lo anterior ocurre entre las CPNs trasplantadas y el explante, mezclamos células del mesencéfalo ventral de E9.5 (compuesto solo de CPNs) provenientes de ratones EGFP con su equivalente de E12.5 de ratones silvestres (conformado por progenitores y neuronas inmaduras, además de CPNs). Después de 2 días en cultivo la interacción resultante de la combinación E9.5↔E12.5 solo generó agregados quiméricos de células Lmx1a⁺ (Fig. 24). Se observaron, a su vez, agregados entre distintas CPNs de E9.5 independientemente del dominio ventral

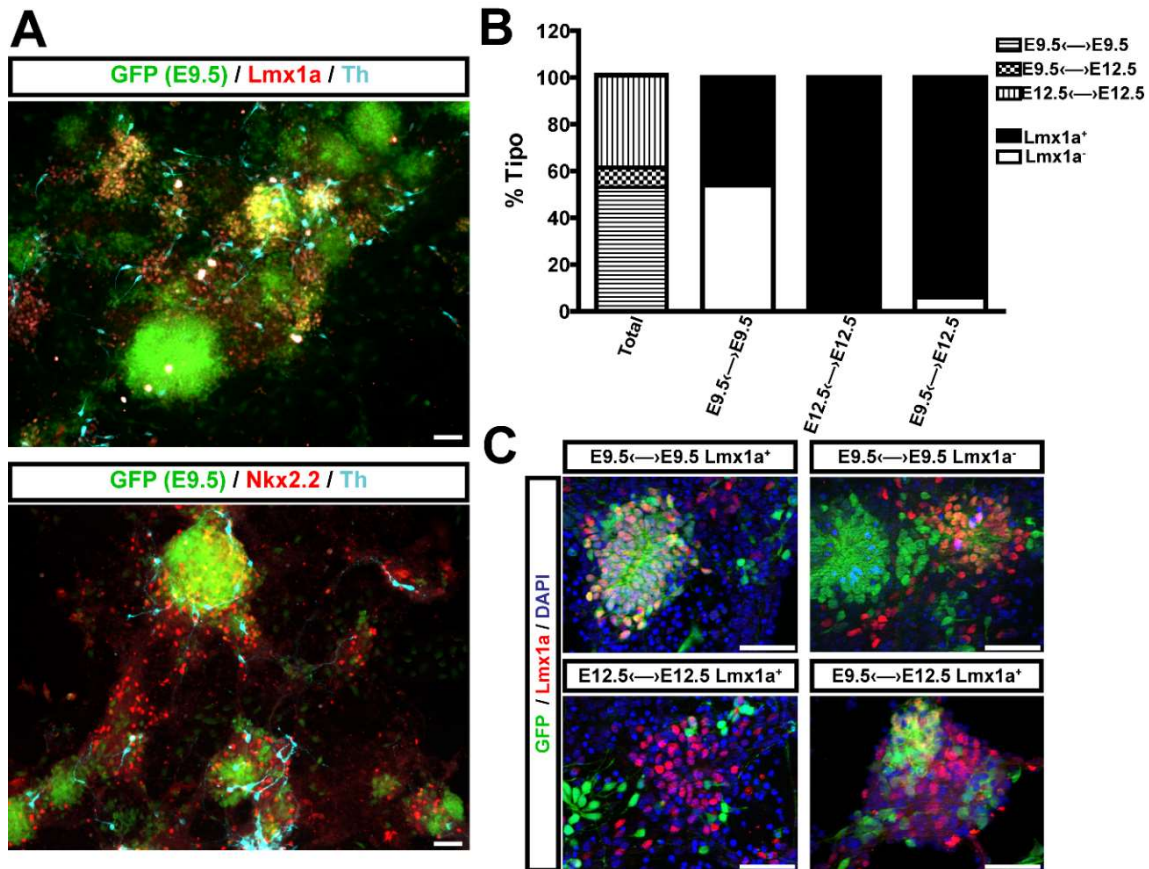


Figura 24. Las CPNs mesencefálicas se agregan de acuerdo a su etapa y dominio de origen. CPNs de E9.5 GFP⁺ y de E12.5 Wt de la región ventral del mesencéfalo fueron mezcladas. (A) Después de 2 días en cultivo varios agregados GFP⁺ se formaron. Se observan agregados Lmx1a⁺ pero no de células Th⁺ (panel superior). Agregados de otras regiones ventrales (Nkx2.2⁺) no se observaron (panel inferior). (B) Cuantificación de los tipos de agregados (E9.5<->E9.5 Lmx1a⁺, E9.5<->E9.5 Lmx1a⁻, E9.5<->E12.5 Lmx1a⁺, y E12.5<->E12.5 Lmx1a⁺). (C) Imágenes representativas de los tipos de agregados. Barra de escala 50 μ m.

del cual se originaron (E9.5<->E9.5). En contraste, la mayoría de los agregados formados por células de E12.5 (E12.5<->E12.5) fueron Lmx1a⁺ y no se observaron neuronas Th⁺ en los agregados derivados de E9.5<->E12.5 o E12.5<->E12.5 (Fig. 24A-B). Estos resultados apoyan las observaciones de los estudios arriba mencionados que indican que las células postmitóticas tienen poca interacción con CPNs, por lo que no lograrían integrarse eficientemente en la superficie ventricular del explante. Asimismo, en el mesencéfalo de E10.5 no hay, o muy pocas, células

Neurog2⁺ y ya que Neurog2 induce rápidamente la salida del ciclo celular (Lacomme et al., 2012), creemos que pocos progenitores Neurog2⁺ se integran en nuestro modelo de explantes por lo que las observaciones descritas arriba estarían restringidas principalmente al potencial de diferenciación de los precursores neurales.

Los progenitores DAm y las neuronas inmaduras pueden sobrevivir y diferenciar en el cerebro adulto

El ambiente de la región dorsal del explante podría tener, aún, cierta influencia positiva sobre la diferenciación DAm, lo cual enmascararía el verdadero estado de compromiso de las CPNs. Por lo tanto, evaluamos su potencial en el cerebro adulto, donde las señales neurogénicas y de especificación/diferenciación no se encuentran o están reducidas. Decidimos evaluar el potencial de diferenciación de todas las poblaciones que se encuentran en el mesencéfalo ventral en E10.5 y E12.5 y trasplantamos una suspensión celular de toda la región al cerebro de ratas adultas. Los trasplantes se hicieron en el estriado, por considerarse una región con pocas señales neurogénicas REF, y en la sustancia nigra (SN), que recientemente se mostró que posee un alto grado de permisividad para la diferenciación neuronal (Maya-Espinosa et al., 2015). La evaluación se hizo seis días después del trasplante para que la sobrevivencia de las células no fuera un factor que impidiera realizar la determinación. Observamos que, independientemente de la región donde se implantaron las células, un número significativo de células de ambas etapas mantuvieron la expresión de Lmx1a (Fig. 25A). Detectamos neuronas Th⁺ en todos los casos pero encontramos una proporción mayor en los trasplantes de E12.5 (Fig. 25A-B). El potencial de diferenciación que muestran las células de E10.5 en el

cerebro adulto correlaciona con lo observado en el embrión, aunque la proporción de neuronas Th⁺ que se generan es ligeramente menor en el cerebro adulto (Fig. 25B, 18E). Una mayor proporción de neuronas DAm se derivaron de las células de E12.5 comparadas con las de E10.5 (Fig. 25B) y con las que generó esta población de E12.5 cuando se trasplantaron en los explantes embrionarios (Fig. 22E), lo que sugiere que los progenitores o neuronas inmaduras, que no se integran al explante, pueden sobrevivir y/o continuar su diferenciación en el cerebro adulto.

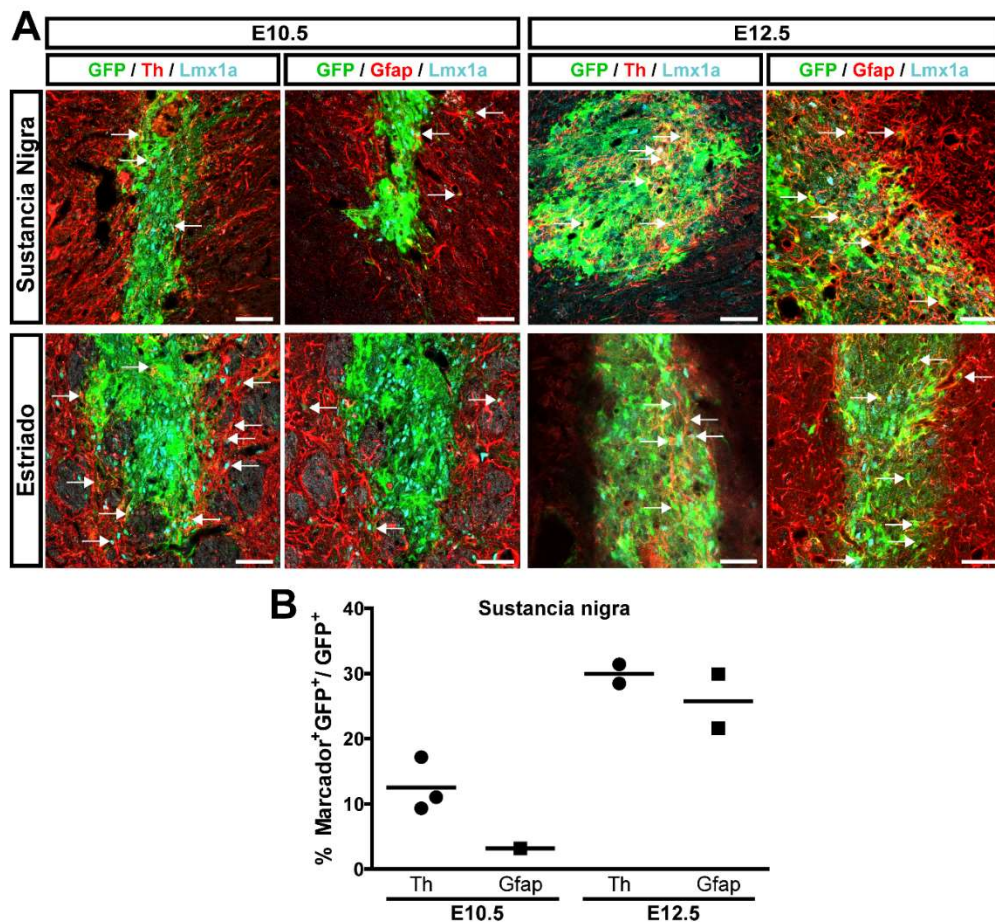


Figura 25. Las células del mesencéfalo ventral embrionario diferencian y sobreviven en la sustancia nigra de ratas adultas. (A) Una suspensión celular de toda la región ventral del mesencéfalo de E10.5 o E12.5 fue trasplantada en la SN o en el estriado de ratas adultas. Después de 6 días las células mantienen el marcador Lmx1a y varias diferencian a neuronas Th⁺ (flechas). Las CPNs de E12.5 pero no los de E10.5 pueden diferenciar a astrocitos Gfap⁺ (flechas, panel derecho) (B) Cuantificación de las neuronas Th⁺ y células Gfap⁺. Cada punta representa una sustancia nigra trasplantada. Barra de escala 50 μ m.

El potencial astrogénico es una propiedad intrínseca de las CPNs DAM después de la diferenciación

Los experimentos con explantes previamente descritos, muestran que las CPNs de cualquier etapa evaluada, independientemente de su potencial de diferenciación DA muestran un alto potencial neurogénico. Sin embargo, la capacidad para diferenciar a astrocitos no fue evaluada, ya que el ambiente de los explantes de E10.5 no es propicio para la diferenciación astrogénica (Baizabal and Covarrubias, 2009). Notablemente, los trasplantes hechos en el cerebro adulto muestran que algunas CPNs de E12.5 diferencian a astrocitos (determinado por la presencia de células positivas para el marcador de astrocitos, Gfap), mientras que los de E10.5 no lo hacen (Fig. 25).

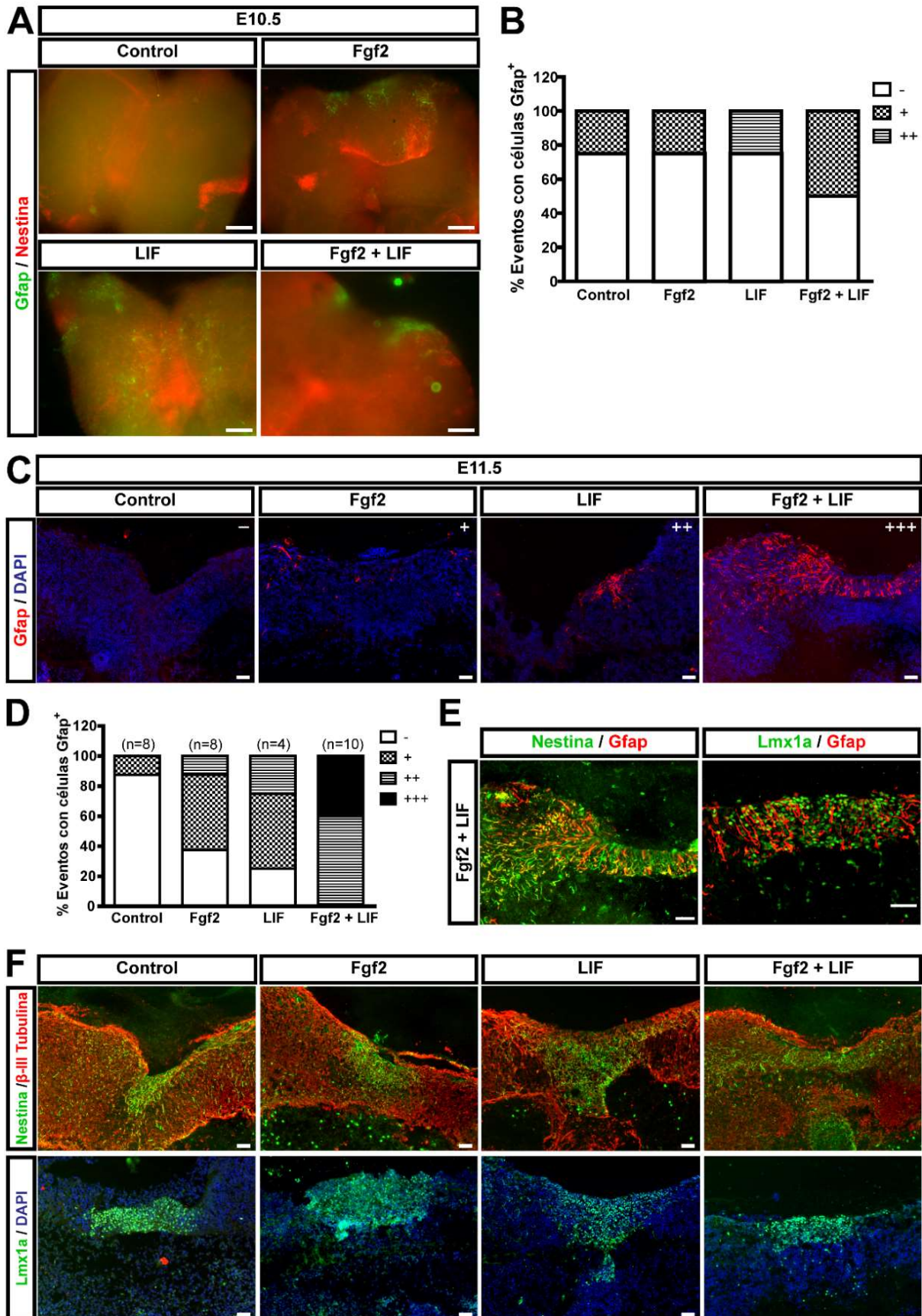
Debido a lo anterior, decidimos evaluar más detalladamente el potencial astrogénico de las CPNs. Primero, decidimos inducir astrogénesis en explantes de mesencéfalo, para lograrlo probamos distintas condiciones utilizando Fgf2 y LIF, dos factores de crecimiento que promueven diferenciación astrocítica (Morrow et al., 2001; Song and Ghosh, 2004), y DAPT, para diferenciar a las CPNs a neuronas y ver si permanecían CPNs con sesgo a generar astrocitos, o combinaciones de los tres en explantes de E10.5. En la tabla 2 se muestran las condiciones probadas y los resultados obtenidos después de evaluar por inmunofluorescencia la presencia de astrocitos. En la mayoría de las condiciones no se observó efecto inductivo de astrogénesis pero la combinación de Fgf2 los 7 días de cultivo y LIF adicionado al 2º día, generó parches de células Gfap en los explantes (Fig. 26A), por lo que solo utilizamos esta condición para los experimentos consecuentes.

Tabla 3. Condiciones para inducir astrogénesis en explantes de mesencéfalo de E10.5

CONDICIÓN	Muestra 1		Muestra 2	
	Nestina	Gfap	β -III Tubulina	Gfap
Medio Optimem	Borde	Poco en el centro	Si	No
LIF 7d	Si	Poco	Si	No
LIF, 2d→Nada	Poco borde	Fibras en el centro	Si	Poco
LIF, 4d→DAPT	Centro	Borde	Si	No
LIF, 4d→Fgf2	Si	Muchos parches fuerte señal y en el borde	Si	Parches
Fgf2 (10) 7d	Si	Borde	Si	No
Fgf2 (20) 7d	Si	Parches borde	Si	Pocas fibras
Fgf2, 7d+LIF, d1-2	Borde	No	Si	Fibras
Fgf2+DAPT	No	No	Si	No
Fgf2+DMSO	Borde poco	No	Si	No
Fgf2, 2d + LIF7d	Muestra destruida		Si	No
Fgf2 (10) 7d→LIF, d2-7	Si en parches	2 parches en el borde	Si	3 parches con fuerte señal
Fgf2 (20), 7d→LIF, d2-7	Si, muchas fibras	Poco en el borde	Si	3 parches con fuerte señal
Fgf2, 4d→LIF, d5-7	Si	Parches y fibras	Si	Pocas fibras
Fgf2, 4d→DAPT, d4-7	Fibras punteadas	No	Si	No
DAPT 7d	No	Fibras en el borde	Si	No
DAPT, 2d→LIF	No	No	Si	No
DAPT, 4d→LIF	No	No	Si	No
DAPT, 2d→Fgf2	No	No	Si	Fibras
DAPT, 4d→Fgf2	2 parches en el borde	No	Si	No

Los explantes de E9.5 fueron refringentes al tratamiento con Fgf2 y/o LIF, en ningún caso observamos células Gfap⁺ en ninguna región del explante. Los mesencéfalos de E10.5 respondieron levemente en algunos casos (Fig. 26A-B) y los de E11.5 presentaron una inducción mayor por los tratamientos, generando más células Gfap⁺ (Fig. 26C-D). Los niveles de respuesta fueron clasificados en 4: negativo (-, ninguna célula Gfap⁺, ligero (+; pocas células Gfap⁺ en regiones dorsales), moderado (++, más células Gfap⁺ que en el nivel ligero, principalmente en región

media y dorsal) y alto (+++, muchas células Gfap⁺ en regiones media y dorsal y surgimiento de células positivas en región ventral). La inducción en los explantes de E10.5 se movió entre negativo y moderado en todas las condiciones, solo LIF generó una inducción moderada en 20% de los casos, pero ambos factores produjeron una respuesta ligera en el 50% de los casos (Fig. 26B). En los explantes de E11.5 ambos factores logran inducir astrogénesis en todos los casos, alcanzando un 40% de explantes con niveles altos; LIF y Fgf2 por si solos inducen respuestas ligeras y moderadas, pero LIF logra hacerlo en mayor número de casos (Fig. 26D). La mayoría de las células Gfap⁺ que emergieron en los explantes de E11.5 fueron también Nestina⁺ (Fig. 26E, panel izquierdo), lo cual es indicativo de que estas células no logran terminar su diferenciación en estas condiciones. Además, las células Gfap⁺ que surgen en el nicho DAm (aproximadamente 5% del total de Lmx1a⁺) mantienen el marcador Lmx1a, lo que sugiere que vienen de precursores DAm especificados (Fig. 26E, panel derecho). No se observaron diferencias significativas en la cantidad de células Nestina⁺ o β -III Tubulina⁺, lo que indica que la población con potencial neurogénico no se altera con los tratamientos (Fig. 26F). La poca eficiencia de inducción astrogénica vista con los tratamientos en los explantes podría deberse a la presencia de factores que inhiben la astrogénesis presentes en el tejido. Para evitarlos, probamos el potencial astrogénico de las células en cultivos de CPNs en monocapa. Decidimos comparar el potencial de las células de E10.5 y E12.5 recién cultivadas y tratadas por 2 días con los factores de crecimiento. Los cultivos primarios de E10.5 no mostraron signos de inducción



astrogénica en ninguna de las condiciones (Fgf2 o Fgf2+LIF; Fig. 27A, panel izquierdo), mientras que algunas células Gfap⁺ se encontraron en los cultivos de E12.5 en presencia de Fgf2 y LIF (5.98 ± 3.75%; Fig. 27A-B). Similar a lo observado en los explantes, la mayoría de las células Gfap⁺ no han completado su diferenciación ya que mantienen la expresión de Nestina (Fig. 27D). Tampoco aquí se observaron diferencias entre el número de células Nestina⁺ o β-III Tubulina⁺ en las diferentes condiciones (Fig. 27C).

Quisimos evaluar si las CPNs de E10.5 cambian su potencial neurogénico en cultivo, después de 3 pases (alrededor de 10 días *in vitro*), tratamos a las células con Fgf2 (control) y LIF por 48 h. Se observan células Gfap⁺ en los controles (Fig. 27E panel izquierdo), lo que indica que las condiciones de cultivo en monocapa inducen el cambio de potencial de las CPNs de solo neurogénico a astrogénico y la adición de LIF no parece aumentar el número de astrocitos (Fig. 27E panel derecho). Esto concuerda con otros reportes donde se muestra que en cultivos primarios de largo plazo las CPNs ganan potencial astrogénico gracias a la presencia de Fgf2 (Anderson et al., 2007; Chang et al., 2004).

En conjunto, los datos anteriores sugieren que el potencial astrogénico es una propiedad intrínseca que los precursores mesencefálicos ganan desde E11.5 pero

Figura 26. Los explantes mesencefálicos de etapas tempranas muestran poca capacidad de diferenciación astrogénica. (A) Explantes de E10.5 fueron cultivados con Fgf2, LIF o ambos por 7 días. Inmunofluorescencia en *whole mount* muestra células Nestina⁺ y en algunos casos Gfap⁺. (B) Cuantificación de los casos de cada grado de inducción astrogénica (-, no Gfap⁺; +, muy pocas Gfap⁺; ++, pocas Gfap⁺ preferentemente en zonas dorsales; +++, muchas Gfap⁺ en región dorsal y ventral), n = 4. (C) Explantes de E11.5 cultivados por 6 días con las condiciones astrogénicas. (D) Cuantificación de los casos de cada grado de inducción astrogénica. (E) La mayoría de las células Gfap⁺ también son Nestina⁺ (panel izquierdo). Dentro del nicho DAm algunas células Lmx1a⁺ diferencian astrocitos. (F) Inmunofluorescencias para Nestina y β-III Tubulina en explantes de E11.5. Barra de escala 50 μm.

los factores que promueven la diferenciación terminal surgen en etapas del desarrollo más tardías.

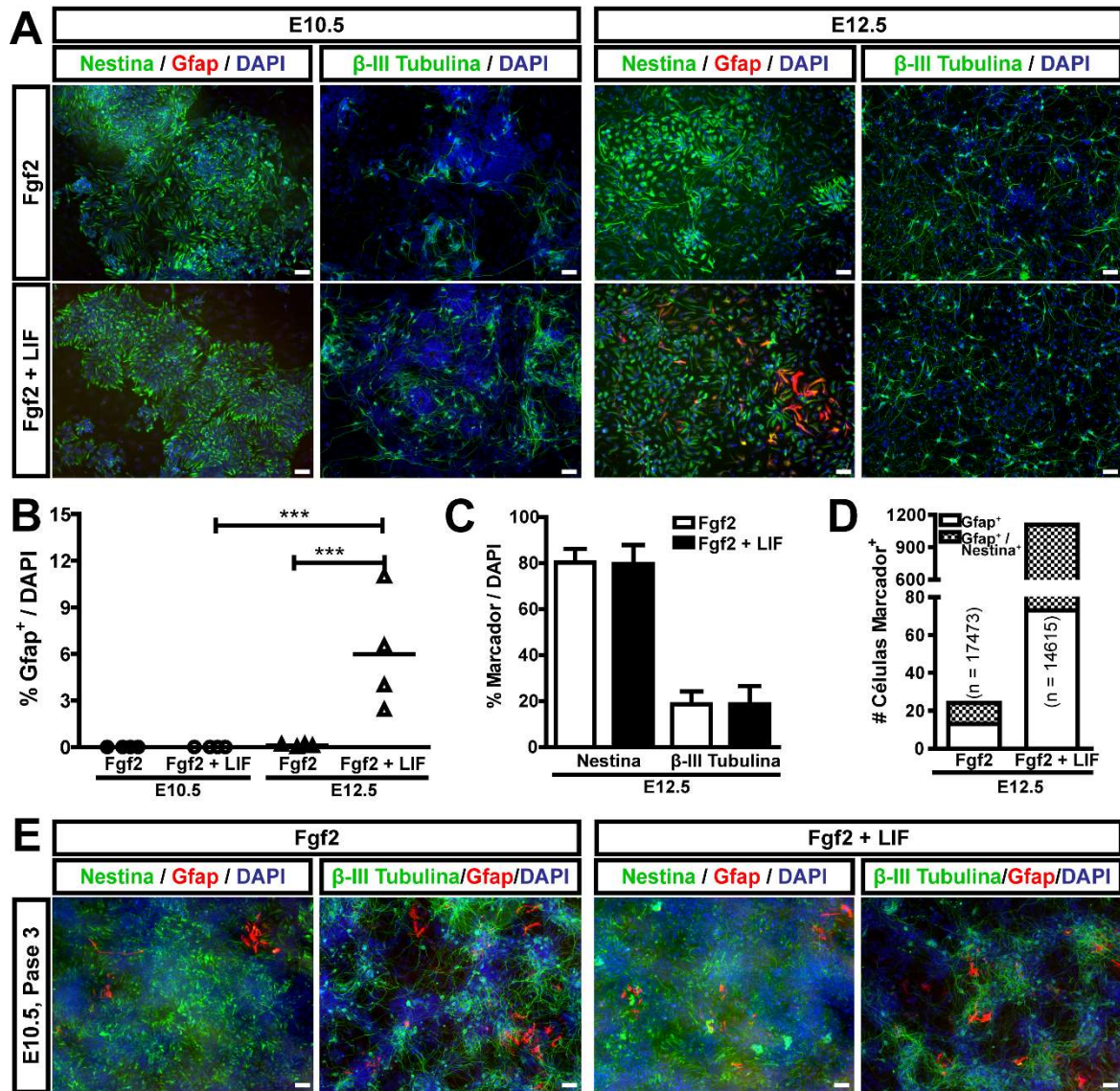


Figura 27. Precursores DAM “tardíos” muestran capacidad para diferenciar a astrocitos. (A) Cultivos primarios de precursores DAM de E10.5 y E12.5 fueron cultivados por 2 días en condiciones astrogénicas. Inmunofluorescencias muestran la presencia de células Nestina⁺ y de neuronas β -III Tubulina⁺. No se observaron células Gfap⁺ en los cultivos de E10.5 pero algunas células aparecieron en los de E12.5. (B) Cuantificación de las células Gfap⁺ en los cultivos primarios. Los asteriscos representan una diferencia significativa $p < 0.001$. Cada punto representa el promedio de un experimento independiente. (C) Cuantificación del número de células Nestina⁺ y β -III Tubulina⁺ en los cultivos de E12.5. Los valores muestran el promedio \pm D.E. (D) Cuantificación de las células Gfap⁺/Nestina⁺ en cultivos de E12.5. n=número de células. (E) CPNs de E10.5 fueron cultivadas por 3 pases y después cultivadas con LIF por 48 h. Células Gfap⁺ se observan en las condiciones control y con LIF. Barra de escala 50 μ m.

DISCUSION

Dinámica de diferenciación DAm

Nuestro actual conocimiento acerca de la diferenciación DAm *in vivo* deriva principalmente de la caracterización de patrones de expresión de genes en el nicho del mesencéfalo ventral. Recientemente, experimentos de secuenciación de ARN de una sola célula durante la diferenciación DAm (de E10.5 a E13.5) identificaron diversas poblaciones pertenecientes al linaje DAm (Kee et al., 2017; La Manno et al., 2016), las cuales incluyen a un solo tipo de precursor DAm, localizado en la región ventricular del mesencéfalo en E11.5 que expresa *Msx1*. Además, se descubrieron 3 poblaciones de células tipo GR y, basados en la expresión de genes que son marcadores de astrocitos como *Slc6a11* (“Solute carrier family 6 member A11”), *Tnc* (“Tenascin C”) y *Aldoc* (“Brain type aldolase”), se detectaron células de estas poblaciones que pudieran estar iniciando gliogénesis desde E11.5 (La Manno et al., 2016). Diferentes tipos de neuroblastos también fueron detectados, un neuroblasto temprano *Igfbpl1*⁺ (“Insulin Like Growth Factor Binding Protein Like 1”), *NeuroD1*⁺ (“Neuronal Differentiation Factor 1”), *Neurog2*⁺, *Nr4a2*⁺, *Pitx3*⁻ que deriva en el segundo tipo *Igfbpl1*⁻, *NeuroD1*⁻, *Neurog2*⁻, *Nr4a2*⁺, *Pitx3*⁺ antes de que la expresión de *Th* comience y se generen, aparentemente, tres tipos de neuronas DA inmaduras (La Manno et al., 2016). Se han generado ratones transgénicos con mutaciones en algunos de los genes detectados en el estudio anterior, en los cuales se observa que la diferenciación DAm está afectada en mayor o menor medida (Andersson, 2006; Kele et al., 2006; Nunes et al., 2003; Saucedo-Cardenas et al., 1998; Smidt et al., 2004; Smits et al., 2003). A pesar de este conocimiento detallado de la red molecular que dirige el desarrollo de las neuronas DAm, el potencial real

de diferenciación y el compromiso de las células en diferenciación todavía no está claro.

Estudiando el proceso de diferenciación en condiciones control (embriones silvestres) y adelantando la neurogénesis (mutantes *Dll1* e inhibición con DAPT) encontramos que el inicio de la diferenciación, detectado por la aparición de β -III Tubulina, está acoplado con la adquisición de marcadoras de neuronas DAm (Nr4a2 y Th) y regulado negativamente por Dll1. Los marcadores de CPNs DAm (*Msx1/2*) disminuyen cuando comienza la neurogénesis y el número de células Neurog2⁺ incrementa y decrece en coordinación con las células *Msx1/2*⁺. Ya que las células Neurog2⁺ no se dividen y son transitorias, inferimos que no hay restricciones en el paso de Neurog2 a Nr4a2. Las CPNs que quedan después de E12.5 (cuando los niveles de *Msx1/2* bajan considerablemente) podrían ser la fuente de las células gliales que emergen en etapas posteriores (ver debajo).

Las CPNs tempranas están en un estado intermedio del compromiso DAm pero la diferenciación neuronal prosigue de forma independiente

Para poder determinar cómo cambia el potencial de diferenciación de las CPNs DAm, utilizamos el ambiente del explante de mesencéfalo embrionario que posee señales de especificación a los diversos tipos neuronales que se generan a lo largo del eje D–V (Baizabal and Covarrubias, 2009). Desafortunadamente no pudimos evaluar fehacientemente el compromiso de las CPNs en etapas previas a E9.5 debido al tamaño de los embriones, ya que es difícil separar la región ventral de la dorsal y no pudimos obtener una población enriquecida en CPNs ventrales para concluir contundentemente el fenotipo de diferenciación. No obstante, trasplantes de CPNs telencefálicas de E8.5 a explantes de mesencéfalo muestran que estas

células, inicialmente Foxg1⁺ (“Forkhead box G1”, marcador temprano de telencéfalo) (Xuan et al., 1995), pierden su identidad telencefálica, se re-especifican y generan neuronas Th⁺ (Baizabal et al., 2010), por lo que podría esperarse que las CPNs del mesencéfalo ventral de la misma etapa tengan un comportamiento similar y no se detecte ningún grado de compromiso DAm, aunado a que las células de esta etapa no expresan todavía los marcadores de especificación DAm, solo los que les dan identidad mesencefálica.

Al trasplantar las CPNs de E9.5 en regiones dorsales del explante observamos que estas no logran re-especificarse y mantienen sus marcadores originales de especificación. Es de notar que, aunque logran generar neuronas β -III Tubulina⁺, estas no adquieren el marcador de neurona DA, Th. Esto contrasta con lo observado en los mutantes de *Dll1*, cultivos de explantes con DAPT y otros estudios (Yun et al., 2002) donde ambos procesos (la neurogénesis y la diferenciación DAm) parecen llevarse al cabo al mismo tiempo. De hecho, a pesar de que los factores de especificación regulan a genes proneurales como *Neurog2* (Andersson et al., 2006; Ferri et al., 2007; Omodei et al., 2008; Ono et al., 2010; Puelles, 2004) y de diferenciación DAm como *Nr4a2* (Chung et al., 2009; Ferri et al., 2007), nuestros datos sugieren que aún se requieren factores extrínsecos presentes en el nicho para mantener acopladas la neurogénesis y la diferenciación DAm, y que Shh no es suficiente para que las CPNs prosigan la diferenciación, aunque contribuye al mantenimiento de las CPNs DAm en sitios ectópicos.

Durante la reprogramación de fibroblastos a neuronas usando miR-9* (“micro ARN”) y miR-124, los cuales promueven neurogénesis reprimiendo a los inhibidores

neuronales Rest (“RE1 Silencing Transcription Factor”), Co-Rest (“Rest corepressor 1”) y Scp1 (“Synaptonemal Complex Protein 1”) (Packer et al., 2008; Visvanathan et al., 2007; Yoo et al., 2009), se ha observado que las células adquieren características de neuronas postmitóticas sin tener compromiso hacia ningún subtipo neuronal en particular (Abernathy et al., 2017), esto sugiere que la neurogénesis y la adquisición de un fenotipo neuronal pueden llevarse a cabo de forma separada pero durante el desarrollo normal las vemos acopladas porque todos los reguladores están presentes.

La presencia de factores inhibitorios en dominios dorsales del explante podría evitar la diferenciación terminal de las CPNs ventrales de E9.5 pero el hecho de que tampoco logren diferenciar en explantes de E9.5 y que las células de E10.5 en adelante si lo hacen hace que esto sea poco probable. Alternativamente, el reciente descubrimiento de que CPNs del área rostral del dominio $Lmx1a^+$ generan neuronas glutamatérgicas del núcleo subtalámico del diencefalo (Kee et al., 2017) abre la posibilidad de que estas células contribuyan a las neuronas $Lmx1a^+/Th^-$ que detectamos principalmente en las células provenientes de E9.5. Aunque la disección del mesencéfalo excluye la mayor parte del área diencefálica, no podemos descartar que algunas células estén presentes en la población trasplantada. No obstante, ya que las CPNs trasplantadas generan más neuronas DAM cuando se regresan a su nicho y el número aumenta entre E9.5 y E10.5, un patrón esperado en la diferenciación DAM, creemos que hay mayor probabilidad de que las neuronas $Lmx1a^+/Th^-$ que observamos en la región dorsal sean CPNs que no logran completar su diferenciación específica.

Es de notar que en la mitad de los casos cuando CPNs ventrales de cualquier etapa se integraron en el dominio Pax7, las células endógenas disminuían o apagaban la expresión de Pax7, lo que indica que las células trasplantadas también tienen influencia sobre su ambiente, fenómeno observado igualmente utilizando neuroesferas (Baizabal et al., 2012). Esto podría afectar de alguna forma la diferenciación de las células trasplantadas, aunque no determinamos si hay una correlación entre mostrar compromiso DAm e influenciar el ambiente donde de integración.

Las CPNs se comprometen al destino DAm en E10.5 y su número comienza a decaer a partir de E12.5

En contraste con las CPNs de E9.5, muchas de las de E10.5 y E11.5 están comprometidas a convertirse en neuronas DAm pero el número de estas CPNs disminuye para E12.5. Es importante notar que las CPNs DAm expresan el mismo código de factores de transcripción desde E9.5 hasta E12.5 (*Lmx1a/b*, *Otx2*, *Foxa1/2*, *Ferd3l*, *Dmrt5*, “Doublesex and Mab-3-Related Transcription Factor 5”) (Andersson et al., 2006; Ferri et al., 2007; Gennet et al., 2011; Omodei et al., 2008; Ono et al., 2010), y el estudio de expresión en célula única, que es más preciso, indica que hay un patrón de expresión similar entre las CPNs de E10.5 a E12.5 (La Manno et al., 2016). Sin embargo, en nuestro estudio y en los de otros grupos se ha observado que presentan diferentes capacidades proliferativas y potencial de diferenciación (Bye et al., 2012; Jonsson et al., 2009), lo que implica que hay factores que se expresan diferencialmente en el tiempo que influyen la determinación de las CPNs que no han sido aún determinados. Estas diferencias entre etapas correlacionan con cambios mayores en la transcripción observados en

el cerebro medio ventral, donde el mayor cambio entre dos etapas adyacentes ocurre entre E11.5 y E12.5, momento en el cual observamos el decremento en la población de CPNs DAm comprometidas (Chakrabarty et al., 2012; Yin et al., 2009). Algunos estudios han señalado que la población Neurog2⁺ es la fuente de las células DAm comprometidas (Jonsson et al., 2009; Thompson et al., 2006). En correlación con esto, observamos que la suspensión celular de E12.5, que contiene esta población, genera muchas neuronas Th⁺ cuando se trasplanta al cerebro adulto. No obstante, ya que la misma población genera muy pocas neuronas Th⁺ en los explantes, es aparente que las células Neurog2⁺ no son capaces de integrarse en los explantes y, aun así, encontramos algunas células comprometidas en esta etapa. Además, en la etapa de E10.5, donde observamos la mayor cantidad de células comprometidas, no hay, o hay muy pocas, células Neurog2⁺, esto apunta a que la determinación al linaje DAm comienza antes de que las células expresen este marcador.

Posibles Factores importantes en la determinación DAm

Durante la adquisición del compromiso DAm, en el tránsito de E9.5 a E10.5, los genes *Nr1h2/3* se expresan en la región ventricular del mesencéfalo ventral. Curiosamente, su expresión aumenta en E10.5 y posteriormente va decreciendo (Sacchetti et al., 2009), en paralelo con la disminución que observamos de las CPNs DAm comprometidas. La ganancia de función de *Nr1h2/3* promueve diferenciación DAm y suprime la diferenciación glial, en parte por la activación de *Neurog2* (Sacchetti et al., 2009). Por otro lado, *Nr1h2/3* regulan la lipogénesis a través de sus genes blanco *Abca1* (“ATP-binding cassette transporter isoform A1”), *Srebf1* (“Sterol

Regulatory Element Binding Transcription Factor 1”) y *ApoE* (“Apolipoprotein E”) (Schultz et al., 2000), la cual juega un papel importante en la toma de decisión entre proliferar o diferenciar de las células troncales neurales adultas (CTNa) (Knobloch et al., 2013), lo que podría suceder también durante el desarrollo. La vía de señalización de Notch, igualmente, regula genes lipogénicos (Pajvani et al., 2013) por lo que podría haber una acción conjunta entre Notch y los *Nr1h2/3* para regular la neurogénesis directamente, mediando la expresión de *Neurog2*, e indirectamente a través de la lipogénesis. Así, el compromiso de las CPNs podría comenzar con la expresión de *Nr1h2/3* en las CPNs que activaría consecuentemente la neurogénesis, esto sugiere que la población comprometida es transitoria, ya que los pasos siguientes a la activación de *Neurog2* parecen proseguir sin muchas restricciones *in vivo* (Trujillo-Paredes et al., 2016).

Otro factor que podría regular intrínsecamente el inicio de la determinación DAm es *Arntl* (“Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like protein 1”, también nombrado como *Bmal1*), recientemente identificado como uno de los genes centrales en la red de regulación de la neurogénesis DAm (Toledo et al., 2017). *Arntl* controla el ciclo circadiano, la entrada y salida del ciclo celular y la neurogénesis en CTNa (Bouchard-Cannon et al., 2013; Kimiwada et al., 2009; Malik et al., 2015). *In vivo*, *Arntl1* colocaliza con células *Sox2*⁺ en la región ventricular del mesencéfalo en E13.5 (Toledo et al., 2017) pero no se ha evaluado su expresión en etapas previas. En el desarrollo de las neuronas DAm solo se ha examinado su participación en la diferenciación *in vitro* a partir de una línea de células neuroepiteliales humanas, donde su pérdida de función reduce considerablemente el número de neuronas *Th*⁺ que se generan (Toledo et al., 2017). Queda por evaluar si sus efectos se dan a

través de la proliferación de las CPNs o de la activación de genes de diferenciación neuronal. Cabe destacar que las funciones de Arntl en la neurogénesis tienen mucha similitud con las de la vía de Notch (control de la proliferación-diferenciación) por lo que ambas vías podrían estar conectadas en el algún punto.

Además de los factores de transcripción que expresan las CPNs, existen diferencias en el tiempo entre los tipos de células que integran el nicho DAM y en las moléculas presentes. Previamente en el laboratorio se probó que los explantes de E10.5 pero no los de E12.5 son capaces de inducir diferenciación dopaminérgica de precursores telencefálicos tempranos (Baizabal et al., 2010), lo que sugiere que los componentes del nicho DAM cambian en el tiempo. En el estudio de transcripción de célula única se mostró que las células de la GR tipo 1 y los pericitos son las poblaciones más abundantes en las etapas de inicio de la neurogénesis DAM (E11.5-E12.5), mientras que la GR tipo 2 y 3 predominan en las etapas siguientes (E14.5-15.5). La GR tipo 1 representa a los precursores DAM y las tipo 2 y 3 parecen ser responsables de proveer las señales necesarias para el mantenimiento del nicho y la diferenciación de las células (proteínas de matriz extracelular, morfógenos, ligandos y receptores de las vías de señalización como Wnt, Shh y Notch) (Toledo et al., 2017). Las proteínas de matriz extracelular se encuentran enriquecidas en la región inmediatamente adyacente a la pared ventricular del neuroepitelio, donde se dividen la mayoría de las CPNs por lo que es de suponerse que tienen un papel importante en la neurogénesis (Lathia et al., 2007). Recientemente se observó que la Integrina β -1 puede regular la neurogénesis DAM en el pollo (Long et al., 2016), con esto se amplía el número de reguladores de la determinación DAM a explorar.

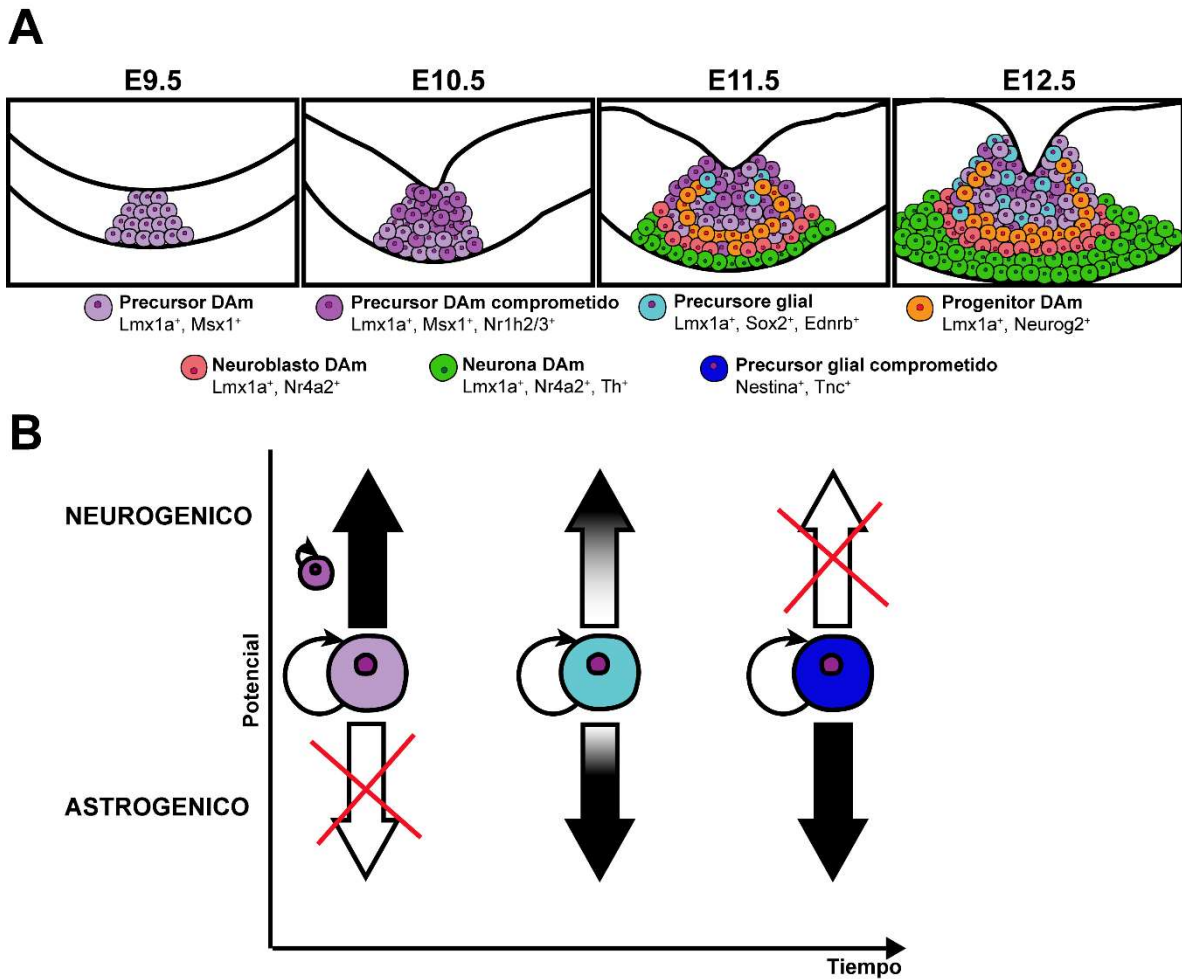


Figura 28. Modelo de la adquisición del compromiso DAm y glial de las CPNs durante la diferenciación DAm. (A) En E9.5 el nicho DAm se compone de CPNs especificadas ($Lmx1a^+Msx1^+$) que proliferan activamente. Para E10.5, la mayoría de las CPNs están transitando a un estado comprometido ($Lmx1a^+Msx1^+Nr1h2/3^+$). Por consiguiente, en E11.5 el nicho está compuesto ahora de CPNs especificadas ($Lmx1a^+Msx1^+$) y comprometidas ($Lmx1a^+Msx1^+Nr1h2/3^+$), que activamente están generando progenitores ($Lmx1a^+Neurog2^+$) y neuronas inmaduras ($Lmx1a^+Nr4a2^+$ y posteriormente $Lmx1a^+Nr4a2^+Th^+$); en esta etapa, algunas CPNs comienzan a adquirir potencial astrogénico ($Lmx1a^+Sox2^+Ednrb^+$). En E12.5 la neurogénesis DAm alcanza su pico y muchas neuronas Th^+ se acumulan rápidamente, las CPNs comprometidas comienzan a disminuir y las gliogénicas continúan proliferando. (B) A lo largo del desarrollo, distintos tipos de CPNs emergen en el nicho DAm. Las CPNs tempranas solo pueden generar neuronas, incluso en presencia de señales gliogénicas y, mientras la diferenciación procede se van comprometiendo al fenotipo DAm. Entonces, las CPNs gliogénicas emergen pero mantienen algo de potencial neurogénico, detectado en condiciones *in vitro*. Más tarde en el desarrollo, las CPNs gliogénicas pierden lo que les queda de potencial neurogénico y se comprometen totalmente al linaje glial.

El potencial astrogénico de las CPNs DAm

Se sabe que después de que termina la neurogénesis, los astrocitos se convierten en el principal destino de las CPNs (Panchision and McKay, 2002). En el nicho DAm

se han detectado células con marcadores astrocíticos en las últimas fases de la diferenciación neuronal (La Manno et al., 2016); sin embargo, no está claro si estas células aparecen porque hay factores extrínsecos que promueven la diferenciación astrocítica o si las CPNs ganaron esa propiedad intrínseca antes de que comience esa diferenciación. Nosotros encontramos que antes de E11.5 las CPNs mesencefálicas son refractarias a iniciar astrogénesis, pero a partir de E12.5 pueden diferenciar cuando están presentes señales inductivas (en el cerebro adulto o en cultivo con Fgf2 y LIF). Esta ganancia en potencial astrogénico conforme avanza el desarrollo se ha observado también en precursores corticales, donde CNTF o LIF no tienen efecto inductivo en E12.5 pero sí en E14.5 (Johe et al., 1996). Es aparente que este cambio en el potencial es una propiedad predeterminada de muchos tipos de CPNs que ha sido observada en diferentes condiciones de cultivo (Anderson et al., 2007; Baizabal et al., 2012; Chang et al., 2004; Qian et al., 2000). Estos datos sugieren que las CPNs tempranas solo son capaces de generar neuronas y su progenie se va comprometiendo progresivamente al destino astrocítico (Fig. 28B). El compromiso neuronal DAM parece ser una propiedad transitoria de las CPNs que antecede la generación de progenitores postmitóticos comprometidos y de CPNs con potencial astrogénico. Asimismo, CPNs tempranas parecen tener una mayor plasticidad que, como describimos, se restringe solo hasta que inicia la neurogénesis y el compromiso hacia el fenotipo DAM comienza a detectarse (Fig. 28). Cabe destacar que la expansión de precursores comprometidos a un destino neuronal específico no ha podido llevarse a cabo. Esto debido probablemente a que las CPNs son tomadas en etapas tardías de la diferenciación, cuando quedan pocas CPNs dividiéndose y con alto potencial neurogénico (Bang et al., 2015; Chung et

al., 2006; Meyer et al., 2012; Yan et al., 2001). Por lo tanto, es necesario hacer esfuerzos futuros para establecer si es posible mantener CPNs en división que mantengan su capacidad neurogénica y la identidad que tenían *in vivo* que garantice una posterior diferenciación dopaminérgica específica.

CONCLUSIONES

- Las CPNs DAm de E9.5 muestran un grado de compromiso que no permite que se re-especifiquen cuando se implantan en un nuevo nicho pero, si bien logran diferenciar a neuronas inmaduras, no completan la diferenciación DA (generar neuronas Th⁺).
- Shh no es suficiente para que las CPNs DAm terminen su diferenciación fuera del nicho.
- Alrededor del E10.5 surge una población de CPNs comprometidas al linaje dopaminérgico que se mantiene hasta E11.5 y comienza a disminuir en E12.5.
- La población comprometida se encuentra principalmente en las CPNs ventriculares, ya que trasplantes de la región más ventricular de diferentes etapas muestran el mismo o mejor grado de compromiso que el trasplante de toda la región ventral. Además los datos sugieren que los progenitores postmitóticos no se integran con alta frecuencia en los explantes de mesencéfalo.
- La disminución del potencial de diferenciación dopaminérgica de las CPNs de E12.5 correlaciona con la adquisición de potencial de diferenciación astrogénico, el cual no se observan en células de etapas más tempranas.

PERSPECTIVAS

- *Evaluar el papel de reguladores de la neurogénesis en el compromiso al linaje DAm*

Con el avance que se ha tenido en los últimos años en la edición del genoma se ha hecho más sencillo tener ratones transgénicos con ganancia o pérdida de cualquier gene, así la evaluación de la función de los posibles marcadores del compromiso dopaminérgico, mencionados en la discusión, podría realizarse utilizando CPNs obtenidas de ratones transgénico de la misma forma que lo hicimos en este estudio.

- *Determinar cómo cambia el potencial de diferenciación de las CPNs cultivadas in vitro y determinar qué señales podrían mantener su potencial original.*

Experimentos preliminares han mostrado que las CPNs DAm de E10.5 cambian su potencial neurogénico por uno astrogénico conforme pasan los días en cultivo. Una de las señales que mantienen la poza de CPNs en el nicho DAm *in vivo* es la de Notch, por lo cual suponemos que mantener la señal activa en los cultivos podría ayudar a mantener el potencial inicial de las CPNs en cultivo por más tiempo. Lo mismo para la vía de Wnt, que se ha visto regula la decisión de proliferación/diferenciación (Arenas, 2014).

- *Utilizar cultivo de organoides con CPNs como otra forma de evaluar su potencial.*

La generación de organoides, estructuras tridimensionales organizadas, utilizando células neurales ha mostrado ser de utilidad para estudiar interacciones complejas que los cultivos en 2D no proveen (Lancaster and Knoblich, 2014; Tieng et al., 2014). Utilizar este tipo de cultivo sería una

herramienta valiosa para evaluar la interacción entre CPNs de distintas etapas y su potencial de diferenciación con menos limitaciones en cuanto a integración de células y tiempo de cultivo (los organoides se pueden cultivar por periodos mucho más largos que los explantes).

- *Determinar si las CPNs migran en el eje A-P durante el desarrollo de las neuronas DAm*

La evaluación de la dinámica de diferenciación DAm y algunos experimentos preliminares nos sugieren que durante la diferenciación hay migración de células no solo en el eje apico-basal sino también en el antero-posterior. Determinar si este es el caso sería importante para comprender mejor todo el proceso de diferenciación DAm. Una forma de determinarlo sería siguiendo la diferenciación de los precursores dopaminérgicos en tiempo real utilizando cultivos de explantes del mesencéfalo, los cuales también nos permitirían utilizar inhibidores para evaluar la participación de moléculas específicas.

BIBLIOGRAFIA

- Abernathy, D.G., Kim, W.K., McCoy, M.J., Lake, A.M., Ouwenga, R., Lee, S.W., Xing, X., Li, D., Lee, H.J., Heuckeroth, R.O., *et al.* (2017). MicroRNAs Induce a Permissive Chromatin Environment that Enables Neuronal Subtype-Specific Reprogramming of Adult Human Fibroblasts. *Cell Stem Cell* 21, 332-348 e339.
- Alberi, L., Sgado, P., and Simon, H.H. (2004). Engrailed genes are cell-autonomously required to prevent apoptosis in mesencephalic dopaminergic neurons. *Development* 131, 3229-3236.
- Altman, J., and Bayer, S.A. (1981). Development of the brain stem in the rat. V. Thymidine-radiographic study of the time of origin of neurons in the midbrain tegmentum. *J Comp Neurol* 198, 677-716.
- Alvarado-Mallart, R.M., Martinez, S., and Lance-Jones, C.C. (1990). Pluripotentiality of the 2-day-old avian germinative neuroepithelium. *Dev Biol* 139, 75-88.
- Anderson, L., Burnstein, R.M., He, X., Luce, R., Furlong, R., Foltynie, T., Sykacek, P., Menon, D.K., and Caldwell, M.A. (2007). Gene expression changes in long term expanded human neural progenitor cells passaged by chopping lead to loss of neurogenic potential in vivo. *Exp Neurol* 204, 512-524.
- Andersson, E., Jensen, J. B., Parmar, M., Guillemot, F., and Björklund, A. (2006). Development of the mesencephalic dopaminergic neuron system is compromised in the absence of neurogenin 2. *Development* 133, 507-516.
- Andersson, E., Tryggvason, U., Deng, Q., Friling, S., Alekseenko, Z., Robert, B., Perlmann, T., and Ericson, J. (2006). Identification of intrinsic determinants of midbrain dopamine neurons. *Cell* 124, 393-405.
- Andersson, E.R., Prakash, N., Cajanek, L., Minina, E., Bryja, V., Bryjova, L., Yamaguchi, T.P., Hall, A.C., Wurst, W., and Arenas, E. (2008). Wnt5a regulates ventral midbrain morphogenesis and the development of A9-A10 dopaminergic cells in vivo. *PLoS One* 3, e3517.
- Anthony, T.E., Klein, C., Fishell, G., and Heintz, N. (2004). Radial glia serve as neuronal progenitors in all regions of the central nervous system. *Neuron* 41, 881-890.
- Arai, Y., Pulvers, J.N., Haffner, C., Schilling, B., Nusslein, I., Calegari, F., and Huttner, W.B. (2011). Neural stem and progenitor cells shorten S-phase on commitment to neuron production. *Nat Commun* 2, 154.
- Arenas, E. (2014). Wnt signaling in midbrain dopaminergic neuron development and regenerative medicine for Parkinson's disease. *J Mol Cell Biol* 6, 42-53.
- Arts, M.P., Groenewegen, H.J., Veening, J.G., and Cools, A.R. (1996). Efferent projections of the retrorubral nucleus to the substantia nigra and ventral tegmental area in cats as shown by anterograde tracing. *Brain Res Bull* 40, 219-228.
- Baizabal, J.-M., and Covarrubias, L. (2009). The embryonic midbrain directs neuronal specification of embryonic stem cells at early stages of differentiation. *Developmental Biology* 325, 49-59.
- Baizabal, J.M., Cano-Martinez, A., Valencia, C., Santa-Olalla, J., Young, K.M., Rietze, R.L., Bartlett, P.F., and Covarrubias, L. (2012). Glial commitment of mesencephalic

neural precursor cells expanded as neurospheres precludes their engagement in niche-dependent dopaminergic neurogenesis. *Stem Cells Dev* 21, 1047-1058.

- Baizabal, J.M., and Covarrubias, L. (2009). The embryonic midbrain directs neuronal specification of embryonic stem cells at early stages of differentiation. *Dev Biol* 325, 49-59.
- Baizabal, J.M., Valencia, C., Guerrero-Flores, G., and Covarrubias, L. (2010). Telencephalic neural precursor cells show transient competence to interpret the dopaminergic niche of the embryonic midbrain. *Dev Biol* 349, 192-203.
- Bang, A.G., and Goulding, M.D. (1996). Regulation of vertebrate neural cell fate by transcription factors. *Curr Opin Neurobiol* 6, 25-32.
- Bang, S.Y., Kwon, S.H., Yi, S.H., Yi, S.A., Park, E.K., Lee, J.C., Jang, C.G., You, J.S., Lee, S.H., and Han, J.W. (2015). Epigenetic activation of the *Foxa2* gene is required for maintaining the potential of neural precursor cells to differentiate into dopaminergic neurons after expansion. *Stem Cells Dev* 24, 520-533.
- Barnabe-Heider, F., Wasylnka, J.A., Fernandes, K.J., Porsche, C., Sendtner, M., Kaplan, D.R., and Miller, F.D. (2005). Evidence that embryonic neurons regulate the onset of cortical gliogenesis via cardiotrophin-1. *Neuron* 48, 253-265.
- Baye, L.M., and Link, B.A. (2007). Interkinetic nuclear migration and the selection of neurogenic cell divisions during vertebrate retinogenesis. *J Neurosci* 27, 10143-10152.
- Benninger, F., Beck, H., Wernig, M., Tucker, K.L., Brustle, O., and Scheffler, B. (2003). Functional integration of embryonic stem cell-derived neurons in hippocampal slice cultures. *J Neurosci* 23, 7075-7083.
- Bergsland, M., Werme, M., Malewicz, M., Perlmann, T., and Muhr, J. (2006). The establishment of neuronal properties is controlled by *Sox4* and *Sox11*. *Genes Dev* 20, 3475-3486.
- Blaess, S., and Ang, S.L. (2015). Genetic control of midbrain dopaminergic neuron development. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol* 4, 113-134.
- Blaess, S., Bodea, G.O., Kabanova, A., Chanet, S., Mugniery, E., Derouiche, A., Stephen, D., and Joyner, A.L. (2011). Temporal-spatial changes in Sonic Hedgehog expression and signaling reveal different potentials of ventral mesencephalic progenitors to populate distinct ventral midbrain nuclei. *Neural Dev* 6, 29.
- Blaess, S., Corrales, J.D., and Joyner, A.L. (2006). Sonic hedgehog regulates Gli activator and repressor functions with spatial and temporal precision in the mid/hindbrain region. *Development* 133, 1799-1809.
- Bonilla, S., Hall, A.C., Pinto, L., Attardo, A., Gotz, M., Huttner, W.B., and Arenas, E. (2008). Identification of midbrain floor plate radial glia-like cells as dopaminergic progenitors. *Glia* 56, 809-820.
- Bonni, A., Sun, Y., Nadal-Vicens, M., Bhatt, A., Frank, D.A., Rozovsky, I., Stahl, N., Yancopoulos, G.D., and Greenberg, M.E. (1997). Regulation of gliogenesis in the central nervous system by the JAK-STAT signaling pathway. *Science* 278, 477-483.
- Bouchard-Cannon, P., Mendoza-Viveros, L., Yuen, A., Kaern, M., and Cheng, H.Y. (2013). The circadian molecular clock regulates adult hippocampal neurogenesis by controlling the timing of cell-cycle entry and exit. *Cell Rep* 5, 961-973.

- Bye, C.R., Thompson, L.H., and Parish, C.L. (2012). Birth dating of midbrain dopamine neurons identifies A9 enriched tissue for transplantation into parkinsonian mice. *Exp Neurol* 236, 58-68.
- Campbell, K., and Gotz, M. (2002). Radial glia: multi-purpose cells for vertebrate brain development. *Trends Neurosci* 25, 235-238.
- Campbell, K., Olsson, M., and Bjorklund, A. (1995). Regional incorporation and site-specific differentiation of striatal precursors transplanted to the embryonic forebrain ventricle. *Neuron* 15, 1259-1273.
- Carletti, B., Grimaldi, P., Magrassi, L., and Rossi, F. (2002). Specification of cerebellar progenitors after heterotopic-heterochronic transplantation to the embryonic CNS in vivo and in vitro. *J Neurosci* 22, 7132-7146.
- Castro, D.S., Skowronska-Krawczyk, D., Armant, O., Donaldson, I.J., Parras, C., Hunt, C., Critchley, J.A., Nguyen, L., Gossler, A., Gottgens, B., *et al.* (2006). Proneural bHLH and Brn proteins coregulate a neurogenic program through cooperative binding to a conserved DNA motif. *Dev Cell* 11, 831-844.
- Cattaneo, E., Magrassi, L., Butti, G., Santi, L., Giavazzi, A., and Pezzotta, S. (1994). A short term analysis of the behaviour of conditionally immortalized neuronal progenitors and primary neuroepithelial cells implanted into the fetal rat brain. *Brain Res Dev Brain Res* 83, 197-208.
- Cebolla, B., and Vallejo, M. (2006). Nuclear factor-I regulates glial fibrillary acidic protein gene expression in astrocytes differentiated from cortical precursor cells. *J Neurochem* 97, 1057-1070.
- Colas, J.F., and Schoenwolf, G.C. (2001). Towards a cellular and molecular understanding of neurulation. *Dev Dyn* 221, 117-145.
- Crawford, T.Q., and Roelink, H. (2007). The notch response inhibitor DAPT enhances neuronal differentiation in embryonic stem cell-derived embryoid bodies independently of sonic hedgehog signaling. *Dev Dyn* 236, 886-892.
- Chakrabarty, K., Von Oerthel, L., Hellemons, A., Clotman, F., Espana, A., Groot Koerkamp, M., Holstege, F.C., Pasterkamp, R.J., and Smidt, M.P. (2012). Genome wide expression profiling of the mesodiencephalic region identifies novel factors involved in early and late dopaminergic development. *Biol Open* 1, 693-704.
- Chang, M.Y., Park, C.H., Lee, S.Y., and Lee, S.H. (2004). Properties of cortical precursor cells cultured long term are similar to those of precursors at later developmental stages. *Brain Res Dev Brain Res* 153, 89-96.
- Chao, L.C., Zhang, Z., Pei, L., Saito, T., Tontonoz, P., and Pilch, P.F. (2007). Nur77 coordinately regulates expression of genes linked to glucose metabolism in skeletal muscle. *Mol Endocrinol* 21, 2152-2163.
- Chen, J.K., Taipale, J., Young, K.E., Maiti, T., and Beachy, P.A. (2002). Small molecule modulation of Smoothed activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 14071-14076.
- Chi, C.L., Martinez, S., Wurst, W., and Martin, G.R. (2003). The isthmic organizer signal FGF8 is required for cell survival in the prospective midbrain and cerebellum. *Development* 130, 2633-2644.
- Chung, S., Hedlund, E., Hwang, M., Kim, D.W., Shin, B.S., Hwang, D.Y., Jung Kang, U., Isacson, O., and Kim, K.S. (2005). The homeodomain transcription factor Pitx3 facilitates

- differentiation of mouse embryonic stem cells into AHD2-expressing dopaminergic neurons. *Mol Cell Neurosci* 28, 241-252.
- Chung, S., Leung, A., Han, B.S., Chang, M.Y., Moon, J.I., Kim, C.H., Hong, S., Pruszk, J., Isacson, O., and Kim, K.S. (2009). Wnt1-lmx1a forms a novel autoregulatory loop and controls midbrain dopaminergic differentiation synergistically with the SHH-FoxA2 pathway. *Cell Stem Cell* 5, 646-658.
 - Chung, S., Shin, B.S., Hwang, M., Lardaro, T., Kang, U.J., Isacson, O., and Kim, K.S. (2006). Neural precursors derived from embryonic stem cells, but not those from fetal ventral mesencephalon, maintain the potential to differentiate into dopaminergic neurons after expansion in vitro. *Stem Cells* 24, 1583-1593.
 - Deneen, B., Ho, R., Lukaszewicz, A., Hochstim, C.J., Gronostajski, R.M., and Anderson, D.J. (2006). The transcription factor NFIA controls the onset of gliogenesis in the developing spinal cord. *Neuron* 52, 953-968.
 - Edlund, T., and Jessell, T.M. (1999). Progression from extrinsic to intrinsic signaling in cell fate specification: a view from the nervous system. *Cell* 96, 211-224.
 - Egan, M.F., and Weinberger, D.R. (1997). Neurobiology of schizophrenia. *Curr Opin Neurobiol* 7, 701-707.
 - Ezzeddine, Z.D., Yang, X., DeChiara, T., Yancopoulos, G., and Cepko, C.L. (1997). Postmitotic cells fated to become rod photoreceptors can be respecified by CNTF treatment of the retina. *Development* 124, 1055-1067.
 - Fedtsova, N., and Turner, E.E. (2001). Signals from the ventral midline and isthmus regulate the development of Brn3.0-expressing neurons in the midbrain. *Mech Dev* 105, 129-144.
 - Ferri, A.L., Lin, W., Mavromatakis, Y.E., Wang, J.C., Sasaki, H., Whitsett, J.A., and Ang, S.L. (2007). Foxa1 and Foxa2 regulate multiple phases of midbrain dopaminergic neuron development in a dosage-dependent manner. *Development* 134, 2761-2769.
 - Fishell, G. (1995). Striatal precursors adopt cortical identities in response to local cues. *Development* 121, 803-812.
 - Fode, C., Ma, Q., Casarosa, S., Ang, S.-L., Anderson, D. J., and Guillemot, F. (2000). A role for neural determination genes in specifying the dorsoventral identity of telencephalic neurons. *Genes and Development* 14, 67-80.
 - Frank-Kamenetsky, M., Zhang, X.M., Bottega, S., Guicherit, O., Wichterle, H., Dudek, H., Bumcrot, D., Wang, F.Y., Jones, S., Shulok, J., *et al.* (2002). Small-molecule modulators of Hedgehog signaling: identification and characterization of Smoothed agonists and antagonists. *J Biol* 1, 10.
 - Friling, S., Andersson, E., Thompson, L.H., Jonsson, M.E., Hebsgaard, J.B., Nanou, E., Alekseenko, Z., Marklund, U., Kjellander, S., Volakakis, N., *et al.* (2009). Efficient production of mesencephalic dopamine neurons by Lmx1a expression in embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 7613-7618.
 - Gardner, C.A., and Barald, K.F. (1991). The cellular environment controls the expression of engrailed-like protein in the cranial neuroepithelium of quail-chick chimeric embryos. *Development* 113, 1037-1048.
 - Gennet, N., Gale, E., Nan, X., Farley, E., Takacs, K., Oberwallner, B., Chambers, D., and Li, M. (2011). Doublesex and mab-3-related transcription factor 5 promotes midbrain

dopaminergic identity in pluripotent stem cells by enforcing a ventral-medial progenitor fate. *Proc Natl Acad Sci U S A* *108*, 9131-9136.

- Gil, M., McKinney, C., Lee, M.K., Eells, J.B., Phyllaier, M.A., and Nikodem, V.M. (2007). Regulation of GTP cyclohydrolase I expression by orphan receptor Nurr1 in cell culture and in vivo. *J Neurochem* *101*, 142-150.
- Gotz, M., and Huttner, W.B. (2005). The cell biology of neurogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* *6*, 777-788.
- Grapin-Botton, A., Bonnin, M.A., and Le Douarin, N.M. (1997). Hox gene induction in the neural tube depends on three parameters: competence, signal supply and paralogue group. *Development* *124*, 849-859.
- Guo, C., Qiu, H.Y., Huang, Y., Chen, H., Yang, R.Q., Chen, S.D., Johnson, R.L., Chen, Z.F., and Ding, Y.Q. (2007). Lmx1b is essential for Fgf8 and Wnt1 expression in the isthmic organizer during tectum and cerebellum development in mice. *Development* *134*, 317-325.
- Habecker, B.A., Symes, A.J., Stahl, N., Francis, N.J., Economides, A., Fink, J.S., Yancopoulos, G.D., and Landis, S.C. (1997). A sweat gland-derived differentiation activity acts through known cytokine signaling pathways. *J Biol Chem* *272*, 30421-30428.
- Hadjantonakis, A.K., Gertsenstein, M., Ikawa, M., Okabe, M., and Nagy, A. (1998). Generating green fluorescent mice by germline transmission of green fluorescent ES cells. *Mech Dev* *76*, 79-90.
- Hanaway, J., McConnell, J.A., and Netsky, M.G. (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 Neurol* *142*, 59-73.
- Hatakeyama, J., Bessho, Y., Katoh, K., Ookawara, S., Fujioka, M., Guillemot, F., and Kageyama, R. (2004). Hes genes regulate size, shape and histogenesis of the nervous system by control of the timing of neural stem cell differentiation. *Development* *131*, 5539-5550.
- Hayes, L., Zhang, Z., Albert, P., Zervas, M., and Ahn, S. (2011). Timing of Sonic hedgehog and Gli1 expression segregates midbrain dopamine neurons. *J Comp Neurol* *519*, 3001-3018.
- Hermanson, O., Jepsen, K., and Rosenfeld, M.G. (2002). N-CoR controls differentiation of neural stem cells into astrocytes. *Nature* *419*, 934-939.
- Hirabayashi, Y., and Gotoh, Y. (2010). Epigenetic control of neural precursor cell fate during development. *Nat Rev Neurosci* *11*, 377-388.
- Hitoshi, S., Tropepe, V., Ekker, M., and van der Kooy, D. (2002). Neural stem cell lineages are regionally specified, but not committed, within distinct compartments of the developing brain. *Development* *129*, 233-244.
- Hrabe de Angelis, M., McIntyre, J., 2nd, and Gossler, A. (1997). Maintenance of somite borders in mice requires the Delta homologue Dll1. *Nature* *386*, 717-721.
- Hynes, M., Porter, J.A., Chiang, C., Chang, D., Tessier-Lavigne, M., Beachy, P.A., and Rosenthal, A. (1995). Induction of midbrain dopaminergic neurons by Sonic hedgehog. *Neuron* *15*, 35-44.

- Itasaki, N., Sharpe, J., Morrison, A., and Krumlauf, R. (1996). Reprogramming Hox expression in the vertebrate hindbrain: influence of paraxial mesoderm and rhombomere transposition. *Neuron* 16, 487-500.
- Itoh, M., Kim, C.H., Palardy, G., Oda, T., Jiang, Y.J., Maust, D., Yeo, S.Y., Lorick, K., Wright, G.J., Ariza-McNaughton, L., *et al.* (2003). Mind bomb is a ubiquitin ligase that is essential for efficient activation of Notch signaling by Delta. *Dev Cell* 4, 67-82.
- Jacobs, F.M., van Erp, S., van der Linden, A.J., von Oerthel, L., Burbach, J.P., and Smidt, M.P. (2009). Pitx3 potentiates Nurr1 in dopamine neuron terminal differentiation through release of SMRT-mediated repression. *Development* 136, 531-540.
- Jacobs, F.M., Veenfliet, J.V., Almirza, W.H., Hoekstra, E.J., von Oerthel, L., van der Linden, A.J., Neijts, R., Koerkamp, M.G., van Leenen, D., Holstege, F.C., *et al.* (2011). Retinoic acid-dependent and -independent gene-regulatory pathways of Pitx3 in mesodiencephalic dopaminergic neurons. *Development* 138, 5213-5222.
- Jaeger, I., Arber, C., Risner-Janiczek, J.R., Kuechler, J., Pritzsche, D., Chen, I.C., Naveenan, T., Ungless, M.A., and Li, M. (2011). Temporally controlled modulation of FGF/ERK signaling directs midbrain dopaminergic neural progenitor fate in mouse and human pluripotent stem cells. *Development* 138, 4363-4374.
- Jankovic, J., Chen, S., and Le, W.D. (2005). The role of Nurr1 in the development of dopaminergic neurons and Parkinson's disease. *Prog Neurobiol* 77, 128-138.
- Johe, K.K., Hazel, T.G., Muller, T., Dugich-Djordjevic, M.M., and McKay, R.D. (1996). Single factors direct the differentiation of stem cells from the fetal and adult central nervous system. *Genes Dev* 10, 3129-3140.
- Joksimovic, M., Yun, B.A., Kittappa, R., Anderegg, A.M., Chang, W.W., Taketo, M.M., McKay, R.D., and Awatramani, R.B. (2009). Wnt antagonism of Shh facilitates midbrain floor plate neurogenesis. *Nat Neurosci* 12, 125-131.
- Jonsson, M.E., Ono, Y., Bjorklund, A., and Thompson, L.H. (2009). Identification of transplantable dopamine neuron precursors at different stages of midbrain neurogenesis. *Exp Neurol* 219, 341-354.
- Joseph, B., Wallen-Mackenzie, A., Benoit, G., Murata, T., Joodmardi, E., Okret, S., and Perlmann, T. (2003). p57(Kip2) cooperates with Nurr1 in developing dopamine cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 15619-15624.
- Kadkhodaei, B., Ito, T., Joodmardi, E., Mattsson, B., Rouillard, C., Carta, M., Muramatsu, S., Sumi-Ichinose, C., Nomura, T., Metzger, D., *et al.* (2009). Nurr1 is required for maintenance of maturing and adult midbrain dopamine neurons. *J Neurosci* 29, 15923-15932.
- Kadokawa, Y., and Marunouchi, T. (2002). Chimeric analysis of Notch2 function: a role for Notch2 in the development of the roof plate of the mouse brain. *Dev Dyn* 225, 126-134.
- Kamakura, S., Oishi, K., Yoshimatsu, T., Nakafuku, M., Masuyama, N., and Gotoh, Y. (2004). Hes binding to STAT3 mediates crosstalk between Notch and JAK-STAT signalling. *Nat Cell Biol* 6, 547-554.
- Kee, N., Volakakis, N., Kirkeby, A., Dahl, L., Storvall, H., Nolbrant, S., Lahti, L., Bjorklund, A.K., Gillberg, L., Joodmardi, E., *et al.* (2017). Single-Cell Analysis Reveals a

Close Relationship between Differentiating Dopamine and Subthalamic Nucleus Neuronal Lineages. *Cell Stem Cell* 20, 29-40.

- Kele, J., Simplicio, N., Ferri, A.L., Mira, H., Guillemot, F., Arenas, E., and Ang, S.L. (2006). Neurogenin 2 is required for the development of ventral midbrain dopaminergic neurons. *Development* 133, 495-505.
- Kelley, A.E., and Berridge, K.C. (2002). The neuroscience of natural rewards: relevance to addictive drugs. *J Neurosci* 22, 3306-3311.
- Kiecker, C., and Lumsden, A. (2005). Compartments and their boundaries in vertebrate brain development. *Nat Rev Neurosci* 6, 553-564.
- Kilpatrick, T.J., and Bartlett, P.F. (1993). Cloning and growth of multipotential neural precursors: requirements for proliferation and differentiation. *Neuron* 10, 255-265.
- Kim, H.J., Sugimori, M., Nakafuku, M., and Svendsen, C.N. (2007). Control of neurogenesis and tyrosine hydroxylase expression in neural progenitor cells through bHLH proteins and Nurr1. *Exp Neurol* 203, 394-405.
- Kim, J.Y., Koh, H.C., Lee, J.Y., Chang, M.Y., Kim, Y.C., Chung, H.Y., Son, H., Lee, Y.S., Studer, L., McKay, R., *et al.* (2003). Dopaminergic neuronal differentiation from rat embryonic neural precursors by Nurr1 overexpression. *J Neurochem* 85, 1443-1454.
- Kimiwada, T., Sakurai, M., Ohashi, H., Aoki, S., Tominaga, T., and Wada, K. (2009). Clock genes regulate neurogenic transcription factors, including NeuroD1, and the neuronal differentiation of adult neural stem/progenitor cells. *Neurochem Int* 54, 277-285.
- Kittappa, R., Chang, W.W., Awatramani, R.B., and McKay, R.D. (2007). The *foxa2* gene controls the birth and spontaneous degeneration of dopamine neurons in old age. *PLoS Biol* 5, e325.
- Knobloch, M., Braun, S.M., Zurkirchen, L., von Schoultz, C., Zamboni, N., Arauzo-Bravo, M.J., Kovacs, W.J., Karalay, O., Suter, U., Machado, R.A., *et al.* (2013). Metabolic control of adult neural stem cell activity by Fasn-dependent lipogenesis. *Nature* 493, 226-230.
- Knoepfler, P.S., Cheng, P.F., and Eisenman, R.N. (2002). N-myc is essential during neurogenesis for the rapid expansion of progenitor cell populations and the inhibition of neuronal differentiation. *Genes Dev* 16, 2699-2712.
- Kobayashi, T., Mizuno, H., Imayoshi, I., Furusawa, C., Shirahige, K., and Kageyama, R. (2009). The cyclic gene *Hes1* contributes to diverse differentiation responses of embryonic stem cells. *Genes Dev* 23, 1870-1875.
- Kondo, T., and Raff, M. (2000). Basic helix-loop-helix proteins and the timing of oligodendrocyte differentiation. *Development* 127, 2989-2998.
- La Manno, G., Gyllborg, D., Codeluppi, S., Nishimura, K., Salto, C., Zeisel, A., Borm, L.E., Stott, S.R., Toledo, E.M., Villaescusa, J.C., *et al.* (2016). Molecular Diversity of Midbrain Development in Mouse, Human, and Stem Cells. *Cell* 167, 566-580 e519.
- Lacomme, M., Liaubet, L., Pituello, F., and Bel-Vialar, S. (2012). NEUROG2 drives cell cycle exit of neuronal precursors by specifically repressing a subset of cyclins acting at the G1 and S phases of the cell cycle. *Mol Cell Biol* 32, 2596-2607.
- Lancaster, M.A., and Knoblich, J.A. (2014). Generation of cerebral organoids from human pluripotent stem cells. *Nat Protoc* 9, 2329-2340.

- Landis, S.C. (1990). Target regulation of neurotransmitter phenotype. *Trends Neurosci* 13, 344-350.
- Lange, C., Huttner, W.B., and Calegari, F. (2009). Cdk4/cyclinD1 overexpression in neural stem cells shortens G1, delays neurogenesis, and promotes the generation and expansion of basal progenitors. *Cell Stem Cell* 5, 320-331.
- Lathia, J.D., Patton, B., Eckley, D.M., Magnus, T., Mughal, M.R., Sasaki, T., Caldwell, M.A., Rao, M.S., Mattson, M.P., and French-Constant, C. (2007). Patterns of laminins and integrins in the embryonic ventricular zone of the CNS. *J Comp Neurol* 505, 630-643.
- Lee, J., Platt, K.A., Censullo, P., and Ruiz i Altaba, A. (1997). Gli1 is a target of Sonic hedgehog that induces ventral neural tube development. *Development* 124, 2537-2552.
- Lee, S.K., Lee, B., Ruiz, E.C., and Pfaff, S.L. (2005). Olig2 and Ngn2 function in opposition to modulate gene expression in motor neuron progenitor cells. *Genes Dev* 19, 282-294.
- Lendahl, U., Zimmerman, L.B., and McKay, R.D. (1990). CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell* 60, 585-595.
- Liem, K.F., Tremml, G., Roelink, H., and Jessell, T.M. (1995). Dorsal differentiation of neural plate cells induced by BMP-mediated signals from epidermal ectoderm. *Cell* 82, 969-979.
- Lin, W., Metzakopian, E., Mavromatakis, Y.E., Gao, N., Balaskas, N., Sasaki, H., Briscoe, J., Whitsett, J.A., Goulding, M., Kaestner, K.H., *et al.* (2009). Foxa1 and Foxa2 function both upstream of and cooperatively with Lmx1a and Lmx1b in a feedforward loop promoting mesodiencephalic dopaminergic neuron development. *Dev Biol* 333, 386-396.
- Lindsell, C.E., Boulter, J., diSibio, G., Gossler, A., and Weinmaster, G. (1996). Expression patterns of Jagged, Delta1, Notch1, Notch2, and Notch3 genes identify ligand-receptor pairs that may function in neural development. *Mol Cell Neurosci* 8, 14-27.
- Liu, A., and Joyner, A.L. (2001). EN and GBX2 play essential roles downstream of FGF8 in patterning the mouse mid/hindbrain region. *Development* 128, 181-191.
- Liu, A., and Niswander, L.A. (2005). Bone morphogenetic protein signalling and vertebrate nervous system development. *Nat Rev Neurosci* 6, 945-954.
- Long, K., Moss, L., Laursen, L., Boulter, L., and French-Constant, C. (2016). Integrin signalling regulates the expansion of neuroepithelial progenitors and neurogenesis via Wnt7a and Decorin. *Nat Commun* 7, 10354.
- Louvi, A., and Artavanis-Tsakonas, S. (2006). Notch signalling in vertebrate neural development. *Nat Rev Neurosci* 7, 93-102.
- Lutolf, S., Radtke, F., Aguet, M., Suter, U., and Taylor, V. (2002). Notch1 is required for neuronal and glial differentiation in the cerebellum. *Development* 129, 373-385.
- Malik, A., Kondratov, R.V., Jamasbi, R.J., and Geusz, M.E. (2015). Circadian Clock Genes Are Essential for Normal Adult Neurogenesis, Differentiation, and Fate Determination. *PLoS One* 10, e0139655.

- Mansour, A.A., Nissim-Eliraz, E., Zisman, S., Golan-Lev, T., Schatz, O., Klar, A., and Ben-Arie, N. (2011). *Foxa2* regulates the expression of *Nato3* in the floor plate by a novel evolutionarily conserved promoter. *Mol Cell Neurosci* 46, 187-199.
- Martinat, C., Bacci, J.J., Leete, T., Kim, J., Vanti, W.B., Newman, A.H., Cha, J.H., Gether, U., Wang, H., and Abeliovich, A. (2006). Cooperative transcription activation by *Nurr1* and *Pitx3* induces embryonic stem cell maturation to the midbrain dopamine neuron phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 2874-2879.
- Matsunaga, E., Katahira, T., and Nakamura, H. (2002). Role of *Lmx1b* and *Wnt1* in mesencephalon and metencephalon development. *Development* 129, 5269-5277.
- Maya-Espinosa, G., Collazo-Navarrete, O., Millan-Aldaco, D., Palomero-Rivero, M., Guerrero-Flores, G., Drucker-Colin, R., Covarrubias, L., and Guerra-Crespo, M. (2015). Mouse embryonic stem cell-derived cells reveal niches that support neuronal differentiation in the adult rat brain. *Stem Cells* 33, 491-502.
- Metzakopian, E., Lin, W., Salmon-Divon, M., Dvinge, H., Andersson, E., Ericson, J., Perlmann, T., Whitsett, J.A., Bertone, P., and Ang, S.L. (2012). Genome-wide characterization of *Foxa2* targets reveals upregulation of floor plate genes and repression of ventrolateral genes in midbrain dopaminergic progenitors. *Development* 139, 2625-2634.
- Meyer, A.K., Jarosch, A., Schurig, K., Nuesslein, I., Kissenkotter, S., and Storch, A. (2012). Fetal mouse mesencephalic NPCs generate dopaminergic neurons from post-mitotic precursors and maintain long-term neural but not dopaminergic potential in vitro. *Brain Res* 1474, 8-18.
- Mizuguchi, R., Sugimori, M., Takebayashi, H., Kosako, H., Nagao, M., Yoshida, S., Nabeshima, Y., Shimamura, K., and Nakafuku, M. (2001). Combinatorial roles of *olig2* and *neurogenin2* in the coordinated induction of pan-neuronal and subtype-specific properties of motoneurons. *Neuron* 31, 757-771.
- Moellering, R.E., Cornejo, M., Davis, T.N., Del Bianco, C., Aster, J.C., Blacklow, S.C., Kung, A.L., Gilliland, D.G., Verdine, G.L., and Bradner, J.E. (2009). Direct inhibition of the NOTCH transcription factor complex. *Nature* 462, 182-188.
- Molne, M., Studer, L., Tabar, V., Ting, Y.T., Eiden, M.V., and McKay, R.D. (2000). Early cortical precursors do not undergo LIF-mediated astrocytic differentiation. *J Neurosci Res* 59, 301-311.
- Morrow, T., Song, M.R., and Ghosh, A. (2001). Sequential specification of neurons and glia by developmentally regulated extracellular factors. *Development* 128, 3585-3594.
- Nakatani, T., Kumai, M., Mizuhara, E., Minaki, Y., and Ono, Y. (2010). *Lmx1a* and *Lmx1b* cooperate with *Foxa2* to coordinate the specification of dopaminergic neurons and control of floor plate cell differentiation in the developing mesencephalon. *Dev Biol* 339, 101-113.
- Nakatani, T., Minaki, Y., Kumai, M., and Ono, Y. (2007). *Helt* determines GABAergic over glutamatergic neuronal fate by repressing *Ngn* genes in the developing mesencephalon. *Development* 134, 2783-2793.
- Namihira, M., Kohyama, J., Semi, K., Sanosaka, T., Deneen, B., Taga, T., and Nakashima, K. (2009). Committed neuronal precursors confer astrocytic potential on residual neural precursor cells. *Dev Cell* 16, 245-255.

- Neophytou, C., Vernallis, A.B., Smith, A., and Raff, M.C. (1997). Muller-cell-derived leukaemia inhibitory factor arrests rod photoreceptor differentiation at a postmitotic pre-rod stage of development. *Development* *124*, 2345-2354.
- Nieto, M., Schuurmans, C., Britz, O., and Guillemot, F. (2001). Neural bHLH genes control the neuronal versus glial fate decision in cortical progenitors. *Neuron* *29*, 401-413.
- Nunes, I., Tovmasian, L.T., Silva, R.M., Burke, R.E., and Goff, S.P. (2003). Pitx3 is required for development of substantia nigra dopaminergic neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* *100*, 4245-4250.
- Ohtsuka, T., Ishibashi, M., Gradwohl, G., Nakanishi, S., Guillemot, F., and Kageyama, R. (1999). Hes1 and Hes5 as notch effectors in mammalian neuronal differentiation. *EMBO J* *18*, 2196-2207.
- Okano, H., and Temple, S. (2009). Cell types to order: temporal specification of CNS stem cells. *Curr Opin Neurobiol* *19*, 112-119.
- Olsson, M., Bjerregaard, K., Winkler, C., Gates, M., Bjorklund, A., and Campbell, K. (1998). Incorporation of mouse neural progenitors transplanted into the rat embryonic forebrain is developmentally regulated and dependent on regional and adhesive properties. *Eur J Neurosci* *10*, 71-85.
- Olsson, M., Campbell, K., and Turnbull, D.H. (1997). Specification of mouse telencephalic and mid-hindbrain progenitors following heterotopic ultrasound-guided embryonic transplantation. *Neuron* *19*, 761-772.
- Omodei, D., Acampora, D., Mancuso, P., Prakash, N., Di Giovannantonio, L.G., Wurst, W., and Simeone, A. (2008). Anterior-posterior graded response to Otx2 controls proliferation and differentiation of dopaminergic progenitors in the ventral mesencephalon. *Development* *135*, 3459-3470.
- Ono, Y., Nakatani, T., Minaki, Y., and Kumai, M. (2010). The basic helix-loop-helix transcription factor Nato3 controls neurogenic activity in mesencephalic floor plate cells. *Development* *137*, 1897-1906.
- Ono, Y., Nakatani, T., Sakamoto, Y., Mizuhara, E., Minaki, Y., Kumai, M., Hamaguchi, A., Nishimura, M., Inoue, Y., Hayashi, H., *et al.* (2007). Differences in neurogenic potential in floor plate cells along an anteroposterior location: midbrain dopaminergic neurons originate from mesencephalic floor plate cells. *Development* *134*, 3213-3225
- Osumi, N., Shinohara, H., Numayama-Tsuruta, K., and Maekawa, M. (2008). Concise review: Pax6 transcription factor contributes to both embryonic and adult neurogenesis as a multifunctional regulator. *Stem Cells* *26*, 1663-1672.
- Packer, A.N., Xing, Y., Harper, S.Q., Jones, L., and Davidson, B.L. (2008). The bifunctional microRNA miR-9/miR-9* regulates REST and CoREST and is downregulated in Huntington's disease. *J Neurosci* *28*, 14341-14346.
- Pajvani, U.B., Qiang, L., Kangsamaksin, T., Kitajewski, J., Ginsberg, H.N., and Accili, D. (2013). Inhibition of Notch uncouples Akt activation from hepatic lipid accumulation by decreasing mTorc1 stability. *Nat Med* *19*, 1054-1060.
- Panchision, D.M., and McKay, R.D. (2002). The control of neural stem cells by morphogenic signals. *Curr Opin Genet Dev* *12*, 478-487.

- Parmar, M., Skogh, C., Bjorklund, A., and Campbell, K. (2002). Regional specification of neurosphere cultures derived from subregions of the embryonic telencephalon. *Mol Cell Neurosci* 21, 645-656.
- Peterson, D. (2002). Stem cells in brain plasticity and repair. *Neuroscience* 2, 34-42.
- Pierfelice, T., Alberi, L., and Gaiano, N. (2011). Notch in the vertebrate nervous system: an old dog with new tricks. *Neuron* 69, 840-855.
- Placzek, M., and Briscoe, J. (2005). The floor plate: multiple cells, multiple signals. *Nat Rev Neurosci* 6, 230-240.
- Prakash, N., Brodski, C., Naserke, T., Puelles, E., Gogoi, R., Hall, A., Panhuysen, M., Echevarria, D., Sussel, L., Weisenhorn, D.M., *et al.* (2006). A Wnt1-regulated genetic network controls the identity and fate of midbrain-dopaminergic progenitors in vivo. *Development* 133, 89-98.
- Puelles, E., Annino, A., Tuorto, F., Usiello, A., Acampora, D., Czerny, T., Brodski, C., Ang, S.-L., Wurst, W., and Simeone, A. (2004). Otx2 regulates the extent, identity and fate of neural progenitor domains in the ventral midbrain. *Development* 131, 2037-2048.
- Qian, X., Shen, Q., Goderie, S.K., He, W., Capela, A., Davis, A.A., and Temple, S. (2000). Timing of CNS cell generation: a programmed sequence of neuron and glial cell production from isolated murine cortical stem cells. *Neuron* 28, 69-80.
- Reynolds, B.A., Tetzlaff, W., and Weiss, S. (1992). A multipotent EGF-responsive striatal embryonic progenitor cell produces neurons and astrocytes. *J Neurosci* 12, 4565-4574.
- Roelink, H., Porter, J.A., Chiang, C., Tanabe, Y., Chang, D.T., Beachy, P.Q., and Jessell, T.M. (1995). Floor plate and motor neuron induction by different concentrations of amino-terminal cleavage product of sonic hedgehog autoproteolysis. *Cell* 81, 445-455.
- Rowitch, D.H., and Kriegstein, A.R. (2010). Developmental genetics of vertebrate glial-cell specification. *Nature* 468, 214-222.
- Roybon, L., Hjalt, T., Christophersen, N.S., Li, J.Y., and Brundin, P. (2008). Effects on differentiation of embryonic ventral midbrain progenitors by Lmx1a, Msx1, Ngn2, and Pitx3. *J Neurosci* 28, 3644-3656.
- Saarimaki-Vire, J., Peltopuro, P., Lahti, L., Naserke, T., Blak, A.A., Vogt Weisenhorn, D.M., Yu, K., Ornitz, D.M., Wurst, W., and Partanen, J. (2007). Fibroblast growth factor receptors cooperate to regulate neural progenitor properties in the developing midbrain and hindbrain. *J Neurosci* 27, 8581-8592.
- Sacchetti, P., Sousa, K.M., Hall, A.C., Liste, I., Steffensen, K.R., Theofilopoulos, S., Parish, C.L., Hazenberg, C., Richter, L.A., Hovatta, O., *et al.* (2009). Liver X receptors and oxysterols promote ventral midbrain neurogenesis in vivo and in human embryonic stem cells. *Cell Stem Cell* 5, 409-419.
- Sahara, S., and O'Leary, D.D. (2009). Fgf10 regulates transition period of cortical stem cell differentiation to radial glia controlling generation of neurons and basal progenitors. *Neuron* 63, 48-62.
- Sakakibara, S., Nakamura, Y., Yoshida, T., Shibata, S., Koike, M., Takano, H., Ueda, S., Uchiyama, Y., Noda, T., and Okano, H. (2002). RNA-binding protein Musashi family: roles for CNS stem cells and a subpopulation of ependymal cells revealed by targeted disruption and antisense ablation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 15194-15199.

- Sansom, S.N., Griffiths, D.S., Faedo, A., Kleinjan, D.J., Ruan, Y., Smith, J., van Heyningen, V., Rubenstein, J.L., and Livesey, F.J. (2009). The level of the transcription factor Pax6 is essential for controlling the balance between neural stem cell self-renewal and neurogenesis. *PLoS Genet* 5, e1000511.
- Santa-Olalla, J., Baizabal, J.M., Fregoso, M., del Carmen Cardenas, M., and Covarrubias, L. (2003). The in vivo positional identity gene expression code is not preserved in neural stem cells grown in culture. *Eur J Neurosci* 18, 1073-1084.
- Sardi, S.P., Murtie, J., Koirala, S., Patten, B.A., and Corfas, G. (2006). Presenilin-dependent ErbB4 nuclear signaling regulates the timing of astrogenesis in the developing brain. *Cell* 127, 185-197.
- Sasaki, H., Hui, C., Nakafuku, M., and Kondoh, H. (1997). A binding site for Gli proteins is essential for HNF-3beta floor plate enhancer activity in transgenics and can respond to Shh in vitro. *Development* 124, 1313-1322.
- Saucedo-Cardenas, O., Quintana-Hau, J.D., Le, W.D., Smidt, M.P., Cox, J.J., De Mayo, F., Burbach, J.P., and Conneely, O.M. (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, 4013-4018.
- Schultz, J.R., Tu, H., Luk, A., Repa, J.J., Medina, J.C., Li, L., Schwendner, S., Wang, S., Thoolen, M., Mangelsdorf, D.J., *et al.* (2000). Role of LXRs in control of lipogenesis. *Genes Dev* 14, 2831-2838.
- Shen, Q., Wang, Y., Dimos, J.T., Fasano, C.A., Phoenix, T.N., Lemischka, I.R., Ivanova, N.B., Stifani, S., Morrisey, E.E., and Temple, S. (2006). The timing of cortical neurogenesis is encoded within lineages of individual progenitor cells. *Nat Neurosci* 9, 743-751.
- Shimojo, H., Ohtsuka, T., and Kageyama, R. (2008). Oscillations in notch signaling regulate maintenance of neural progenitors. *Neuron* 58, 52-64.
- Simon, H.H., Saueressig, H., Wurst, W., Goulding, M.D., and O'Leary, D.D. (2001). Fate of midbrain dopaminergic neurons controlled by the engrailed genes. *J Neurosci* 21, 3126-3134.
- Simon, H.H., Thuret, S., and Alberi, L. (2004). Midbrain dopaminergic neurons: control of their cell fate by the engrailed transcription factors. *Cell Tissue Res* 318, 53-61.
- Singh, N., Gupta, M., Trivedi, C.M., Singh, M.K., Li, L., and Epstein, J.A. (2013). Murine craniofacial development requires Hdac3-mediated repression of Msx gene expression. *Dev Biol* 377, 333-344.
- Smidt, M.P., Asbreuk, C.H., Cox, J.J., Chen, H., Johnson, R.L., and Burbach, J.P. (2000). A second independent pathway for development of mesencephalic dopaminergic neurons requires Lmx1b. *Nat Neurosci* 3, 337-341.
- Smidt, M.P., Smits, S.M., Bouwmeester, H., Hamers, F.P., van der Linden, A.J., Hellemons, A.J., Graw, J., and Burbach, J.P. (2004). Early developmental failure of substantia nigra dopamine neurons in mice lacking the homeodomain gene Pitx3. *Development* 131, 1145-1155.
- Smith, J.L., and Schoenwolf, G.C. (1997). Neurulation: coming to closure. *Trends Neurosci* 20, 510-517.

- Smits, S.M., Ponnio, T., Conneely, O.M., Burbach, J.P., and Smidt, M.P. (2003). Involvement of Nurr1 in specifying the neurotransmitter identity of ventral midbrain dopaminergic neurons. *Eur J Neurosci* 18, 1731-1738.
- Song, M.R., and Ghosh, A. (2004). FGF2-induced chromatin remodeling regulates CNTF-mediated gene expression and astrocyte differentiation. *Nat Neurosci* 7, 229-235.
- Sonntag, K.C., Simantov, R., Kim, K.S., and Isacson, O. (2004). Temporally induced Nurr1 can induce a non-neuronal dopaminergic cell type in embryonic stem cell differentiation. *Eur J Neurosci* 19, 1141-1152.
- Stott, S.R., Metzakopian, E., Lin, W., Kaestner, K.H., Hen, R., and Ang, S.L. (2013). Foxa1 and foxa2 are required for the maintenance of dopaminergic properties in ventral midbrain neurons at late embryonic stages. *J Neurosci* 33, 8022-8034.
- Sun, Y., Nadal-Vicens, M., Misono, S., Lin, M.Z., Zubiaga, A., Hua, X., Fan, G., and Greenberg, M.E. (2001). Neurogenin promotes neurogenesis and inhibits glial differentiation by independent mechanisms. *Cell* 104, 365-376.
- Takahashi, T., Nowakowski, R.S., and Caviness, V.S., Jr. (1993). Cell cycle parameters and patterns of nuclear movement in the neocortical proliferative zone of the fetal mouse. *J Neurosci* 13, 820-833.
- Takizawa, T., Nakashima, K., Namihira, M., Ochiai, W., Uemura, A., Yanagisawa, M., Fujita, N., Nakao, M., and Taga, T. (2001). DNA methylation is a critical cell-intrinsic determinant of astrocyte differentiation in the fetal brain. *Dev Cell* 1, 749-758.
- Taverna, E., and Huttner, W.B. (2010). Neural progenitor nuclei IN motion. *Neuron* 67, 906-914.
- Temple, S. (2001). The development of neural stem cells. *Nature* 414, 112-117.
- Theofilopoulos, S., Wang, Y., Kitambi, S.S., Sacchetti, P., Sousa, K.M., Bodin, K., Kirk, J., Salto, C., Gustafsson, M., Toledo, E.M., *et al.* (2013). Brain endogenous liver X receptor ligands selectively promote midbrain neurogenesis. *Nat Chem Biol* 9, 126-133.
- Thompson, L.H., Andersson, E., Jensen, J.B., Barraud, P., Guillemot, F., Parmar, M., and Bjorklund, A. (2006). Neurogenin2 identifies a transplantable dopamine neuron precursor in the developing ventral mesencephalon. *Exp Neurol* 198, 183-198.
- Tieng, V., Stoppini, L., Villy, S., Fathi, M., Dubois-Dauphin, M., and Krause, K.H. (2014). Engineering of midbrain organoids containing long-lived dopaminergic neurons. *Stem Cells Dev* 23, 1535-1547.
- Toledo, E.M., La Manno, G., Rivetti di Val Cervo, P., Gyllborg, D., Islam, S., Villaescusa, C., Linnarsson, S., and Arenas, E. (2017). Molecular analysis of the midbrain dopaminergic niche during neurogenesis. *bioRxiv*.
- Trujillo-Paredes, N., Valencia, C., Guerrero-Flores, G., Arzate, D.M., Baizabal, J.M., Guerra-Crespo, M., Fuentes-Hernandez, A., Zea-Armenta, I., and Covarrubias, L. (2016). Regulation of differentiation flux by Notch signalling influences the number of dopaminergic neurons in the adult brain. *Biol Open* 5, 336-347.
- van den Munckhof, P., Luk, K.C., Ste-Marie, L., Montgomery, J., Blanchet, P.J., Sadikot, A.F., and Drouin, J. (2003). Pitx3 is required for motor activity and for survival of a subset of midbrain dopaminergic neurons. *Development* 130, 2535-2542.

- Visvanathan, J., Lee, S., Lee, B., Lee, J.W., and Lee, S.K. (2007). The microRNA miR-124 antagonizes the anti-neural REST/SCP1 pathway during embryonic CNS development. *Genes Dev* 21, 744-749.
- Volpicelli, F., Caiazzo, M., Greco, D., Consales, C., Leone, L., Perrone-Capano, C., Colucci D'Amato, L., and di Porzio, U. (2007). Bdnf gene is a downstream target of Nurr1 transcription factor in rat midbrain neurons in vitro. *J Neurochem* 102, 441-453.
- Volpicelli, F., De Gregorio, R., Pulcrano, S., Perrone-Capano, C., di Porzio, U., and Bellenchi, G.C. (2012). Direct regulation of Pitx3 expression by Nurr1 in culture and in developing mouse midbrain. *PLoS One* 7, e30661.
- von Bohlen und Halbach, O., Schober, A., and Krieglstein, K. (2004). Genes, proteins, and neurotoxins involved in Parkinson's disease. *Prog Neurobiol* 73, 151-177.
- Walcher, T., Xie, Q., Sun, J., Irmeler, M., Beckers, J., Ozturk, T., Niessing, D., Stoykova, A., Cvekl, A., Ninkovic, J., *et al.* (2013). Functional dissection of the paired domain of Pax6 reveals molecular mechanisms of coordinating neurogenesis and proliferation. *Development* 140, 1123-1136.
- Wallen, A., and Perlmann, T. (2003). Transcriptional control of dopamine neuron development. *Ann N Y Acad Sci* 991, 48-60.
- Wey, A., and Knoepfler, P.S. (2010). c-myc and N-myc promote active stem cell metabolism and cycling as architects of the developing brain. *Oncotarget* 1, 120-130.
- Wichterle, H., Lieberam, I., Porter, J.A., and Jessell, T.M. (2002). Directed differentiation of embryonic stem cells into motor neurons. *Cell* 10, 385-397.
- Wilczynska, K.M., Singh, S.K., Adams, B., Bryan, L., Rao, R.R., Valerie, K., Wright, S., Griswold-Prenner, I., and Kordula, T. (2009). Nuclear factor I isoforms regulate gene expression during the differentiation of human neural progenitors to astrocytes. *Stem Cells* 27, 1173-1181.
- Wong, R.H., Chang, I., Hudak, C.S., Hyun, S., Kwan, H.Y., and Sul, H.S. (2009). A role of DNA-PK for the metabolic gene regulation in response to insulin. *Cell* 136, 1056-1072.
- Wurst, W., and Bally-Cuif, L. (2001). Neural plate patterning: upstream and downstream of the isthmus organizer. *Nat Rev Neurosci* 2, 99-108.
- Xuan, S., Baptista, C.A., Balas, G., Tao, W., Soares, V.C., and Lai, E. (1995). Winged helix transcription factor BF-1 is essential for the development of the cerebral hemispheres. *Neuron* 14, 1141-1152.
- Yamada, T., Placzek, M., Tanaka, H., Dodd, J., and Jessell, T.M. (1991). Control of cell pattern in the developing nervous system: polarizing activity of the floor plate and notochord. *Cell* 64, 635-647.
- Yan, J., Studer, L., and McKay, R.D. (2001). Ascorbic acid increases the yield of dopaminergic neurons derived from basic fibroblast growth factor expanded mesencephalic precursors. *J Neurochem* 76, 307-311.
- Yang, X., Tomita, T., Wines-Samuels, M., Beglopoulos, V., Tansey, M.G., Kopan, R., and Shen, J. (2006). Notch1 signaling influences v2 interneuron and motor neuron development in the spinal cord. *Dev Neurosci* 28, 102-117.
- Ye, W., Shimamura, K., Rubenstein, J.L., Hynes, M.A., and Rosenthal, A. (1998). FGF and Shh signals control dopaminergic and serotonergic cell fate in the anterior neural plate. *Cell* 93, 755-766.

- Yin, M., Liu, S., Yin, Y., Li, S., Li, Z., Wu, X., Zhang, B., Ang, S.L., Ding, Y., and Zhou, J. (2009). Ventral mesencephalon-enriched genes that regulate the development of dopaminergic neurons in vivo. *J Neurosci* 29, 5170-5182.
- Yoo, A.S., Staahl, B.T., Chen, L., and Crabtree, G.R. (2009). MicroRNA-mediated switching of chromatin-remodelling complexes in neural development. *Nature* 460, 642-646.
- Yun, K., Fischman, S., Johnson, J., Hrabe de Angelis, M., Weinmaster, G., and Rubenstein, J.L. (2002). Modulation of the notch signaling by Mash1 and Dlx1/2 regulates sequential specification and differentiation of progenitor cell types in the subcortical telencephalon. *Development* 129, 5029-5040.
- Zetterstrom, R.H., Solomin, L., Jansson, L., Hoffer, B.J., Olson, L., and Perlmann, T. (1997). Dopamine neuron agenesis in Nurr1-deficient mice. *Science* 276, 248-250.
- Zhong, W., and Chia, W. (2008). Neurogenesis and asymmetric cell division. *Curr Opin Neurobiol* 18, 4-11.
- Zinin, N., Adameyko, I., Wilhelm, M., Fritz, N., Uhlen, P., Ernfors, P., and Henriksson, M.A. (2014). MYC proteins promote neuronal differentiation by controlling the mode of progenitor cell division. *EMBO Rep* 15, 383-391.

RESEARCH ARTICLE

Regulation of differentiation flux by Notch signalling influences the number of dopaminergic neurons in the adult brain

Niurka Trujillo-Paredes^{1,*}, Concepción Valencia^{1,*}, Gilda Guerrero-Flores^{1,*}, Dulce-María Arzate¹, José-Manuel Baizabal¹, Magdalena Guerra-Crespo², Ayari Fuentes-Hernández³, Iván Zea-Armenta³ and Luis Covarrubias^{1,†}

ABSTRACT

Notch signalling is a well-established pathway that regulates neurogenesis. However, little is known about the role of Notch signalling in specific neuronal differentiation. Using *Dll1* null mice, we found that Notch signalling has no function in the specification of mesencephalic dopaminergic neural precursor cells (NPCs), but plays an important role in regulating their expansion and differentiation into neurons. Premature neuronal differentiation was observed in mesencephalons of *Dll1*-deficient mice or after treatment with a Notch signalling inhibitor. Coupling between neurogenesis and dopaminergic differentiation was indicated from the coincident emergence of neuronal and dopaminergic markers. Early in differentiation, decreasing Notch signalling caused a reduction in NPCs and an increase in dopaminergic neurons in association with dynamic changes in the proportion of sequentially-linked dopaminergic NPCs (*Msx1/2+*, *Ngn2+*, *Nurr1+*). These effects in differentiation caused a significant reduction in the number of dopaminergic neurons produced. Accordingly, *Dll1* haploinsufficient adult mice, in comparison with their wild-type littermates, have a consistent reduction in neuronal density that was particularly evident in the substantia nigra pars compacta. Our results are in agreement with a mathematical model based on a *Dll1*-mediated regulatory feedback loop between early progenitors and their dividing precursors that controls the emergence and number of dopaminergic neurons.

KEY WORDS: Delta-like 1, Notch, Neurogenesis, Dopaminergic neurons

INTRODUCTION

At the cellular level, early embryogenesis involves stem and progenitor cell proliferation followed by their exit from the cell cycle and concurrent differentiation into specific cell types. In this context, the size and shape of the nervous system largely depend on the number of times that a neural stem cell (NSC) or its progeny re-enters the cell cycle. Importantly, timing of cell differentiation may also influence cell fate choice, given the fact that NSCs appear to change their potential over time throughout development (Bassett and

Wallace, 2012; Okano and Temple, 2009). In particular, it has been shown that specific cortical neurons arise at a different developmental time, suggesting that specification is associated with the time of birth (Okano and Temple, 2009; Shen et al., 2006). Nonetheless, it is still unclear how cell differentiation timing influences cell fate choice and the histogenesis of specific brain regions.

The evolutionarily conserved Notch signalling pathway mediates cell-cell interactions that regulate the process of differentiation of neighbouring cells, providing a mechanism for consistent cell fate determination and patterning in time and space of highly organized tissues (Louvi and Artavanis-Tsakonas, 2006; Pierfelice et al., 2011). Notch is a family of transmembrane receptors that are activated by transmembrane ligands such as Delta-like (*Dll1*, *Dll3* and *Dll4*) and Jagged (*Jag1* and *Jag2*) in mammals. Upon activation, the Notch intracellular domain (NICD) is released and translocated to the nucleus, where forms a complex with the DNA-binding protein RBPj (Pierfelice et al., 2011). In the CNS of mammals, the NICD-RBPj complex induces the expression of *Hes1* and *Hes5*, genes encoding basic helix-loop-helix transcription factors that, in turn, can repress the expression of pro-neural genes (including Notch ligand genes), thereby inhibiting neuronal differentiation and maintaining the pool of neural precursor cells (NPC) (Ohtsuka et al., 1999). Blocking this pathway at different levels causes premature differentiation of NPC resulting in reduction in the number and spectrum of neuron types (Hatakeyama et al., 2004; Louvi and Artavanis-Tsakonas, 2006; Ohtsuka et al., 1999). Thus, Notch signalling appears to be an essential component of the mechanisms that lead to the production of the neuronal diversity characteristic of the brain starting from apparently equivalent NSCs.

Despite the above, very little is known about the role of Notch signalling in the generation of specific brain regions and/or neuron types. In the developing midbrain, *Notch1*, *2*, *3*, *Dll1* and *Jag1* are expressed in the ventricular zone (Lindsell et al., 1996). *Notch1* and *Notch2* in rodents are essential genes (Conlon et al., 1995; Swiatek et al., 1994) but, while *Notch2* appears mainly involved in diencephalon and mesencephalon roof plate development (Kadokawa and Marunouchi, 2002), conditional *Notch1* deletion along the midbrain-hindbrain region results in the premature onset of neurogenesis (Lütolf et al., 2002). *Dll1* and *Dll4* are also essential genes in early mouse development (Duarte et al., 2004; Hrabě de Angelis et al., 1997); *Dll1*, in addition to be transiently expressed during gastrulation and early organogenesis, during CNS development is expressed in most of the neural tube (Bettenhausen et al., 1995). Interestingly, in contrast with other brain regions, the mesencephalic floor plate (FP) expresses *Dll1* (Ono et al., 2007), which associates with the peculiar neurogenic activity of this region (Joksimovic et al., 2009; Ono et al., 2007). Gene expression patterns and NPC differentiation potential of cells in the mesencephalic ventral midline (Lin et al., 2009; Ono et al., 2007) as well as fate mapping

¹Departamento de Genética y Fisiología Molecular, Instituto de Biotecnología, Cuernavaca, Morelos 62210, México. ²Departamento de Neuropatología Molecular, Instituto de Fisiología Celular, Coyoacán, Ciudad de México 04510, México. ³Centro de Ciencias Genómicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos 62210, México.

*These authors contributed equally to this work

†Author for correspondence (covs@ibtl.unam.mx)

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0>), which permits unrestricted use, distribution and reproduction in any medium provided that the original work is properly attributed.

Received 10 July 2015; Accepted 22 January 2016

experiments (Kittappa et al., 2007) indicate that mesencephalic dopaminergic neurons originate from precursors within the FP. Therefore, *Dll1* may play a role in the positioning, maintenance, and patterning of dopaminergic neurons and their NPCs.

Dopaminergic differentiation is characterized by the sequential expression of genes encoding certain transcription factors (e.g. *En2*, *Otx2*, *Foxa2*, *Lmx1a*, *Msx1*, *Ngn2*, *Nurr1*, *Pitx3*), which are downstream targets of extrinsic signals such as *Shh*, *Fgf8* and *Wnt1* (for a review see: Abeliovich and Hammond, 2007; Ang, 2006; Guerrero-Flores and Covarrubias, 2011; Hegarty et al., 2013). These transcription factors regulate the transition between different cell populations along the ventricular-alar axis of the developing ventral mesencephalon. Interestingly, *Ngn2* and *Mash1*, recognized as proneural transcription factors, control the expression of *Dll1* and, in consequence, also of some genes associated with Notch signalling, such as *Hes5* (Castro et al., 2006; Kele et al., 2006).

Regulation of expression of Notch signalling genes has been studied in association with mesencephalic dopaminergic differentiation (Castro et al., 2006; Deng et al., 2011; Kele et al., 2006; Ono et al., 2007); however, in contrast, little is known about how Notch signalling regulates dopaminergic differentiation. In this study, we investigated the function of Notch signalling in the control of dopaminergic neurogenesis and the number of dopaminergic neurons produced.

RESULTS AND DISCUSSION

Dll1 and *Hes5* are key mediators of Notch signalling in the mesencephalic dopaminergic niche

Dll1 transcript distribution in the developing mesencephalon has been previously determined by *in situ* hybridization; however, probably due to the quantitative limitations of this technique, the expression pattern has not been well defined showing scattered distribution with an apparent higher number of positive cells towards the subventricular area (Deng et al., 2011; Kele et al., 2006; Lahti et al., 2011). Here, we estimated *Dll1* transcript distribution by *in situ* determination of *lacZ* activity in *Dll1^{+/lacZ}* mouse embryos, particularly at the initiation of dopaminergic differentiation. In the mesencephalon of embryonic day (E)10.5 and E11.5 embryos, *Dll1* expression occurred mainly in the subventricular area with the highest levels found in the ventral half. Particularly in the dopaminergic niche at E10.5, the floor plate showed a thin layer of *lacZ*-stained cells just below the ventricular epithelium, which contrast with the pattern in the hindbrain (Fig. 1A). In E11.5 mesencephalons, a wider subventricular area of *Dll1* expression was found around the ventral midline, corresponding to the location of intermediate progenitors, (Fig. 1A). At this latter stage, the ventral mesencephalon contained higher mRNA levels of *Dll1* than of *Dll3* or *Dll4*, whereas those of *Notch1* and *Notch2* were similar (Fig. 1B). In order to determine whether *Dll1* is responsible for most Notch signalling occurring in the floor plate of mesencephalon in association with dopaminergic neuron differentiation, we compared the expression levels of two Notch effector genes, *Hes1* and *Hes5*, in the ventral mesencephalon of E11.5 embryos lacking *Dll1*. Both *Hes1* and *Hes5* were expressed in wild-type samples, but the latter was apparently more than 100-fold more abundant than the former (Fig. 1B). Interestingly, the complete absence of *Dll1* levels caused a corresponding near 30-fold reduction in *Hes5* expression, whereas *Hes1* expression was only partially (about half) affected (Fig. 1C). In agreement with this conclusion, developmental downregulation of *Dll1* expression from E11.5 to E15.5 was best correlated with the expression level of *Hes5* (Fig. 1B). Therefore, *Dll1* and *Hes5* are the major upstream and downstream mediators, respectively, of Notch signalling in the developing ventral mesencephalon.

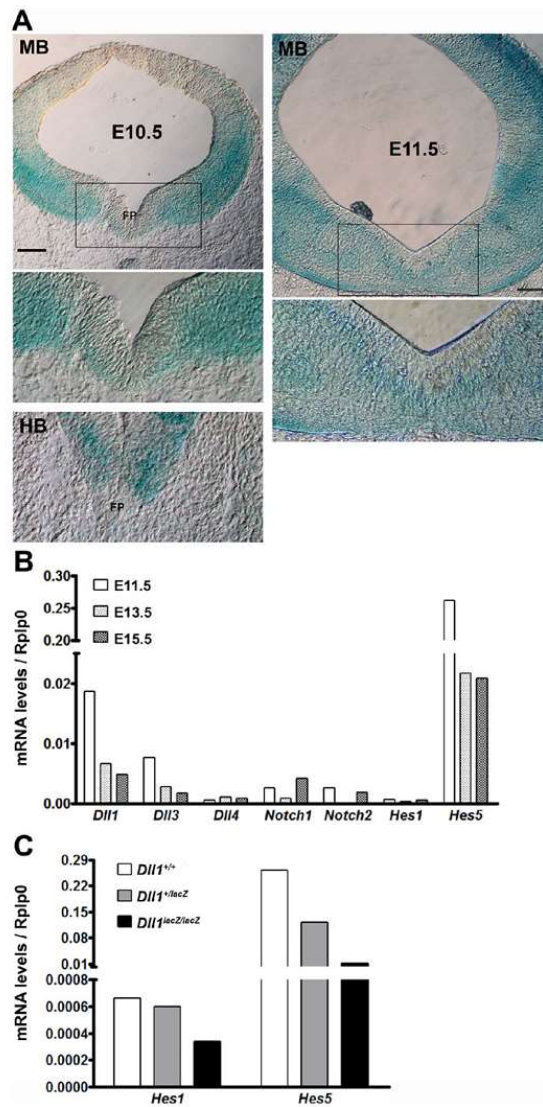


Fig. 1. *Dll1*-Notch signalling in the mesencephalic dopaminergic niche. (A) Midbrains (MB) or hindbrains (HB) from *Dll1^{+/lacZ}* mouse embryos at the stage indicated were stained for the *lacZ* reporter and slices from them are shown. FP, floor plate. Scale bar is 100 μ m. (B) Total RNA was extracted from wild-type mouse embryos (pool of 10) at different stages (E11.5, E13.5 and E15.5) and the expression level of the genes indicated determined by RT-qPCR. Note that *Dll1* and *Dll3* followed a similar expression pattern that closely correlated with the pattern of *Hes5*. (C) *Hes1* and *Hes5* expression pattern was determined in E11.5 embryos with the genotype indicated. Note that *Hes5* markedly decreased (near 30-fold) in the absence of *Dll1*.

Reduced Notch signalling alters the number of dopaminergic precursor cells without affecting their specification

In order to determine whether Notch signalling has any role in maintaining the organization of the dopaminergic domain in the ventral mesencephalon, we compared the distribution pattern of *Lmx1a* and *Foxa2* in *Dll1^{+/+}* and *Dll1^{lacZ/lacZ}* embryos. We also

determined the distribution pattern of Nkx6.1; the gene encoding this transcription factor is expressed lateral to the *Lmx1a* expression domain and is repressed in dopaminergic NPCs after proper specification (Andersson et al., 2006b; Nakatani et al., 2010). Specification of dopaminergic NPC occurs between E9-E10 and neuronal differentiation markers start to be detected from E11 with a peak between E12 and E13 (Ang, 2006). *Dll1* null mouse embryos die by E12 (Hrabě de Angelis et al., 1997, and our own observations), therefore, we limited the *in vivo* studies up to E11.5, stage at which most embryos are still alive though abnormalities were evident (Fig. S1). As shown in Fig. 2, the distribution pattern of *Lmx1a*, *Foxa2* and *Nkx6.1* is similar in midbrains of *Dll1*^{+/+} and *Dll1*^{lacZ/lacZ} embryos at E10.5 and E11.5; however, at E11.5, although restricted distribution of each protein was still observed, the tissue seemed disorganized and fragile with fewer cells *Lmx1a*⁺ and *Foxa2*⁺ in mesencephalons of mutant than in those of wild-type embryos (Fig. 2B). Note, that within each specific expression domain, a high proportion of cells contained the corresponding marker (Fig. 2B), indicating that the decrease in number of presumably specified cells in mesencephalons of mice lacking *Dll1* is not due to a failure in maintaining the mesencephalic dopaminergic fate. In agreement with these observations, *Lmx1a* and *Foxa2* mRNA levels were similar in ventral mesencephalons of *Dll1*^{+/+} and *Dll1*^{lacZ/lacZ} embryos at E11.5 (Fig. 2C). Interestingly, consistent *Lmx1a* up-regulation was observed in *Dll1*^{+/lacZ} embryos between E13.5 and E15.5 (Fig. 2C). Since *Lmx1a* mRNA levels increased after the rapid decrease in association with specification and differentiation, this latter effect was likely related to a *Lmx1a* function in neuronal maturation. Although less conspicuous, *Foxa2* expression at E13.5 showed a similar correlation (Fig. 2C; see also observations after Notch signalling inhibition in Fig. S2). Therefore, alterations in Notch signalling do not appear to affect dopaminergic niche specification.

The poor expansion of dopaminergic NPCs lacking *Dll1* correlates with the premature detection of neuronal markers

There was no evident increase in cell death around the midline in mutant embryos at E10.5 and, at E11.5 (Fig. S3A, left panels). In contrast, the thinner neural tube of mesencephalons of E11.5 *Dll1* null embryos correlated with a marked reduction in the number of cells that incorporated BrdU in comparison with the number observed in mesencephalons of wild-type embryos (Fig. S3A, right panels and Fig. S3B). These data suggest that, in the absence *Dll1*, the pool of ventral NPCs lining the ventricular zone of mesencephalon decreased due to a diminished capacity to proliferate and/or to a premature differentiation.

The typical radial distribution of NPCs (Nestin⁺ cells) was observed in *Dll1* deficient midbrains at E10.5 but was altered by E11.5 (Fig. 3A). Interestingly, the abundance and distribution of the immature neuronal marker β III-tubulin suggest that neurogenesis is at a more advance stage in the mesencephalons of *Dll1*^{lacZ/lacZ} embryos since E10.5, and became more evident by E11.5 in comparison with wild-type mesencephalons at an equivalent developmental stage (Fig. 3A). Marked reduction in Nestin⁺ cells and the extension of those β III-tubulin⁺ to the ventricular zone was observed at E11.5 in the ventral region of mesencephalons lacking *Dll1* (Fig. 3A). Of note was a pool of Nestin⁺ cells that were commonly detected around the midline in mutant mice; the identity of these cells remains to be determined (see Concluding remarks). Positive cells for NeuN, a mature neuronal marker, were not detected in the dopaminergic niche, even under the precocious differentiation observed in embryos lacking *Dll1* (data not shown and see below). An expression analysis of neurogenic genes in the

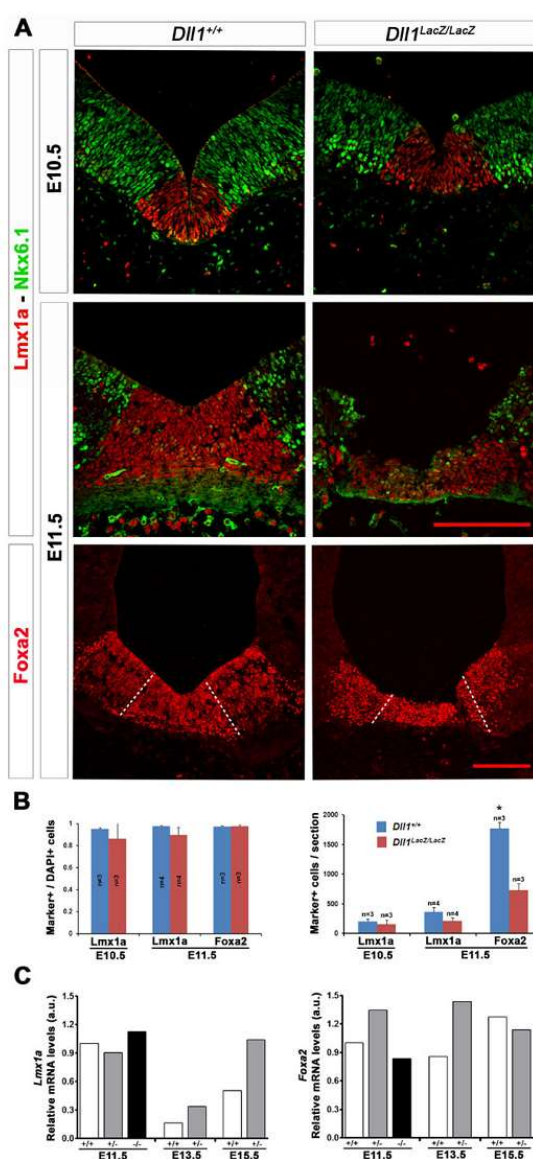


Fig. 2. Expression pattern of specification marker genes in the absence of *Dll1*. (A) The presence of *Lmx1a*, *Foxa2* and *Nkx6.1* was determined in sections of midbrain from E10.5 and E11.5 *Dll1*^{+/+} and *Dll1*^{lacZ/lacZ} mouse embryos. Scale bars are 200 μ m. (B) The proportion of cells within the domain expressing each specific gene was not affected by the absence of *Dll1*, but there was a marked reduction in the number of *Lmx1a*⁺ and *Foxa2*⁺ cells in midbrains of *Dll1* null mice at E11.5. Data represented as percentage of the total cell number (DAPI⁺ cells) \pm s.d.; *n*=5; **P*<0.05. (C) *Lmx1a* and *Foxa2* mRNA expression levels were consistent with the previous observations (i.e. same proportion of cells with the corresponding marker).

ventral mesencephalon of *Dll1*^{+/+}, *Dll1*^{+/lacZ} and *Dll1*^{lacZ/lacZ} embryos at E11.5 also supports premature neuronal differentiation with little or no marked alterations in the expression of genes associated with mature neurons (Fig. 3B). Of note was that, with the

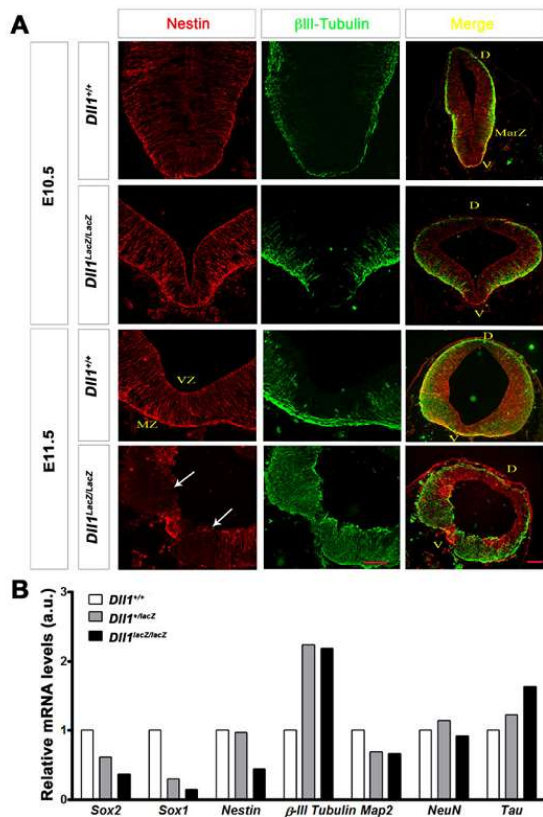


Fig. 3. Neuronal differentiation in developing midbrains in the presence or absence of *DII1*. (A) At E10.5, Nestin (red) cover most of the midbrain neuroepithelium and, although a significant amount of β III-tubulin started to be detected (green) in the marginal zone of samples from mutant embryos, this was not evident in the most ventral (V) or dorsal (D) area (upper panels); note that the lumen of midbrains from *DII1*^{lacZ/lacZ} embryos expanded earlier than that of midbrains from wild-type embryos. At E11.5, along with a reduction in Nestin⁺ cells, abundant β III-tubulin was detected in the ventral (V) area of midbrains from *DII1*^{lacZ/lacZ} embryos, which was distributed along the whole neuroepithelium thickness; a number of Nestin⁺ cells remained in the midline of most cases analysed. Arrows indicate the limits of the floor plate in a mutant sample. MarZ, marginal zone; VZ, ventricular zone; MZ, mantle zone. Scale bars are 200 μ m. (B) The observations in A were confirmed by determining the expression levels of neural precursor (*Sox1*, *Sox2*, *Nestin*) and neuronal (β III-tubulin, *Map2*, *NeuN*, *Tau*) genes in ventral midbrains of embryos with the *DII1* genotype indicated. Note that there was a no marked alteration in the expression of genes associated with mature neurons (*Map2*, *NeuN*, *Tau*).

exception of *Nestin* expression, the gene expression levels observed in ventral mesencephalons from *DII1*^{lacZ/lacZ} embryos were similar to those in samples from *DII1*^{+/lacZ} embryos.

Positive cells for Tyrosine hydroxylase (Th), a limiting enzyme in the synthesis of dopamine and one of the earliest markers of dopaminergic neurons, were detected at about the same time in wild-type and mutant tissues (E11.5), but their distribution in the latter samples resembled a more advanced developmental stage (i.e. E12.5) (Fig. 4A). In addition, cell quantification revealed a significant difference in the proportion of Th⁺ cells between mutant and control midbrain tissues at E11.5 (Fig. 4B). In agreement with the premature emergence of Th in mutant mice,

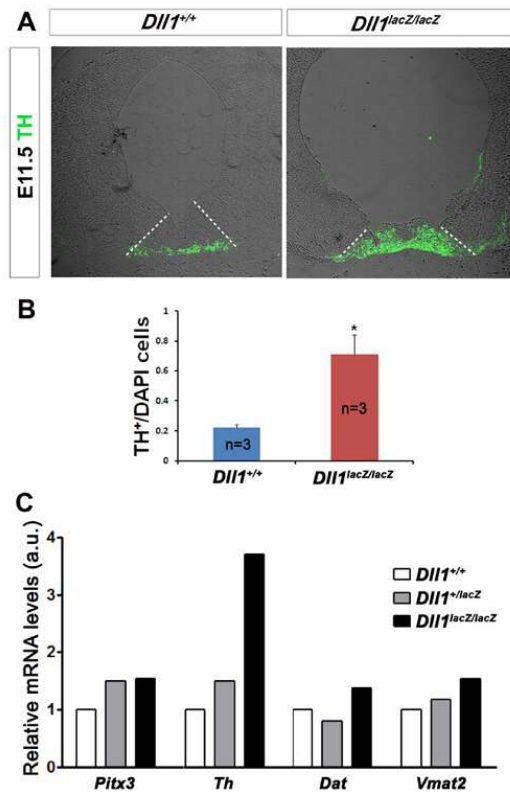


Fig. 4. Dopaminergic differentiation in developing midbrains in the presence or absence of *DII1*. Dopaminergic differentiation was determined by (A,B) detecting the cells containing tyrosine hydroxylase (Th), the limiting enzyme in dopamine synthesis, or the expression level of its gene (C) in ventral midbrains of E11.5 embryos with the genotype indicated. A significantly larger number of putative dopaminergic neurons were detected in samples from *DII1*^{lacZ/lacZ} in comparison with wild-type embryos (A,B), which positively correlated with the expression levels of *Th* but not of genes that are expressed in mature dopaminergic neurons (C). Scale bar is 100 μ m. White dotted lines indicate the limits of the dopaminergic domain (estimated by the area expressing *Lmx1a*). Data represented as percentage of the total cell number (DAPI⁺ cells) \pm s.d.; n=5; **P*<0.05.

Th mRNA levels were elevated in ventral mesencephalon of *DII1*^{lacZ/lacZ} embryos (Fig. 4C), in close similarity with the increase in β III-tubulin; a marginal increase was detected in heterozygous embryos. The mRNA levels of *Vmat* and *Dat*, markers of mature dopaminergic neurons, did not markedly change between the different genotypes at E11.5, probably because the analysis was done at an early stage of differentiation.

Mesencephalic explant cultures recapitulate the effects of Notch signalling deficiency on dopaminergic neuronal differentiation

It was not unexpected to find that the premature neuronal differentiation described above at E11.5 was not reflected in the expression of genes encoding proteins associated with mature neurons (e.g. *NeuN*). Since mesencephalic dopaminergic differentiation was not completed before *DII1*^{lacZ/lacZ} embryos die, we analysed the differentiation potential of mesencephalic NPCs in culture.

Explant cultures embedded in collagen allow dopaminergic differentiation to a stage resembling the distribution and number of dopaminergic neurons present in the mesencephalon of E14-E15 embryos (Baizabal and Covarrubias, 2009). In concordance with the observations in E11.5 embryos, *Dll1^{lacZ/lacZ}* mesencephalic explants cultured for 2 or 4 days showed a higher proportion of Th+ cells in comparison with equivalent samples from *Dll1^{+/+}* embryos. Most Th+ cells were NeuN+ in 2 days cultures of explants from embryos of either genotype, but fewer have this neuronal marker in

4 days cultures of *Dll1^{lacZ/lacZ}* explants than of wild type (Fig. 5A). This is reminiscent to the process observed in newly born dopaminergic neurons of embryos at E13.5, which are NeuN+ and lost this marker by E15.5 (see Fig. 7). Therefore, late phases of dopaminergic neurogenesis in the absence of Dll1 can be observed in explant cultures, which showed more advanced differentiation/maturation with respect to that occurring in wild-type explants.

In order to get more insights into the direct role of Notch signalling in dopaminergic differentiation, we cultured

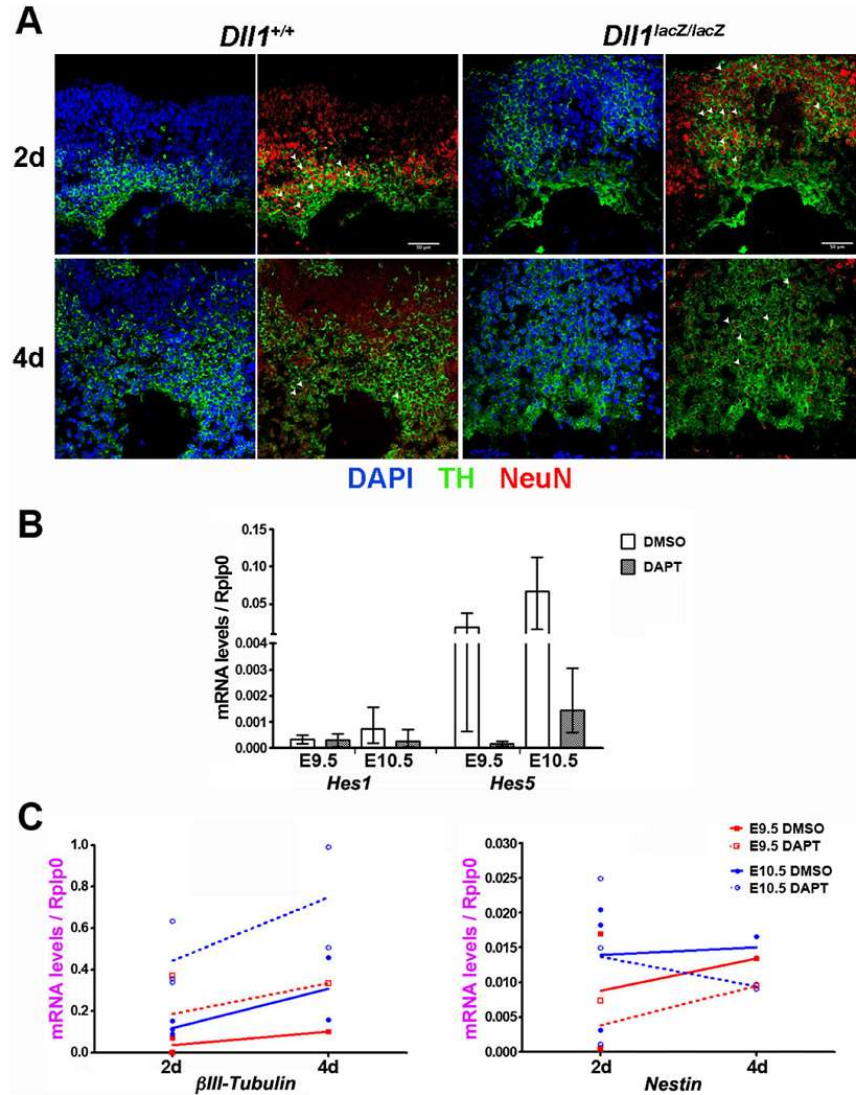


Fig. 5. Effect of Notch signalling on neuronal dopaminergic differentiation in explant cultures of developing mesencephalons. Neuronal dopaminergic differentiation was determined by detecting the number of cells containing the mature neuronal marker NeuN (some indicated with arrowheads) and Th (A) or the mRNA level of neural precursor (Nestin) or neuronal (β III-tubulin) markers (C). Mesencephalons with no or low Notch signalling were those derived from *Dll1^{lacZ/lacZ}* embryos (A) or treated with the DAPT Notch inhibitor for 2 days (2 d) or 4 days (4 d) (B,C). Note that the treatment (2d) of E9.5 and E10.5 explant cultures with the Notch inhibitor DAPT markedly reduced the expression of *Hes5* with a minimum effect on *Hes1* (B), in agreement with the effect determined in embryos lacking *Dll1*. Delayed DAPT effect (2 days vs 4 days) on *Nestin* expression in culture of E10.5 mesencephalons could be related to the ventricular NPC population that is not committed to become neurons. Scale bars are 100 μ m. Data in B represented as average \pm highest/lowest values.

mesencephalic explants in the presence or absence of DAPT, a potent γ -secretase inhibitor that blunts Notch activation at a key step after ligand binding (Crawford and Roelink, 2007). Due to the variations in number and distribution of differentiating cells in cultured explants, we analysed dopaminergic neurogenesis in explants by estimating mRNA levels of genes relevant to the process. As expected, the Notch inhibitor abolished *Hes5* expression in mesencephalic explants of E9.5 or E10.5 embryos after 2 days in culture, whereas *Hes1* expression was only partially affected (Fig. 5B), in close similarity with the observations in mutant embryos. In general, the effect of Notch signalling inhibition on mRNA levels of neuronal and dopaminergic genes was in agreement with the observations in *Dll1* deficient embryos (Fig. 5C). The proneurogenic effect of Notch inhibition was more pronounced in samples at E9.5 than at E10.5 (i.e. 4- vs 8-fold at either 2 days or 4 days treatment). Interestingly, there was no proportional decrease in the mRNA levels of *Nestin* (Fig. 5C), suggesting that a fraction of NPCs are dividing even under Notch signalling inhibition; nonetheless, note that Notch signalling inhibition reduced but did not affect the increasing rate of *Nestin* mRNA levels in E9.5 explants, suggesting that NPC differentiation but not proliferation is the target of the Notch signalling pathway. Therefore, Notch signalling inhibition reproduces the neurogenic effects of lacking *Dll1*, confirming that this ligand is the major mediator of Notch functions.

Absence of Notch signalling modifies the flux of dopaminergic differentiation

Msx1 and *Ngn2* are transcription factors whose corresponding genes are transiently expressed during dopaminergic differentiation; the former is mostly present in ventricular NPCs and marks the initiation of dopaminergic differentiation (Andersson et al., 2006b), whereas the latter is the proneural factor more important for dopaminergic differentiation that shows higher levels in the intermediate progenitors before *Nurr1* expression, a key transcription factor controlling *Th* expression (Kele et al., 2006). Because differentiating cells can spread to all directions from the site of birth, no direct relationship among the cells within a slice can be expected. Therefore, in order to estimate the transitions among the lineage-related dopaminergic precursors in the course of differentiation, we decided to determine the mRNA levels corresponding to those three transcription factors in ventral mesencephalons of embryos from E9.5 to E15.5 (Fig. 6A). The highest mRNA levels of *Msx1/2* were detected at E11.5, which represented a 30-fold increase in comparison with the level found at E9.5; this level value rapidly decreased to near the limit of detection since E12.5. Significant levels of *Ngn2* mRNA were detected at E10.5, became highest at E11.5, and markedly dropped by E15.5. In contrast, *Nurr1* mRNA levels increased gradually from E10.5 up to E12.5, stage at which apparently became stable. Since *Msx1/2*, *Ngn2* and *Nurr1* are expressed mostly in restricted non-overlapping NPCs that are linked along the dopaminergic differentiation pathway, the mRNA levels determined are in agreement with a differentiation flux starting with a definite number of *Msx1*+ NPCs that are converted into dopaminergic neurons passing sequentially through *Ngn2*+ and *Nurr1*+ NPCs. Note that the increase in *Th* mRNA levels, representing the young dopaminergic neuroblasts, lagged that of *Nurr1* (see below).

The increase in *Th* mRNA levels and relative number of dopaminergic neurons in the absence of *Dll1* suggest that Notch signalling regulates the emergence of dopaminergic features. A marked increase in *Ngn2*, *Nurr1* and *Th* mRNA levels in

mesencephalon of E10.5 embryos lacking *Dll1* (Fig. 6A) suggests that the cell populations expressing *Ngn2*, *Nurr1* and *Th* are prematurely emerging. Interestingly, at E11.5, *Msx2* and *Ngn2* mRNA levels in the ventral mesencephalon of *Dll1^{lacZ/lacZ}* embryos were lower than in the one of wild-type embryos; *Msx1* and *Mash1* showed similar regulation as *Msx2* and *Ngn2*, respectively (Fig. S4). In agreement with the correlation between the proportion of NPCs and mRNA levels, the decrease in *Ngn2* mRNA levels correlated with a decrease in the number of *Ngn2*+ NPCs (Fig. 6B,C). In contrast, *Nurr1* and *Pitx3*, two genes downstream *Ngn2* whose expression remains in the emerging *Th*+ neurons, showed slight differences in their mRNA levels in the presence or absence of *Dll1* at E11.5; only *Pitx3* mRNA levels were in line with the increase in *Th* expression but in much lower proportion (Fig. 4). Of note was that the reduction in *Dll1* (i.e. to the amount present in *Dll1^{+/lacZ}* embryos) caused a marked drop in *Ngn2* mRNA levels only in embryos at E11.5 but produced similar mRNA levels and expression patterns as wild-type of all other genes tested (Fig. 6A). Therefore, reduction in *Dll1* dose promotes dopaminergic differentiation in association with a decrement in the early specific NPCs (i.e. *Msx2*+ and *Ngn2*+).

The above observations suggest that *Dll1*-Notch signalling is controlling the differentiation flux once dopaminergic NPCs are specified such that, during the process, the effect is mainly noted in the reduction of *Ngn2*+ transient progenitors but not evident in the proportion of differentiated dopaminergic neuroblasts. The dopaminergic differentiation flux can be observed in explants cultures treated with DAPT (Fig. 6D). During culture of mesencephalic explants active differentiation was indicated by the rise in mRNA levels of *Msx1*, *Ngn2* and *Nurr1*. The differentiation dynamics in E9.5 and E10.5 explants was similar but the increase from 2 days to 4 days of culture in mRNA levels of early markers (i.e. *Msx1/2*, *Ngn2*) was less pronounced, whereas of late markers (i.e. *Nurr1*, *Th*) was more pronounced at the more advanced developmental stage, consistent with the differentiation trend occurring. Upon Notch signalling inhibition, consistent decrease in *Msx1* mRNA levels was observed in E9.5 explants despite their increasing phase at this developmental stage which was still observed; this observation is in agreement with a no relevant function of Notch in dopaminergic NPC proliferation. In contrast, Notch inhibition caused a consistent decrease in *Ngn2* mRNA levels in E10.5 explants, whereas this effect was noted in E9.5 only after 4 days DAPT inhibitor treatment; apparent lack of effect on *Ngn2* mRNA levels in 2 days-treated E9.5 explants supports a transitory role of *Ngn2*+ cells during differentiation. *Nurr1* mRNA levels showed lower levels in E9.5 than in E10.5 explants, but a higher increment was triggered by Notch inhibition. Similar behaviour was observed for the *Th* mRNA but its levels did not rise in E10.5 explants after 4 days Notch inhibitor treatment possibly due to the depletion of progenitor cells. Together, these data are in agreement with a model in which the proliferation and size of the pool of NPCs (i.e. E9.5>E10.5) defines how the dopaminergic differentiation flux is affected by Notch inhibition such that, NPC depletion and neuron generation induced by the Notch inhibitor strengthen and weaken, respectively, at late phases of differentiation (possibly after E11.5).

Dll1 haploinsufficiency causes a reduction in dopaminergic neurons of the adult brain substantia nigra

The alterations in mRNA levels of genes involved in neuronal dopaminergic differentiation as well as the mesencephalic phenotype observed in *Dll1^{+/lacZ}* embryos, both consistent with mild premature neuronal differentiation, prompted us to study the

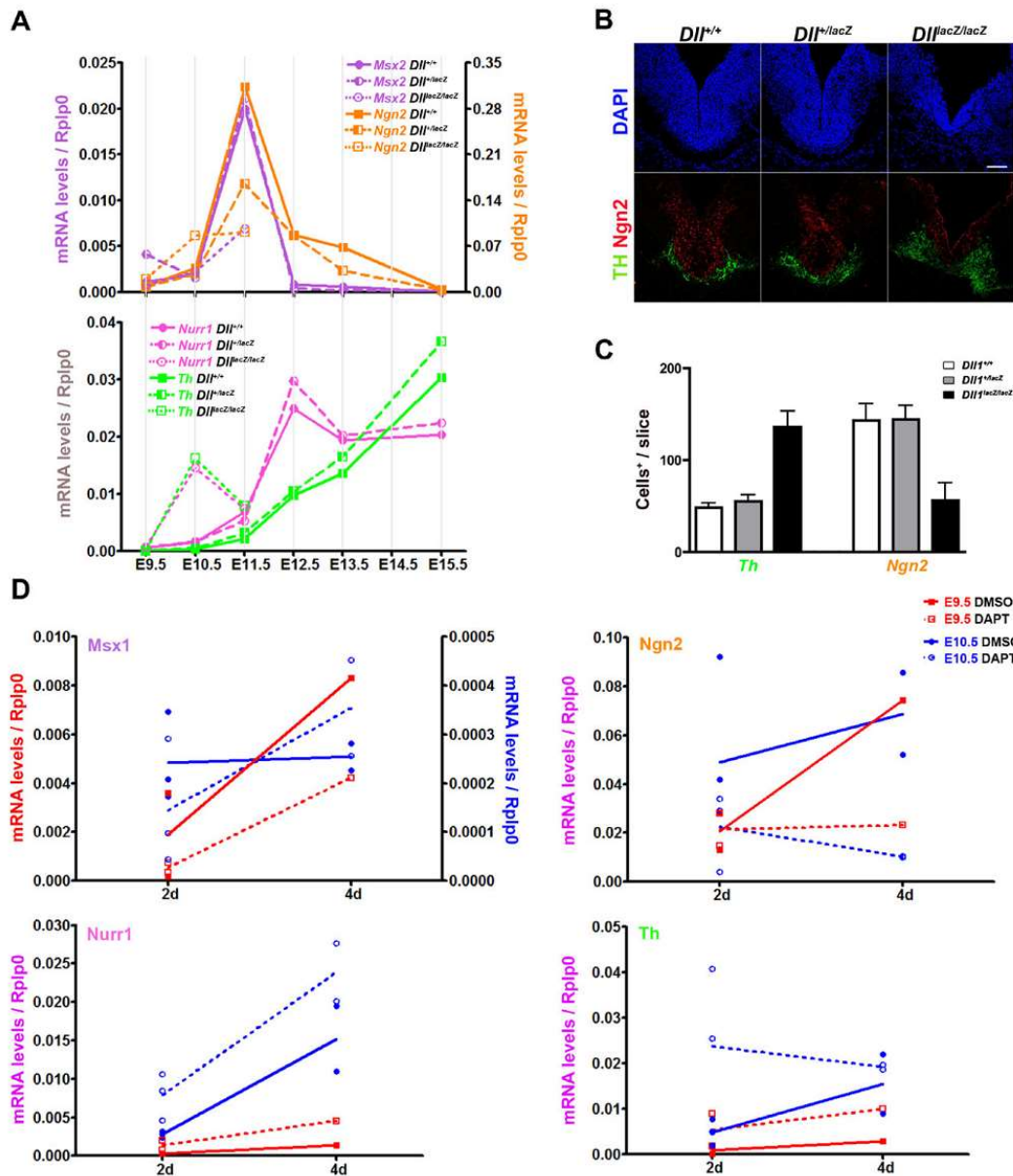


Fig. 6. Dopaminergic differentiation flux in mesencephalons along embryonic development or in explant cultures with normal or reduced Notch signalling. Progression of dopaminergic differentiation was followed by detecting the expression of genes whose products are mainly associated with distinct dopaminergic NPCs (*Msx1/2+*, *Ngn2+*, *Nurr1+*) or differentiated neurons (*Th*). For developing mesencephalons (A), total RNA was extracted from a pool of ventral regions from embryos (at least 6) of the genotype indicated. For explant cultures of mesencephalons (D) from E9.5 or E10.5 embryos, treated or not (DMSO) with DAPT, each determination was from an independent pool of cultured explants (at least 3). Number of *Ngn2+* NPCs or *Th+* neurons in mesencephalons from E11.5 embryos with the genotype indicated (B,C) shows a good correlation with *Ngn2* mRNA levels. Scale bar is 100 μ m. Data in C represented as averages \pm s.d.

consequences in adult mice. Although no differences in mRNA levels of neuronal and dopaminergic differentiation markers were detected at E13.5 or E15.5, lower density of dopaminergic neurons in the ventral mesencephalon of mutant in comparison with wild-type mice was not obvious at E13.5 but apparent at E15.5 when they

are nearly to establish their final allocation (Fig. 7A). As mentioned above, NeuN downregulation correlated with dopaminergic neuron maturation such that some *Th+*/*NeuN+* were detected in *Dll1^{+/lacZ}* E13.5 embryos but almost none in E15.5 embryos of either genotype. Interestingly, this reduction in dopaminergic neurons

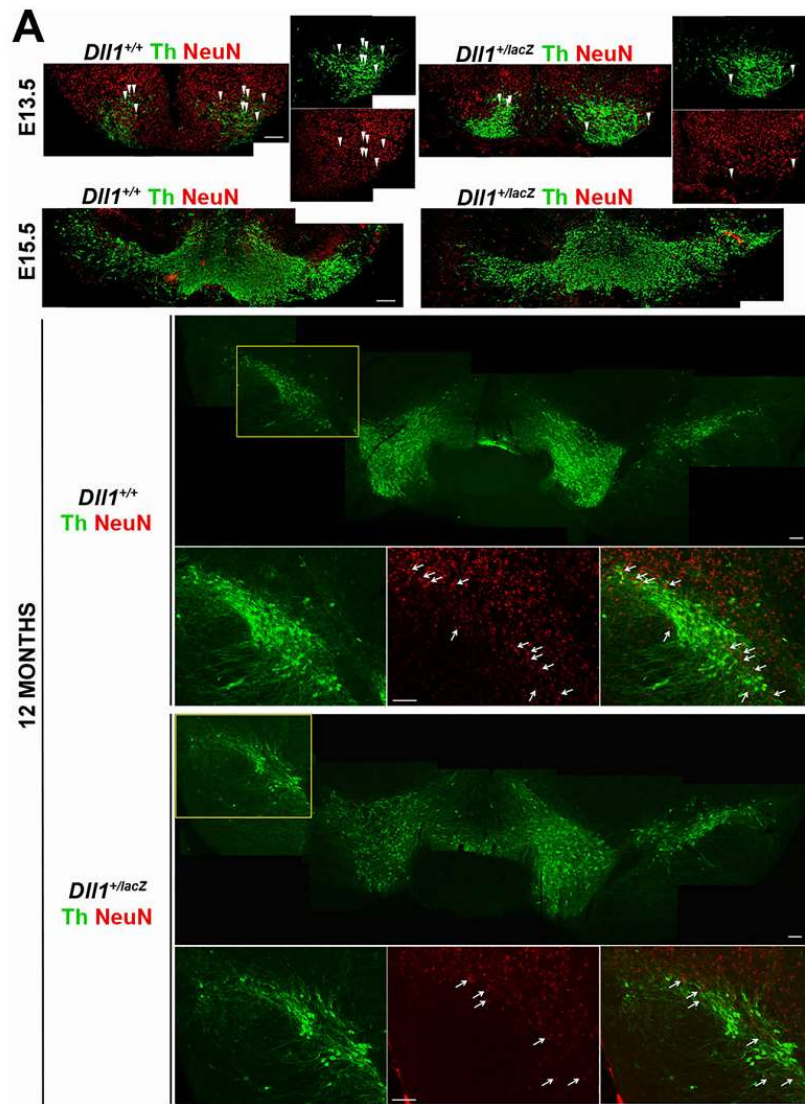
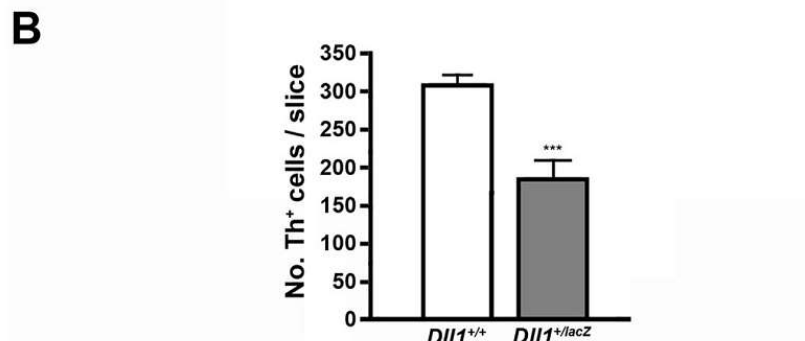


Fig. 7. Number of dopaminergic neurons in the adult brain under reduced *DII1* levels. (A) Dopaminergic neurons were detected by the presence of Th (green). No apparent difference in the density of Th+ neurons was detected in embryonic samples. Note that some Th+ neurons in the mesencephalon of E13.5 embryos (arrowheads) but not in that of E15.5 embryos contained nuclear NeuN (red), a marker frequently found in mature neurons. Evident lower density of Th+ neurons, all lacking nuclear NeuN, was observed in the SNpc of *DII1*^{+/lacZ} mice in comparison with the density in this region of wild-type mice. Scale bars are 100 μm; arrows indicate Th-NeuN+ cells within the SNpc. (B) Th+ neurons were counted in slices from brains of 14 month-old mice. Data represented as average±s.d.



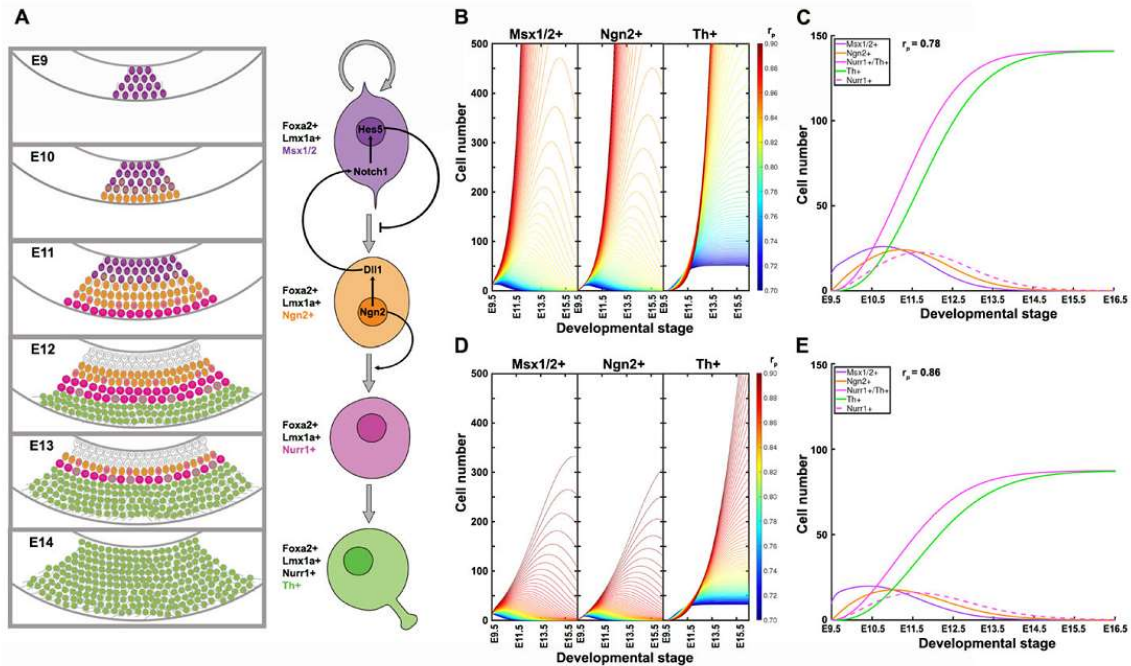


Fig. 8. A differentiation flux mathematical model for the derivation of mesencephalic dopaminergic neurons. (A) Representations of the distinct cell populations analysed during dopaminergic differentiation in the ventral mesencephalon and of the cell differentiation progress indicating the proposed role of Dll1 and Ngn2. (B,D) Dynamics of distinct cell populations (Msx1/2+, Ngn2+, Th+) emerging during dopaminergic differentiation at different r_p values in the presence of the complete (full dose of Dll1; B) or half (e.g. that present in $Dll1^{+/LacZ}$; D) active I_1 population. (C,E) The dynamic growth of the major NPC populations and immature dopaminergic neurons at a selected x and r_p values, those giving rise to patterns resembling the ones experimentally determined. For the dynamics shown, $P_0=10$.

became evident in adult mice, where it was readily visible in the substantia nigra pars compacta (SNpc) where most Th+ neurons remained NeuN negative (Fig. 7A,B). This is not related to a Dll1 role in neuron survival as similar phenotype was observed in young and old mice (see Fig. S5). Nonetheless, lower neuronal density was not restricted to dopaminergic neurons or the mesencephalic area but rather noted throughout the brain. The functional consequences of this reduction in neuronal density will be published elsewhere (manuscript in preparation). Therefore, a lower dose of Dll1 decreases the production of several neuronal types, possibly by disrupting a differentiation flux similar to the one described for mesencephalic dopaminergic neurons.

A mathematical model of dopaminergic differentiation flux

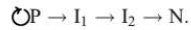
During neurogenesis, early ventricular neural precursors move to the subventricular zone as they differentiate (Fig. 8A). *Dll1* expression was detected in the subventricular area of most mesencephalon at E10-E11 (Fig. 1) (see also Kele et al., 2006; Lahti et al., 2011; Ono et al., 2007), whereas *Hes5*, the main mediator of Dll1-Notch signalling found, has been reported to be mostly located in the ventricular area (Kele et al., 2006; Vernay et al., 2005). From these observations we inferred that cells targeted by Dll1 are located in the ventricular zone (Fig. 8A), though we cannot discard a partial overlapping between *Dll1* and *Hes5* expression domains. Analysis of cell death and proliferation and emergence of neuronal markers at different amounts of Dll1 (i.e. those in $Dll1^{+/+}$, $Dll1^{+/LacZ}$, $Dll1^{LacZ/LacZ}$ mice) suggest that as Dll1

decreases, the differentiation rate increases, meaning that fewer NPCs divide and more exit the cell cycle to become neuroblasts. This phenomenon has been observed in other brain regions and interpreted as premature neuronal differentiation due to the lack of the inhibitory differentiation effect of Notch signalling (Hatakeyama et al., 2004; de la Pompa et al., 1997; Louvi and Artavanis-Tsakonas, 2006). Premature differentiation during the expansion of dividing precursors could cause their rapid exhaustion and, consequently, a reduction in the number of neurons produced.

Increased rate of differentiation can also be observed following specifically the mesencephalic dopaminergic lineage (Fig. 8A). Our data show that initiation of neuronal differentiation, as detected by the emergence of β III-tubulin, is closely coupled with the acquisition of markers of early dopaminergic neuroblasts such as Nurr1 and Th, and negatively regulated by Dll1. As expected, Msx1/2, a marker of early dividing dopaminergic precursors, concomitantly decreases. As inferred from mRNA levels, the number of Ngn2+ cells increases and decreases in coordination with that of Msx1/2+ cells, but under reduced Dll1 levels, early emergence of Ngn2+ cells occurs (Fig. 6A). Because the Ngn2+ NPCs population is a transient poorly dividing cell population (Andersson et al., 2006a; Kele et al., 2006; Thompson et al., 2006), these observations support a mechanism in which there is no additional restriction on differentiation from Ngn2+ progenitors into Nurr1+ neuroblasts.

A simplified model to describe the transition from specified dopaminergic precursor (Msx1/2+; P), going through intermediate

progenitors (Ngn2+, Nurr1+; I) up to becoming a young dopaminergic neuron (Nurr1+/Th+; N) (Fig. 8A) is:



Given that Ngn2 controls *Dll1* expression, effects of *Dll1* on P are proportional to the amount of I adjacent to P (I_1 ; I_2 refers to the I population moving away from P possibly Nurr1+), thus, this effect varies according with the equation

$$\partial = \frac{I_1}{P + I_1 + I_2 + N}.$$

Considering that there is no restriction on differentiation from I to N, as data suggested, the dynamic change in the number of P, I_1 , I_2 and N during differentiation can be modelled by the following set of differential equations,

$$\frac{dP}{dt} = \frac{P}{1 + I_1 + I_2 + N} + Pr_p \partial - Pr_d \quad (1)$$

$$\frac{dI_1}{dt} = Pr_d - I_1 r_d \quad (2)$$

$$\frac{dI_2}{dt} = I_1 r_d - Nr_d \quad (3)$$

$$\frac{dN}{dt} = Nr_d, \quad (4)$$

which develop over time from an initial population P_0 (P when $I_1+I_2+N=0$) and where the term $P/(1+I_1+I_2+N)$ represents the fraction of P with proliferation independent of *Dll1*-Notch signalling. r_p and r_d denote the probability that one P cell self-divides or differentiates, respectively. Thus,

$$r_p + r_d = 1.$$

To estimate the value of r_p and r_d , we consider our experimental observations showing that the population *Msx1/2+* (P) initially grows and extinguishes during the 6 days of differentiation (E9-E15) with a maximum around E11.5, and that the plateau of dopaminergic neurons (Th+; N) is reached between E13.5-E14.5. Using Eqns 1-4 and $P_0=10$ to describe the differentiation dynamics, it can be determined that P grows when the r_p value is above 0.70, and gets restricted to the short range of 0.75-0.80 when considering the time at which N reaches a plateau (Fig. 8B). The r_p/r_d value might correlate with a short window of the cell cycle at which the neurogenic process can initiate (Latasa et al., 2009).

Fig. 8C shows the dynamics of dopaminergic differentiation by comparing the growth pattern of the major distinct cell populations considered in this work ($P_0=10$, $r_p=0.78$). Interestingly, the pattern shown resembles the one experimentally determined using the gene expression levels of the specific markers for P, I_1 , I_2 and N (Fig. 6). A major conclusion derived from this dynamic model is that, the initial P_0 population produces a 15-20-fold larger N population, which implies that P divides every ~20 h 4-5 times during differentiation. Also, it can be inferred that the *Nurr1* gene expression pattern determined is associated with a transient *Nurr1+/Th-* population (possibly I_2 in the model) that emerges before becoming *Nurr1+/Th+* neuroblasts (N).

In the simple mathematical model described above, $\partial=0$ represents complete *Dll1* deficiency (no Notch signalling), and $\partial_x=I_1(x)/(P+I_1(x)+I_2+N)$ when there is 'x' fraction of I_1 than in wild-type embryos, an estimation of the *Dll1* level triggering Notch signalling in P; for instance, x in *Dll1* heterozygous embryos might equal 1/2. Varying ∂ values in the above equations give rise to the dynamics such as the ones represented in Fig. 8D (x=0.5; see also Fig. S6 for x=0) showing that, as expected, earlier emergence and lower production of dopaminergic

neurons than wild-type occur as Notch signalling decreases. Note, however, that the production of dopaminergic neurons at the same r_p value used when x=1 (i.e. full *Dll1* dose) appears much lower than the one experimentally determined in the SNpc of *Dll1^{+/LacZ}* (about 80% of wild type). Considering that the *Dll1* dose in heterozygous mice is actually half that of wild type, we propose that compensatory mechanisms controlling differentiation under low *Dll1* dose are reflected in small changes in the r_p value (Fig. 8E). Therefore, dopaminergic differentiation dynamics is markedly influenced by the regulatory mechanisms acting on P to precisely determine the level of proliferation and differentiation.

Concluding remarks

The initial specification of mesencephalic dopaminergic NPCs occurs in the absence of Notch signalling. This is not unexpected since *Dll1* expression in the floor plate depends on a functional *Ngn2*, a gene downstream *Foxa2* and *Lmx1a* (Andersson et al., 2006b; Ferri et al., 2007). A very similar phenomenon occurs in the spinal cord where homeodomain proteins define the *Dll1* spatial pattern and lack of *Dll1* increases neuronal differentiation without affecting the specific progenitor domain boundaries (Marklund et al., 2010). *Ngn2* marks a transient NPC population during dopaminergic differentiation, where positively regulates *Dll1* expression (Castro et al., 2006; Kele et al., 2006), while the data presented here show that *Dll1* does not appear to regulate the expression of *Ngn2* but rather determines the number of cells expressing it (Fig. 8A). Midbrains of *Ngn2^{-/-}* embryos show a marked reduction in *Ngn2* downstream dopaminergic markers such as *Nurr1*, *Pitx3* and *Th* (Kele et al., 2006) that, after birth, results in a significant decrease in the number of dopaminergic neurons (Andersson et al., 2006a). Considering our observations, we propose that, in addition to the neurogenic role, *Ngn2* has an additional unique function in dopaminergic differentiation, the regulation of NPC expansion through *Dll1* (Fig. 8A). Nonetheless, additional mechanisms compensate the effect of reducing *Ngn2* (Andersson et al., 2006a; Kele et al., 2006) or *Dll1* (this work) on the production of dopaminergic neurons. The dynamic model of differentiation we propose indicate that dopaminergic NPCs exhaust due to a higher rate of differentiation than proliferation, a process regulated by the interaction between *Dll1* and *Ngn2*. The remaining NPCs after E12.5 are likely the source of the glial cells emerging later in development.

The production of specific neurons during development should comply with the number needed for their functions in the adult brain. Moreover, it is expected that neuronal differentiation is coordinated in time with the processes that control migration of neuroblasts or young neurons to the definitive residence site, such that successful connections between neurons occur. It is generally thought that more neurons than needed are produced and that many die as they move through the path to their home and their axons compete for reaching the target cells. However, only in few instances have been demonstrated the role of natural neurodegeneration in the establishment of the final number of neurons, therefore, it is still relevant to determine the contribution of neurons produced. Here we found that the Notch-regulated differentiation flux from mesencephalic dopaminergic precursors up to becoming dopaminergic neurons is critical for determining the number of dopaminergic neurons present in the adult brain.

MATERIALS AND METHODS

Maintenance of mutant mouse line *Dll1^{LacZ/+}*

The *Dll1^{LacZ/+}* mutant mouse line in the CD1 strain genetic background was kindly provided by Dr Olivier Pourquié at the Stowers Institute for Medical Research. Because CD1 is an outbred strain, phenotypes resulting from the *Dll1* mutation or its penetrance for certain phenotypes might vary among

homozygous embryos; nonetheless, the particular phenotype studied here was highly reproducible suggesting low influence of potential modifiers present in this strain. The mutation resulted from the in frame replacement of exon1 by the *lacZ* gene, as described by Hrabě de Angelis et al. (1997). The null allele was maintained in the heterozygous state, since homozygous *Dll1^{lacZ/lacZ}* embryos die at around embryonic day E12.5, similar as previously reported (Hrabě de Angelis et al., 1997). With little variation, the genotype determined by PCR (forward primer: 5'-GTTGCACCACAGATGAAACGC-3'; reverse primer: 5'-AAGCCAG-ACGAAGAGGAAACCG-3') was coincident with *lacZ* expression level and with E10-E12 embryo phenotype (e.g. head morphology, haemorrhagic spots). All animal manipulations required for the present work were in compliance with the 'Guide for the Care and Use of Laboratory Animals' (National Research Council) and approved by our Bioethical Committee.

Collagen explant cultures

The midbrain explants were prepared as described by Baizabal and Covarrubias (2009). When explants (E9.5 or E10.5) were treated with the γ -secretase inhibitor *N*-[(3,5-Difluorophenyl)acetyl]-L-alanyl-L-phenylglycine-1,1-dimethylethyl ester (DAPT) (5 μ M, Tocris), control medium had same volume (0.5 μ l) of dimethylsulfoxide (DMSO); under these conditions, explants were not cultured for longer than 4 days.

Tissue processing and immunofluorescence

Embryonic brain tissue and midbrain explants sections were processed as described by Baizabal and Covarrubias (2009). All coronal sections analysed were perpendicular to the tangent near the midpoint of the mesencephalic flexure and those showing the complete ventral neuroepithelium (Fig. S1); thus, the extreme anterior and posterior mesencephalic areas were excluded. Tissue sections were incubated with the appropriate mixture of antibodies (Table S1). To determine active cell proliferation, pregnant mice were injected with 50 μ l of BrdU (50 μ g/ μ l; Sigma-Aldrich) 1 h before sacrifice; BrdU incorporation was determined by immunofluorescence. On the other hand, the TUNEL assay (Roche) was used to detect apoptotic cells in embryo brain cryosections. Preparations were counterstained with DAPI (1:10,000; Invitrogen), and analysed for immunofluorescence using a Zeiss LSM 510 confocal microscope and Zeiss Apotome microscope Axio Observer Z1.

Real-time quantitative RT-PCR

Total RNA was extracted with TRIzol (Invitrogen) following the manufacturer's instructions. The ventral midbrain (defined by the one-fourth of midbrain around the midline) of embryos was dissected and pooled for RNA extraction from no less than two litters at each developmental stage tested (i.e. E9.5-E15.5 dpc). Single ventral midbrains were not used for this analysis because rapid changes in gene expression occur in this region within the relevant developmental window, and because the low RNA yield would prevent from using the same sample for comparing the expression pattern of all genes. For explants, 3 midbrain explants (E9.5 or E10.5) of each condition and/or culture stage were collected per experiment; at least two experiments were performed per condition and/or culture stage. First strand cDNA was synthesized using AMV Reverse Transcriptase (Invitrogen) and oligo-dT₁₆ primer. Quantitative RT-PCR was performed using KAPA SYBR FAST mix (KAPA Biosystems) in the presence of the specific primers (Table S2) and the Rotor-Gene 3000 thermocycler (Corbett Research). Gene expression was evaluated using a $\Delta\Delta C_t$ method. The housekeeping gene *Rplp0* was used to normalize gene expression levels.

Data analysis and mathematical modelling

For cell quantification in tissue sections of embryos and explants cultures, single optical planes were analysed independently within each confocal stack. Total number of cells positive for the specific marker was determined within the stack. Unless indicated, cells counted were within the marked area, usually corresponding to the *Lmx1a* expression domain (determined in a parallel section). For adult brains, mice of 5, 8, 12 and 14 months of age were used. Although difference between *Dll1^{+/+}* and *Dll1^{lacZ/lacZ}* in the number of Th+ neurons was similar at all ages, robust analysis was done for one-year old animals. We counted the number of Th+ cells in the SNpc of five different

slices along the antero-posterior axis for each *Dll1^{+/+}* and *Dll1^{lacZ/lacZ}* mouse ($n=4$). The proportion of positive cells for a given marker is expressed as a percentage of the total cell number (DAPI+ cells) \pm s.d. (standard deviation) calculated from at least 3 different tissue samples. Asterisks in graphs indicate that the experimental groups were significantly different from control groups ($P<0.05$ as determined by the *t*-test). Mathematical modelling was performed in Matlab software (MathWorks, Natick, Massachusetts).

Acknowledgements

We are grateful to Elizabeth Mata, Graciela Cabeza and Andrés Saralegui for their technical assistance; and, to all members of the Covarrubias' group for the inquisitive comments along the accomplishment of the work presented.

Competing interests

The authors declare no competing or financial interests.

Author contributions

N.T.-P., C.V., G.G.-F., D.-M.A., M.G.-C., A.F.-H., and I.Z.-A. performed the experiments and data analysis; J.-M.B. and L.C. conceived the approaches; L.C. developed the concepts; N.T.-P., G.G.-F. and L.C. wrote the manuscript.

Funding

N.T.-P., G.G.-F. and D.-M.A. were recipients of a CONACyT fellowship for graduate studies. This work was supported by grant [131031] from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) and IMPULSA2-UNAM.

Supplementary information

Supplementary information available online at <http://bio.biologists.org/lookup/suppl/doi:10.1242/bio.013383/-DC1>

References

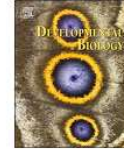
- Abellovich, A. and Hammond, R. (2007). Midbrain dopamine neuron differentiation: factors and fates. *Dev. Biol.* **304**, 447-454.
- Andersson, E., Jensen, J. B., Parmar, M., Guillemot, F. and Björklund, A. (2006a). Development of the mesencephalic dopaminergic neuron system is compromised in the absence of neurogenin 2. *Development* **133**, 507-516.
- Andersson, E., Tryggvason, U., Deng, Q., Friling, S., Alekseenko, Z., Robert, B., Perlmann, T. and Ericson, J. (2006b). Identification of intrinsic determinants of midbrain dopamine neurons. *Cell* **124**, 393-405.
- Ang, S.-L. (2006). Transcriptional control of midbrain dopaminergic neuron development. *Development* **133**, 3499-3506.
- Baizabal, J.-M. and Covarrubias, L. (2009). The embryonic midbrain directs neuronal specification of embryonic stem cells at early stages of differentiation. *Dev. Biol.* **325**, 49-59.
- Bassett, E. A. and Wallace, V. A. (2012). Cell fate determination in the vertebrate retina. *Trends Neurosci.* **35**, 565-573.
- Bettenhausen, B. and Gossler, A. (1995). Efficient isolation of novel mouse genes differentially expressed in early postimplantation embryos. *Genomics* **28**, 436-441.
- Castro, D. S., Skowronska-Krawczyk, D., Armant, O., Donaldson, I. J., Parras, C., Hunt, C., Critchley, J. A., Nguyen, L., Gossler, A. and Göttgens, B. (2006). Proneural bHLH and Brn proteins coregulate a neurogenic program through cooperative binding to a conserved DNA motif. *Dev. Cell* **11**, 831-844.
- Conlon, R. A., Reaume, A. G. and Rossant, J. (1995). Notch1 is required for the coordinate segmentation of somites. *Development* **121**, 1533-1545.
- Crawford, T. Q. and Roelink, H. (2007). The notch response inhibitor DAPT enhances neuronal differentiation in embryonic stem cell-derived embryoid bodies independently of sonic hedgehog signaling. *Dev. Dyn.* **236**, 886-892.
- de la Pompa, J. L., Wakeham, A., Correia, K. M., Samper, E., Brown, S., Aguilera, R. J., Nakano, T., Honjo, T., Mak, T. W., Rossant, J. et al. (1997). Conservation of the Notch signalling pathway in mammalian neurogenesis. *Development* **124**, 1139-1148.
- Deng, Q., Andersson, E., Hedlund, E., Alekseenko, Z., Coppola, E., Panman, L., Millonig, J. H., Brunet, J.-F., Ericson, J. and Perlmann, T. (2011). Specific and integrated roles of *Lmx1a*, *Lmx1b* and *Phox2a* in ventral midbrain development. *Development* **138**, 3399-3408.
- Duarte, A., Hirashima, M., Benedito, R., Trindade, A., Diniz, P., Bekman, E., Costa, L., Henrique, D. and Rossant, J. (2004). Dosage-sensitive requirement for mouse *Dll4* in artery development. *Genes Dev.* **18**, 2474-2478.
- Ferri, A. L. M., Lin, W., Mavromatakis, Y. E., Wang, J. C., Sasaki, H., Whitsett, J. A. and Ang, S.-L. (2007). *Foxa1* and *Foxa2* regulate multiple phases of midbrain dopaminergic neuron development in a dosage-dependent manner. *Development* **134**, 2761-2769.
- Guerrero-Flores, G. and Covarrubias, L. (2011). Dopaminergic differentiation potential of neural precursor cells derived from embryonic stem cells. In *Embryonic Stem Cells: The Hormonal Regulation of Pluripotency and Embryogenesis* (ed. C. Atwood), pp. 413-428. Rijeka, Croatia: InTech.

- Hatakeyama, J., Bessho, Y., Katoh, K., Ookawara, S., Fujioka, M., Guillemot, F. and Kageyama, R. (2004). Hes genes regulate size, shape and histogenesis of the nervous system by control of the timing of neural stem cell differentiation. *Development* **131**, 5539-5550.
- Hegarty, S. V., Sullivan, A. M. and O'Keefe, G. W. (2013). Midbrain dopaminergic neurons: a review of the molecular circuitry that regulates their development. *Dev. Biol.* **379**, 123-138.
- Hrabé de Angelis, M., McIntyre, J. and Gossler, A. (1997). Maintenance of somite borders in mice requires the Delta homologue Dll1. *Nature* **386**, 717-721.
- Joksimovic, M., Yun, B. A., Kittappa, R., Anderegg, A. M., Chang, W. W., Taketo, M. M., McKay, R. D. G. and Awatramani, R. B. (2009). Wnt antagonism of Shh facilitates midbrain floor plate neurogenesis. *Nat. Neurosci.* **12**, 125-131.
- Kadokawa, Y. and Marunouchi, T. (2002). Chimeric analysis of Notch2 function: a role for Notch2 in the development of the roof plate of the mouse brain. *Dev. Dyn.* **225**, 126-134.
- Kele, J., Simplicio, N., Ferri, A. L. M., Mira, H., Guillemot, F., Arenas, E. and Ang, S.-L. (2006). Neurogenin 2 is required for the development of ventral midbrain dopaminergic neurons. *Development* **133**, 495-505.
- Kittappa, R., Chang, W. W., Awatramani, R. B. and McKay, R. D. G. (2007). The *foxa2* gene controls the birth and spontaneous degeneration of dopamine neurons in old age. *PLoS Biol.* **5**, e325.
- Lahti, L., Saarimäki-Vire, J., Rita, H. and Partanen, J. (2011). FGF signaling gradient maintains symmetrical proliferative divisions of midbrain neuronal progenitors. *Dev. Biol.* **349**, 270-282.
- Latasa, M. J., Cisneros, E. and Frade, J. M. (2009). Cell cycle control of Notch signaling and the functional regionalization of the neuroepithelium during vertebrate neurogenesis. *Int. J. Dev. Biol.* **53**, 895-908.
- Lin, W., Metzkapian, E., Mavromatakis, Y. E., Gao, N., Balaskas, N., Sasaki, H., Briscoe, J., Whitsett, J. A., Goulding, M., Kaestner, K. H. et al. (2009). *Foxa1* and *Foxa2* function both upstream of and cooperatively with *Lmx1a* and *Lmx1b* in a feedforward loop promoting mesodiencephalic dopaminergic neuron development. *Dev. Biol.* **333**, 386-396.
- Lindsell, C. E., Boulter, J., diSibio, G., Gossler, A. and Weinmaster, G. (1996). Expression patterns of Jagged, Delta1, Notch1, Notch2, and Notch3 genes identify ligand-receptor pairs that may function in neural development. *Mol. Cell. Neurosci.* **8**, 14-27.
- Louvi, A. and Artavanis-Tsakonas, S. (2006). Notch signalling in vertebrate neural development. *Nat. Rev. Neurosci.* **7**, 93-102.
- Lütolf, S., Radtke, F., Aguet, M., Suter, U. and Taylor, V. (2002). Notch1 is required for neuronal and glial differentiation in the cerebellum. *Development* **129**, 373-385.
- Marklund, U., Hansson, E. M., Sundström, E., de Angelis, M. H., Przemec, G. K. H., Lendahl, U., Muhr, J. and Ericson, J. (2010). Domain-specific control of neurogenesis achieved through patterned regulation of Notch ligand expression. *Development* **137**, 437-445.
- Nakatani, T., Kumai, M., Mizuhara, E., Minaki, Y. and Ono, Y. (2010). *Lmx1a* and *Lmx1b* cooperate with *Foxa2* to coordinate the specification of dopaminergic neurons and control of floor plate cell differentiation in the developing mesencephalon. *Dev. Biol.* **339**, 101-113.
- Ohtsuka, T., Ishibashi, M., Gradwohl, G., Nakanishi, S., Guillemot, F. and Kageyama, R. (1999). *Hes1* and *Hes5* as notch effectors in mammalian neuronal differentiation. *EMBO J.* **18**, 2196-2207.
- Okano, H. and Temple, S. (2009). Cell types to order: temporal specification of CNS stem cells. *Curr. Opin. Neurobiol.* **19**, 112-119.
- Ono, Y., Nakatani, T., Sakamoto, Y., Mizuhara, E., Minaki, Y., Kumai, M., Hamaguchi, A., Nishimura, M., Inoue, Y., Hayashi, H. et al. (2007). Differences in neurogenic potential in floor plate cells along an anteroposterior location: midbrain dopaminergic neurons originate from mesencephalic floor plate cells. *Development* **134**, 3213-3225.
- Pierfelice, T., Alberí, L. and Galano, N. (2011). Notch in the vertebrate nervous system: an old dog with new tricks. *Neuron* **69**, 840-855.
- Shen, Q., Wang, Y., Dimos, J. T., Fasano, C. A., Phoenix, T. N., Lemischka, I. R., Ivanova, N. B., Stifani, S., Morrissey, E. E. and Temple, S. (2006). The timing of cortical neurogenesis is encoded within lineages of individual progenitor cells. *Nat. Neurosci.* **9**, 743-751.
- Swiatek, P. J., Lindsell, C. E., del Amo, F. F., Weinmaster, G. and Gridley, T. (1994). Notch1 is essential for postimplantation development in mice. *Genes Dev.* **8**, 707-719.
- Thompson, L. H., Andersson, E., Jensen, J. B., Barraud, P., Guillemot, F., Parmar, M. and Björklund, A. (2006). Neurogenin2 identifies a transplantable dopamine neuron precursor in the developing ventral mesencephalon. *Exp. Neurol.* **198**, 183-198.
- Vernay, B., Koch, M., Vaccarino, F., Briscoe, J., Simeone, A., Kageyama, R. and Ang, S.-L. (2005). *Otx2* regulates subtype specification and neurogenesis in the midbrain. *J. Neurosci.* **25**, 4856-4867.



Contents lists available at ScienceDirect

Developmental Biology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/developmentalbiology

Functional determination of the differentiation potential of ventral mesencephalic neural precursor cells during dopaminergic neurogenesis



Gilda Guerrero-Flores^a, Aimée Bastidas-Ponce^{a,1}, Omar Collazo-Navarrete^b, Magdalena Guerra-Crespo^b, Luis Covarrubias^{a,*}

^a Department of Developmental Genetics and Molecular Physiology, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos 62210, Mexico

^b Department of Molecular Neuropathology, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Coyoacán, Ciudad de México 04510, Mexico

ARTICLE INFO

Keywords:

Mesencephalic neural precursor cells
Commitment
Dopaminergic differentiation
Neurogenesis
Astrogenesis

ABSTRACT

The ventral mesencephalic neural precursor cells (vmNPCs) that give rise to dopaminergic (DA) neurons have been identified by the expression of distinct genes (e.g., *Lmx1a*, *Foxa2*, *Msx1/2*). However, the commitment of these NPCs to the mesencephalic DA neuronal fate has not been functionally determined. Evaluation of the plasticity of vmNPCs suggests that their commitment occurs after E10.5. Here we show that E9.5 vmNPCs implanted in an ectopic area of E10.5 mesencephalic explants, retained their specification marker *Lmx1a* and efficiently differentiated into neurons but did not express the gene encoding tyrosine hydroxylase (Th), the limiting enzyme for dopamine synthesis. A proportion of E10.5–E11.5 implanted vmNPCs behaved as committed, deriving into Th⁺ neurons in ectopic sites. Interestingly, implanted cells from E12.5 embryos were unable to give rise to a significant number of Th⁺ neurons. Concomitantly, differentiation assays in culture and in mesencephalic explants treated with Fgf2+LIF detected vmNPCs with astrogenic potential since E11.5. Despite this, a full suspension of E12.5 vmNPCs give rise to DA neurons in a similar proportion as those of E10.5 when they were transplanted into adult brain, but astrocytes were only detected with the former population. These data suggest that the subventricular postmitotic progenitors present in E12.5 ventral mesencephalon are unable to implant in embryonic explants and are the source of DA neurons in the transplanted adult brain. Based on our findings we propose that during DA differentiation committed vmNPCs emerge at E10.5 and they exhaust their neurogenic capacity with the rise of NPCs with astrogenic potential.

1. Introduction

The mammalian central nervous system (CNS) develops from neural precursor cells (NPCs) that respond to spatial and temporal cues in order to differentiate into specific neuron types. Astrocytes and oligodendrocytes also derive from these NPCs but they might significantly change their differentiation potential to commit into these fates (Hirabayashi and Gotoh, 2010; Rowitch and Kriegstein, 2010). During differentiation, NPCs go through distinct phases of commitment such that their natural neuronal multipotentiality (i.e., the ability to differentiate into different neuron types) detected in early developing CNS is lost at later stages. Despite the significant relevance of knowing the differentiation potential of developing NPCs, the actual plasticity of these cells has been scarcely studied.

The specification of developing cells establishes the stage at which cells have a defined fate but, yet, is dependent on their allocation in the embryo; this means that cell fate can be modified by changing the adjacent cells or growth factors (e.g., by transplantation). On the other hand, determination defines the stage at which cells differentiate according with their natural fate without the influence of the surrounding environment. Although NPC specification and commitment can be estimated by a code of gene expression (Bang and Goulding, 1996), a definitive evaluation can come only from a functional assay. Theoretically, a specified cell would continue its differentiation in the absence of external factors however, experimentally, this evaluation is limited by the survival of tissues or cells in the absence of growth factors. Therefore, fate switch evaluation of presumably specified cells (e.g., expressing a set of specification markers) after ectopic transplan-

* Correspondence to: Department of Developmental Genetics and Molecular Physiology Instituto de Biotecnología Universidad Nacional Autónoma de México, Campus Morelos, 62210 Cuernavaca, Mexico.

E-mail address: covs@ibt.unam.mx (L. Covarrubias).

¹ Present address: Institute of Diabetes and Regeneration Research, Helmholtz Zentrum, Munich, Germany.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ydbio.2017.07.008>

Received 11 February 2017; Received in revised form 17 July 2017; Accepted 17 July 2017

Available online 18 July 2017

0012-1606/ © 2017 Elsevier Inc. All rights reserved.

tation is a preferred assay for NPC commitment.

The plasticity of NPCs has been estimated within transplanted tissue fragments, a strategy particularly amenable for easily accessible embryos (Alvarado-Mallart et al., 1990; Grapin-Botton et al., 1997; Itasaki et al., 1996). Relevant to mention is that NPCs in this condition are still exposed to components of their niche and this may prevent revealing their actual differentiation potential. In mice, determination of plasticity of dissociated NPCs from different regions and developmental stages has been evaluated in few instances after reintroduction into the embryonic nervous system by ventricular or ultrasound-guided parenchymal injection (Campbell et al., 1995; Fishell, 1995; Olsson et al., 1998, 1997). These studies show low site-specific integration and few integrated NPCs. With the aim of increasing site-specific graft efficiency of NPCs, we developed the transplant-to-explant protocol. Using this experimental system, we were able to determine the differentiation potential of fresh and cultured NPC populations (Baizabal et al., 2012, 2010; Baizabal and Covarrubias, 2009).

The time at which ventral mesencephalic NPCs (vmNPCs) become committed to differentiate into midbrain dopaminergic (mDA) neurons has not been determined. Previous studies have shown that midbrain tissue of HH stage 10 chicken embryos (around developmental stage E9 in mouse) implanted in forebrain regions maintained their regional fate (i.e., *En1* expression) (Alvarado-Mallart et al., 1990; Gardner and Barald, 1991). However, dissociated mesencephalic cells of E10.5 mouse embryos re-specify in the ventral telencephalon, while those of E13.5 embryos retain their original identity (Campbell et al., 1995; Olsson et al., 1997). In contrast, E12.5 vmNPCs lose their identity after few cell divisions in culture and poorly differentiate into DA neurons (Bang et al., 2015; Chung et al., 2006; Meyer et al., 2012; Yan et al., 2001).

Currently, the commitment stage of dopaminergic NPCs has been molecularly estimated by the expression of genes throughout the differentiation process. For example, *Lmx1a⁺Foxa2⁺* cells identify specified mDA NPCs (Andersson et al., 2006a, 2006; Ferri et al., 2007) which appear to become committed once gain *Neurog2* expression, mostly present in postmitotic progenitors (Lacomme et al., 2012; Thompson et al., 2006). However, it is not clear whether the emergence of *Msx1/2* expression in dividing ventricular NPCs (Trujillo-Paredes et al., 2016) marked the commitment for differentiation into DA neurons. In the present work, we functionally tested the DA differentiation potential of vmNPCs at different developmental stages. In addition, we examined the gain of astrogenic potential in these cells during mDA neuronal differentiation. We found that mDA NPC commitment establishes around E10.5 and markedly decays at E12.5 when NPCs start to display astrogenic potential.

2. Materials and methods

2.1. Animals and tissue preparation

In this study, CD1 and EGFP mouse strains were used. Transgenic male mice that constitutively express Enhanced Green Fluorescent Protein (EGFP; gift from Andras Nagy) were crossed with wild type CD1 females in order to obtain EGFP heterozygous embryos. The day of detection of vaginal plug was considered as E0.5. Pregnant female mice were sacrificed by cervical dislocation. To analyze dividing cells and their fate, incorporation of 5-Bromo-2-Deoxyuridine (BrdU, Sigma) was determined at 2, 12, 24 and 48 h after a single BrdU intraperitoneal injection (80–250 mg/kg). All the procedures were approved by the Bioethical Committee of our Institution.

2.2. Collagen explant culture

Mesencephalons were obtained from E9.5 to E11.5 from CD1 mouse embryos and cultivated in collagen matrix (Baizabal and Covarrubias, 2009). E10.5 explants were used to assess the role Shh

on implant differentiation. In this case, explants cultures were treated with the Smoothed agonist SAG (400 nM, Santa Cruz) which was added at the beginning of the culture and at day 2. For some experiments explants were treated with Fibroblast Growth Factor 2 (Fgf2; 20 ng/mL, Peprotech), Leukemia Inhibitory Factor (LIF; 80 μ L/mL, Millipore) or both Fgf2 and LIF (Fgf2 during day 1 and both after day 2) and cultivated for 7 days (E9.5 and E10.5 explants) and during 6 days for E11.5 explants. Explants for cell transplantation were prepared from E10.5 embryos and cultivated for 7 days.

2.3. Transplant-explant protocol

The ventral region of 10–15 mesencephalons (from the cephalic flexure to the isthmus) from EGFP embryos was dissected and pooled together. Cell suspension was obtained by mechanical dissociation in DMEM-F12 (Gibco) media. For transplantation, a flame-stretched Pasteur pipette coupled to a hose with a mouthpiece was used to deposit donor cells over the ventricular surface of collagen-embedded explants, as previously described in Baizabal and Covarrubias (2009). For implantation of vmNPCs, the exposed ventricular surface of mesencephalons was gently aspirated using a thin glass capillary and cells were deposited over the explants.

2.4. Cell aggregation

E9.5 and E12.5 ventral mesencephalons were obtained as described above (E9.5 embryos were EGFP). Equal number of ventral midbrains ($n = 8$) were mixed and cell suspension obtained. Five μ L of cell suspension were mixed with collagen and then allowed to polymerize in a single well (48-well plates were used) before adding explant media. After two days of culture cells were fixed inside collagen and immunofluorescence staining were made.

2.5. Transplantation into adult rats

Male Wistar rats of ~ 250 g were used for transplantation procedures as reported in Maya-Espinosa et al. (2015). Animals were transplanted under ketamine-xylazine anesthesia (10 and 1 mg/kg, respectively) by intracranial injection of 1–2 μ L of cell suspension (approx. 150,000 cells prepared as described below) using a 5 mL Hamilton syringe. After 6 days, rats were deeply anesthetized with pentobarbital and perfused intracardially with 250 mL of 0.1 M phosphate buffered saline (PBS) followed by 250 mL of 4% paraformaldehyde (PFA).

2.6. Monolayer culture of mesencephalic NPCs

Cell suspension from ventral midbrains was prepared as described above. Cells were seeded at a density of 1×10^5 cells in 24-well dishes pre-coated with poly-D-ornithine (0.0025%; Sigma)/laminin (10 ng/mL; Invitrogen) in a supplemented serum-free media [DMEM-F12 (Invitrogen), Neurobasal (Invitrogen), N2 (1% v/v), Insulin (10 μ g/mL; Sigma), Glutamine (0.5 mM; Gibco), β -Mercaptoethanol (0.1 mM; Gibco)] supplemented with 10 ng/mL Fgf2. Cells were incubated to allow their attachment during 24 h and then media was changed and the different factors were added; cells were cultured for 48 h.

2.7. Tissue processing and Immunofluorescence staining

Embryonic brain tissue and midbrain explants sections were fixed with 4% Paraformaldehyde (PFA, Sigma) for 2 h at 4 °C, washed with PBS and dehydrated overnight with 30% Sucrose (J.T. Baker)/PBS. Tissues were frozen and sliced in coronal sections of 10 μ m thickness using a cryostat (Microm HM550, Thermo Scientific). Adult rat brains were post-fixed in 4% PFA and dehydrated by sequential 24 h incubations in 10%, 20%, and 30% sucrose/PBS. Afterward, brains were sliced

in 40 μm sections in coronal planes and collected in antifreeze solution (PBS/20% ethylene glycol/20% glycerol). For immunofluorescence staining, tissue sections were rinsed three times in PBS/0.3% Triton X-100 (Bio-Rad), treated with 1X Immuno-DNA retriever with citrate buffer (Bio SB) at 65 °C for 20 min, washed twice with PBS and incubated in blocking solution (10% donkey serum in PBS/0.3% Triton) for 1 h at room temperature (RT). Primary antibodies were diluted in blocking solution and incubated overnight at 4 °C. BrdU antibody was diluted in a solution with DNase (10% donkey serum, DNase buffer 1x, 10 U DNase, Roche), incubated 1 h at 37 °C and then at 4 °C overnight. Later, the tissues were washed with PBS and incubated for 2 h at RT with secondary antibodies diluted in PBS. Finally, tissue sections were washed in PBS with DAPI (1:5000; Molecular Probes) to counterstain cell nuclei. The tissue sections were mounted in Prolong gold (Molecular Probes). Primary antibodies used were Anti-BrdU (1:100; mouse; BD Bioscience), Nestin (1:500; mouse; Millipore), Lmx1a (1:2000; rabbit; Millipore) and Th (1:500; rabbit; Millipore), Neurog2 (1:75; goat; Santa Cruz), Sox2 (1:100; goat; Santa Cruz), β -III Tubulin (1:2000; rabbit; Covance), Gfap (1:5000; rabbit; Dako), Lmx1a (1:1000; rabbit; gift from M. German), Nkx6.1, Nkx2.2 and Pax7 (supernatants 1:2; mouse; Developmental Studies Hybridoma Bank). Primary antibodies were detected with the following secondary antibodies: Anti-Mouse-488, -594 and -647 (1:1000; goat, Molecular Probes), anti-Rabbit-488, -594 and -647 (1:1000; goat, Molecular Probes) and anti-Goat-488, -594 and -647 (1:1000; donkey, Molecular Probes). Images were captured on a Zeiss Axio Vision microscope using AxioVision LE software. Confocal pictures were taken on an Olympus FLUOVIEW FV1000 confocal laser scanning microscope.

2.8. Cell quantification and statistical analysis

Cell quantification was performed in the anterior and medial regions of embryonic mesencephalons. An average of positive cells for each marker between two slices was considered for each embryo and at least 3 embryos were counted. In some Sox2 determinations, the number of cells was quantified indirectly by taking the zone from the ventricular surface to the inferior limit of BrdU⁺ area (2 h after injection) in the mDA niche; no significant difference was found between this method and counting directly Sox2⁺ cells in the same slice. For implant experiments data are representative of 3 independent transplantation experiments, except for E11.5 vmNPCs, in which case 2 experiments were performed. At least 10 mesencephalic explants were analyzed for every population, in quantifications each point in the graphics represent one implant. For transplants into adult rats, 2 independent experiments were analyzed. For cell quantification, single optical planes were analyzed independently within each confocal stack. All the images shown are a single z-stack. In monolayer cultures, three independent experiments were conducted and each marker was counted in 4 fields per well in duplicate wells. All quantifications are represented by mean \pm standard deviation. Statistical analysis was performed by two-ways ANOVA.

3. Results

3.1. Expansion of putative mDA NPCs anticipates DA differentiation

Previously, we proposed that the expansion of mDA NPCs occurring at the ventricular zone is associated with the level of *Msx1/2* expression in the ventral mesencephalon (Trujillo-Paredes et al., 2016). At early stages of differentiation (E9.5–E11.5) mDA NPCs (i.e., *Msx1/2*⁺ cells) can be recognized by the presence of Sox2, thus, we estimated the growth phase of the dividing mDA NPC population by counting Sox2⁺ cells within the mDA niche (i.e., the Lmx1a domain). Accordingly, the number of Sox2⁺ cells increased linearly through E9.5 to E12.5 (Fig. 1A), though it is likely that the number Sox2⁺/*Msx1/2*⁺ started

to decrease after E11.5, the peak of *Msx1/2* expression (Trujillo-Paredes et al., 2016). Parallel with the increase in Sox2⁺ cells in the mDA niche, Neurog2⁺ progenitor cells emerged but, in agreement with their transient role, the size of the population remained constant, at least up to E12.5 when abundant mDA neurons are produced. In contrast, Th⁺ cells started to accumulate at E11.5 and their number grew exponentially (Fig. 1A).

We directly estimated the number of dividing mDA NPCs by evaluating cells at S and G2-M cell cycle phases across mDA differentiation. In the ventricular zone, cell divisions are characterized by the interkinetic movement of nuclei such that S phase nuclei are detected below the surface whereas those at the G2-M are mostly in close proximity to the ventricle (Takahashi et al., 1993). After 30 min of BrdU injection most labeled cells were found below the surface and later (90 min–2 h in total) the number of labeled nuclei near the surface was markedly increased (Fig. 1C, E). To exclude BrdU⁺ cells that might have already exited the cell cycle, we estimated mDA NPC divisions by counting the BrdU⁺ NPCs near the ventricular surface 2 h after BrdU injection (Fig. 1E). All ventricular BrdU⁺ cells were Sox2⁺ but only half were positive for pHH3 (phospho Histone H3), a marker of mitosis. Among the subventricular BrdU⁺ cells (all also Sox2⁺), none was found positive for pHH3, which indicates that ventricular counting correctly reflects the number of dividing cells.

Using the above criteria, we found that, as expected for the mDA NPC expansion phase, dividing and Lmx1a⁺/Sox2⁺ cells showed a parallel increasing number up to E11.5 (Fig. 1A, E). However, dividing Lmx1a⁺/Sox2⁺ cells continued to be detected at later stages, though these cells unlikely retain DA differentiation potential (see below). Supporting the high rate of cell division during the expansion phase, BrdU could not be detected at E12.5 if this was incorporated at E9.5 but could be detected if incorporation occurred at later stages (i.e., from E10.5 onwards; Fig. S1).

Consistent with the idea that dividing precursor cells do not express high levels of *Neurog2*, no Neurog2⁺ cell was found in the ventricular area (Fig. 1D). In the subventricular area, 2 h after BrdU injection at either E11.5 or E12.5, 5–8% of total BrdU⁺ cells were also Neurog2⁺ and no differentiated DA neuron (Th⁺/BrdU⁺) was found (Fig. 1F). Similar proportion of BrdU⁺/Neurog2⁺ cells was determined when BrdU injection was done at E10.5 and analyzed 48 h later (i.e., at E12.5), but in this case many DA neurons (Th⁺) have a strong BrdU signal (Fig. 1F and Fig. S1B), an indication that their source was NPCs ongoing the last division at the time of BrdU injection.

In contrast with the previous observations, when injection was done at E11.5, the proportion of BrdU⁺/Neurog2⁺ neuronal progenitors reached up to 25% out of total BrdU⁺ cells at E12.0, but very few Th⁺ cells were detected positive for BrdU; whereas that proportion went down to 12% at E12.5, with a concomitant five-fold increase in BrdU⁺/Th⁺ neurons, many of which had high BrdU detection signal (Fig. 1F and data not shown). Therefore, Neurog2⁺ neuronal progenitors are transient and non-dividing cells that emerge about every 12 h, such that the complete differentiation process of a single mDA NPC takes around 24 h to reach the Th⁺ immature neuron stage. It is relevant to note that the increase in Lmx1a⁺ cells after E11.5 (Fig. 1A) and the increase in BrdU⁺/Th⁺ cells in only 12 h (Fig. 1F) did not correlate with the ventricular mDA NPC proliferation rate in the 2D plane, suggesting a significant tangential movement of cells during the differentiation phase.

3.2. Early mDA NPCs retain Lmx1a expression but do not differentiate into DA neurons outside their niche

The dividing Lmx1a⁺ cells detected in the above experiments represent the mDA NPCs that might have become committed to differentiate into mDA neurons. In order to determine when mDA NPCs become committed and no longer need extrinsic signals to differentiate, we transplanted cells from ventral mesencephalons at

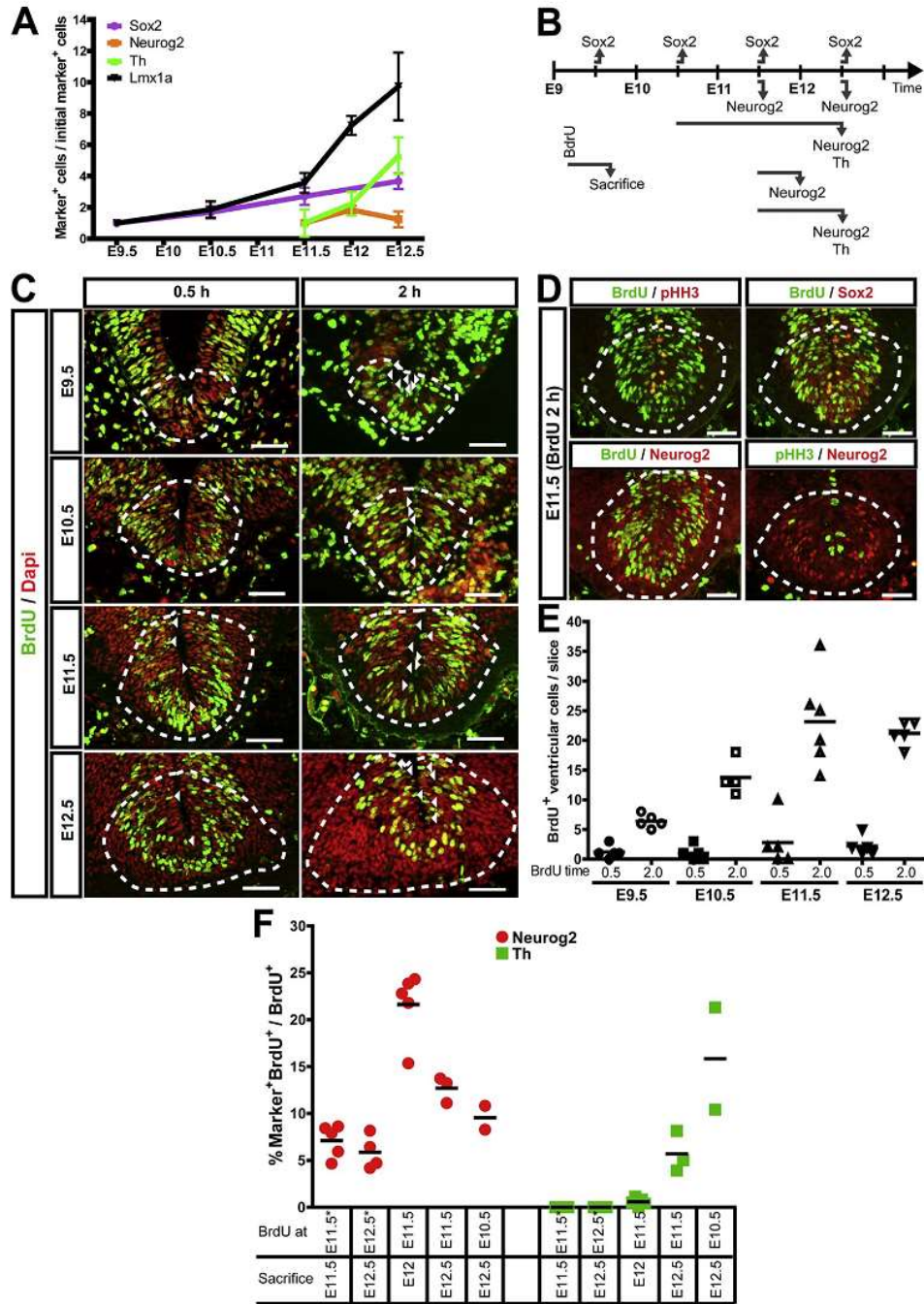


Fig. 1. Flux of mDA differentiation. (A) Differentiation of mDA NPCs was followed through development (E9.5-E12.5) by immunodetection of markers that identify the major cell stages: mDA precursors and neurons (Lmx1a), dividing ventricular NPCs (Sox2), progenitors (Neurog2), neurons (Th). The number of cells positive for each marker was normalized to the determination at the stage when the marker was first detected. Values are shown as mean \pm SD, $n = 4$. (B) Schematic representation of BrdU injections and relevant phenotype (i.e., Sox2, Neurog2, Th) of BrdU+ cells at the end of treatments (see observations shown in C-F below); Sox2+/BrdU+ cells were found in all protocols used (not shown for those below the timeline). Arrow start represents the developmental stage of BrdU injection, and arrowheads the one of sacrifice. (C) Proliferation rate in the mDA niche (dotted square) was determined by BrdU incorporation. Pulses of 30 min or 2 h were done at each developmental stage evaluated. (D) Ventricular BrdU+ cells colocalized with Sox2 and pHH3 and were Neurog2+. (E) Quantification of ventricular BrdU+ cells (e.g., arrowheads in B). (F) BrdU incorporation was performed at different stages to follow the fate of dividing throughout differentiation. BrdU+/Neurog2+ and BrdU+/Th+ cells were quantified for each BrdU incorporation protocol used a proportion estimated in relation to the total BrdU+ cells counted. Asterisks in BrdU time means 2 h of incorporation. Scale bar 50 μ m.

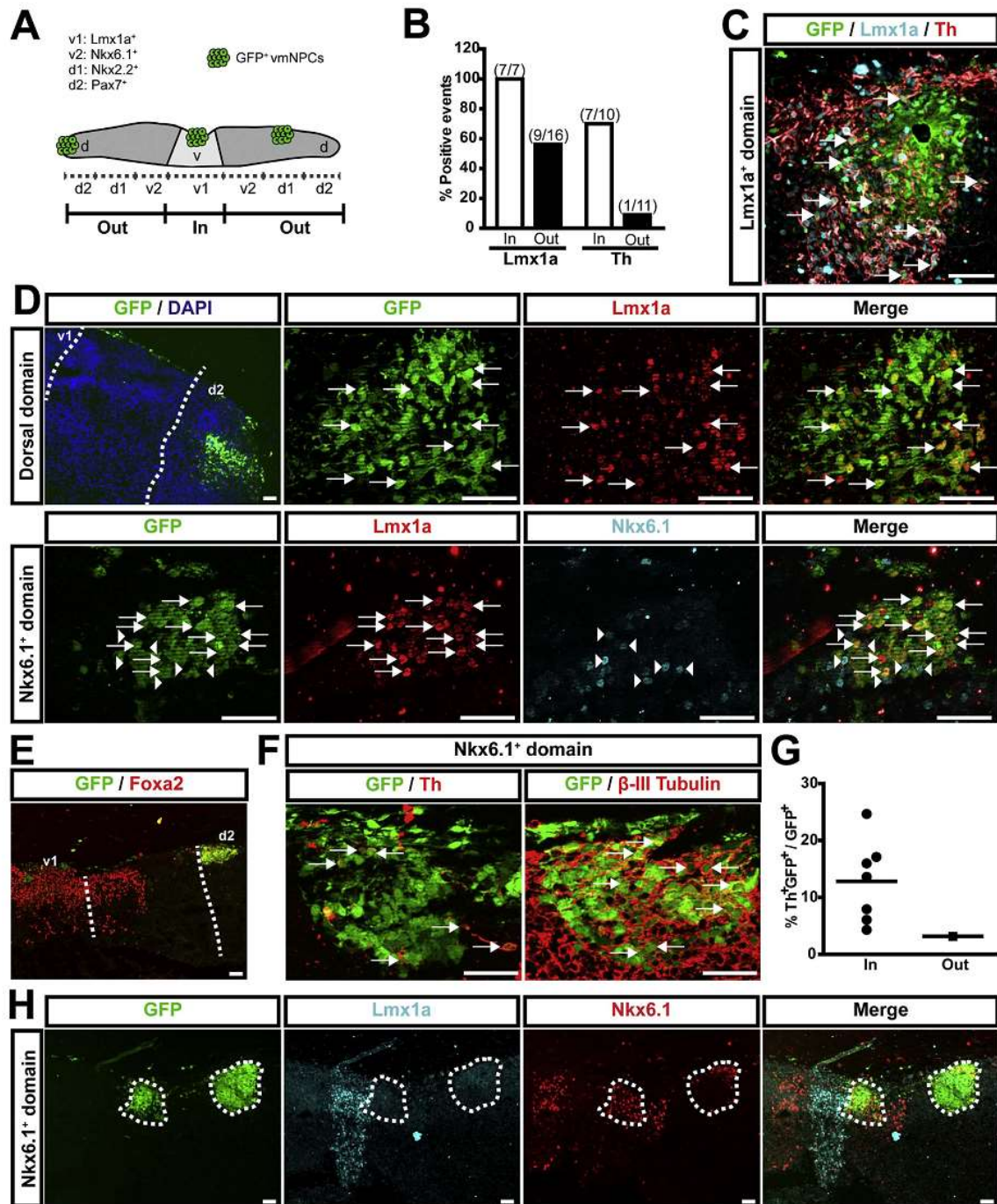


Fig. 2. E9.5 mDA NPCs remain as *Lmx1a*⁺ but do not generate mDA neurons outside their niche. A cell suspension from whole ventral E9.5 midbrains was transplanted to E10.5 midbrain explants. (A) Schematic representation of midbrain explant domains where transplanted cells can implant; “In” refers to the *Lmx1a* niche and “Out” to *Nkx6.1*, *Nkx2.2* or *Pax7* domains. (B) Quantification of events in which implant contained *Lmx1a*⁺ or Th⁺ cells “In” or “Out” the mDA niche. (C) E9.5 vmNPCs implanted in the mDA niche differentiated into *Lmx1a*⁺/Th⁺ neurons (arrows). (D) E9.5 vmNPCs implanted in dorsal domains (*Pax7* or *Nkx6.1*) maintained *Lmx1a* marker (arrows; upper and lower panels) and did not acquire the characteristic marker of the integration site (e.g. *Nkx6.1*, arrowheads mark endogenous *Nkx6.1*⁺ cells, upper panel). (E) Implanted cells in dorsal domains also maintained the *Foxa2* ventral marker. (F) Only in one case mDA NPCs differentiated into Th⁺ neurons (arrows, left panel), even though in all cases they differentiated into immature neurons (β -III Tubulin⁺, arrows, right panel). (G) Differentiation efficiency was determined “In” and “Out” the mDA niche by counting implanted (GFP⁺) Th⁺ cells. (H) When vmNPCs failed to maintain *Lmx1a* expression, they acquired markers of the integration site such as *Nkx6.1* (cells inside dotted lines, upper panels). Dotted lines mark borders of v1 and d2 domains. Scale bar 50 μ m.

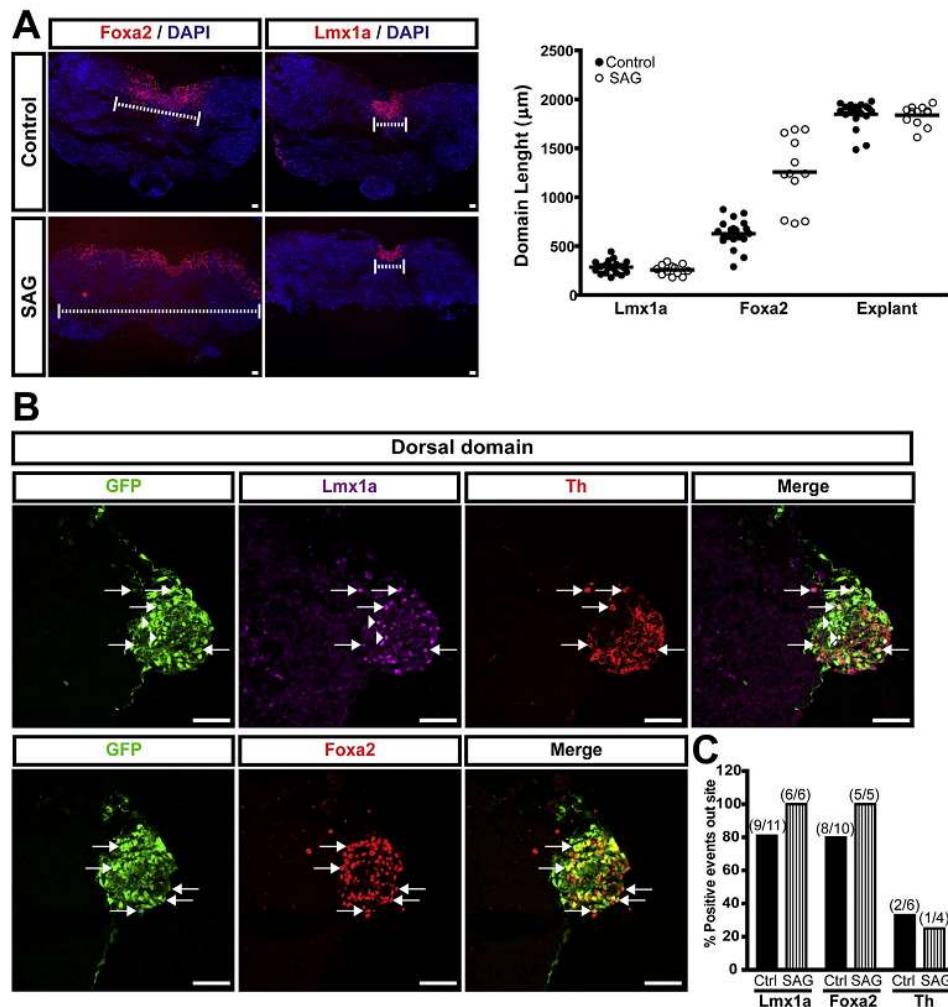


Fig. 3. Shh cannot induced differentiation to mDA neurons of E9.5 vmNPCs. (A) E10.5 midbrain explants were treated with SAG and cultured for 7 days. SAG induced an expansion of the Foxa2 domain without changing the size of the Lmx1a domain; dotted lines indicate the length measured whose determination for several samples is represented in graph. (B) SAG was added to the culture media of midbrain explants with implanted E9.5 vmNPCs. mDA NPCs still maintain Lmx1a (upper panels, arrows and arrowheads) and in one case, cells differentiate into Th⁺ neurons (upper panels, arrows). mDA NPCs also maintained Foxa2 marker (lower panels, arrows). (C) Quantification of Lmx1a⁺, Foxa2⁺ and Th⁺ vmNPCs integrated in dorsal regions of explants when SAG was added to the culture medium. Scale bar 50 μ m.

different developmental stages to dorsal areas of E10.5 midbrain explants (Fig. 2A) and evaluated their fate after 7 days. Specified mDA NPCs from the ventral mesencephalon of E9.5 embryos, expressing *Lmx1a* and *Foxa2* (Andersson et al., 2006a, 2006b; Ferri et al., 2007), implanted in dorsal regions failed to re-specify and retained the specification markers of their origin, Lmx1a and Foxa2, in about 60% of cases (18/27 events for Lmx1a, 8/10 for Foxa2) (Fig. 2B, D-E and Fig. 3B-C). Unexpectedly, despite the efficiency of the implanted cells to differentiate into neurons expressing β -III Tubulin (Fig. 2F), only in one case ($n = 11$) some Th⁺ cells were detected (Fig. 2B, F-G). In contrast, when we transplanted the same vmNPCs back to the DA niche, the implanted cells differentiated properly such that most cells were Lmx1a⁺ and all Th⁺ cells were Lmx1a⁺ (Fig. 2B-C), confirming that there is no loss of differentiation capacity due to the transplantation procedure itself. The remaining Lmx1a⁺ that did not express Th could be delayed differentiating mDA precursors, as previously ob-

served when transplanting NPCs from other sources (Baizabal and Covarrubias, 2009; Baizabal et al., 2010), but they could also be subthalamic nucleus (STN) neurons from committed diencephalic Lmx1a⁺ NPCs (Kee et al., 2017) contaminating the transplanted population (see data with E10.5 and E11.5 NPCs and Section 4). In cases in which vmNPCs did not maintain the presence of Lmx1a, they expressed markers of the implanted site (Fig. 2H). Similar results were obtained when E9.5 vmNPCs were transplanted to E9.5 mesencephalic explants (data not shown). Therefore, E9.5 midbrain contains mDA NPCs with a level of commitment that prevents re-specification but that cannot complete the specific differentiation process without the contribution of extrinsic signals present in the mDA niche.

Previously, it was shown that midbrain explants before DA differentiation cultured in the absence of Sonic Hedgehog (Shh) signaling present a reduction in the number of mDA neurons generated (Ye et al., 1998). In addition, it is also known that Shh induce the generation of

ectopic mDA neurons in the embryonic telencephalon and mesencephalon without floor plate (Hynes et al., 1995; Ye et al., 1998). Thus, we hypothesized that Shh could be the missing signal in the dorsal mesencephalon required for mDA differentiation. In our hands, the ectopic activation of Shh signaling in E10.5 explants by SAG, a known Smoothed agonist (Chen et al., 2002; Frank-Kamenetsky et al., 2002), caused the expansion of the Foxa2 expression domain, an expected outcome since the ventral expression of Foxa2 in the midbrain is regulated by Shh (Sasaki et al., 1997); but, in contrast, the Lmx1a expression domain and the generation of Th⁺ neurons was not affected (Fig. 3A). This latter data suggest that the NPCs at E10.5 are no longer competent to activate mDA specification mechanisms in response to Shh, a property of earlier midbrain NPCs (Ye et al., 1998).

Despite the above results, it was still possible a Shh requirement for DA differentiation. To test this possibility, we transplanted E9.5 NPCs to E10.5 explants and cultured them in the absence or presence of SAG. E9.5 vmNPCs implanted in the dorsal region of explants cultured in the presence of SAG did not give rise to Th⁺ neurons but the number of events with Lmx1a⁺ or Foxa2⁺ cells increased as compared with untreated controls (Fig. 3B-C). Therefore, Shh is not the missing signal in the E10.5 dorsal mesencephalon needed for terminal DA differentiation, but it does have a role in mDA NPC maintenance.

3.3. Committed mDA NPCs arise after E10.5 and some remain until E12.5

At E10.5, the first immature neurons (β -III Tubulin⁺) appeared in the mantle zone of the midbrain, but the majority of cells are still undifferentiated NPCs (Lmx1a⁺/Sox2⁺) (Fig. S2A, left panel). When vmNPCs from this stage were implanted in E10.5 explants, they failed to re-specify in dorsal regions but, in contrast with E9.5 vmNPCs, differentiated into Th⁺ neurons in 46% of cases (6/13 events; Fig. 4A-B). In some rare cases, cells implanted in the Nkx6.1 or Nkx2.2 domains were positive for these markers, which might represent committed cells included in the ventral fragment used to obtain the vmNPC suspension for transplantation (Fig. S2B and data not show). Despite that vmNPCs from E10.5 embryos differentiated into mDA neurons outside their niche, it is of note that not all implanted cells hold this capacity since still the differentiation efficiency was higher inside ($42.07 \pm 9.52\%$ Th⁺ cells) than outside the mDA niche ($20.13 \pm 12.44\%$ Th⁺ cells; Fig. 3C-D).

In the above experiments, few β -III Tubulin⁺ neurons pre-existing at E10.5 might be the ones that displayed the Th⁺ marker in dorsal regions after implantation. In order to evaluate the contribution of these immature neurons to the total cell population implanted, we transplanted NPCs located in the most ventricular zone of E10.5 midbrain (see Section 2). Interestingly, a greater number of cases generated Th-expressing cells outside the ventral midline (5/7 cases, 71%; Fig. 4E-F). In addition, differentiation outside and inside the mDA niche was similar and more efficient in comparison with the efficiency determined in previous experiments when the whole ventral cell population was transplanted (inside 57.23%, outside $48.71 \pm 22.61\%$; Fig. 4G). These Th⁺ neurons were also positive for Lmx1a (99.14%), supporting that they represent mDA neurons and no other dopaminergic neuronal type. These data confirmed that the differentiation observed before is due to the intrinsic capacity of the vmNPCs at this developmental stage.

In contrast with the mDA niche at E10.5, at E11.5 proliferating NPCs (Msx1/2⁺), postmitotic progenitors (Neurog2⁺) and immature neurons are clearly distributed in defined domains throughout the apical-basal axis (Fig. S3A; Ono et al., 2007). As in previous experiments, we took cells from the ventricular side where dividing precursors are localized, attempting to avoid differentiated neurons. Transplanted vmNPCs from E11.5 behave in a similar manner as the ones coming from E10.5. Differentiation into Th⁺ neurons occurred when cells were implanted outside mDA niche in 60% of cases (3/5

events; Fig. S3B-D) but the differentiation efficiency ($28.95 \pm 11.99\%$) was slightly lower than with ventricular E10.5 NPCs. These Th⁺ neurons were bona fide mDA neurons as they were also positive for Lmx1a (96.49%; Fig. S3B upper panel), Foxa2 and Pitx3 (Fig. S3E). Therefore, committed vmNPCs to become mDA neurons are more concentrated in the ventricular zone and in a similar proportion between E10.5 and E11.5, and it appears that few or none Neurog2⁺ or Th⁺/ β -III Tubulin⁺ neurons contribute to the implanted cell population (see below).

At E12.5, the differentiation of mDA NPCs is still underway showing a large proportion of Neurog2⁺ progenitors around the midline niche but low levels of Msx1/2 suggest a significant decline in dividing mDA NPCs (Trujillo-Paredes et al., 2016). Therefore, at least some of the apparent committed mDA NPCs detected above could be the population exiting the cell cycle that is prompt to become Neurog2⁺ cells. In order to determine the contribution of these cells or those that are already Neurog2⁺, we transplanted a total suspension of cells as well as a population enriched in ventricular NPCs of E12.5 ventral mesencephalon to explants. When the whole ventral cell suspension was transplanted, the frequency of successful implants was lower (about 50%) in comparison with that of experiments done with E10.5 cells. Unexpectedly, among the successful implants, only few showed Th⁺ cells outside the mDA niche (3/9) (Fig. 5A-B). Similar results were obtained when ventricular E12.5 vmNPCs were transplanted (Fig. 5E-H), and while most of the cells differentiate into immature neurons (Fig. 5G), only in 22% of cases (2/9) Th⁺ cells were found (all Lmx1a⁺), despite in 60% of cases (5/8) cells maintained Lmx1a (Fig. 5F). The differentiation efficiency into mDA neurons, with both populations, was similar to that registered with E10.5 or E11.5 implanted cells, outside as well as inside the mDA niche (Figs. 4D, G, 5D, H, S3D); however, it is relevant to note that E12.5 vmNPCs implants had about 3 times less implanted cells than those of other stages, in agreement with the reduction in the number of mDA NPCs. These results together indicate that vmNPCs committed to differentiate into mDA neurons remain at E12.5 but their proportion is lower than that at E10.5 or E11.5 and, as previous experiments, the small number of Th⁺ neurons found is in agreement with a poor contribution of more differentiated cells (e.g., postmitotic progenitors) to the implant in the E10.5 explant.

The transplant to explant protocol is based on the capacity of transplanted cells to interact with the ventricular surface of the explant host such that a successful implantation results. Previous studies have shown that when telencephalic NPCs are injected into the embryonic brain ventricles, only proliferative cells are able to integrate into the ventricle and more differentiated cells (postmitotic neurons) form clumps that remain attached to the ventricular wall (Campbell et al., 1995; Cattaneo et al., 1994). Under this view, it is expected better interaction between NPCs than NPCs with differentiated cells. To determine the interaction between cells at different differentiation stage, we mixed ventral midbrain cells of E9.5 (enriched in ventricular NPCs) with the equivalent of E12.5 (containing in addition to NPCs, progenitors and immature neurons). After 2 days in culture, cell interaction resulting from the combination E9.5 \leftrightarrow E12.5 gave rise exclusively to chimeric aggregates containing Lmx1a⁺ cells (Fig. S5). Aggregates of NPCs from different regions of the ventral mesencephalon were observed between those of E9.5 midbrains (E9.5 \leftrightarrow E9.5). In contrast, most aggregates between E12.5 ventral mesencephalic cells (E12.5 \leftrightarrow E12.5) (Fig. S5B) expressed Lmx1a. Relevant to note, no E12.5 Th⁺ cell was found within aggregates derived from either E9.5 \leftrightarrow E12.5 or E12.5 \leftrightarrow E12.5 (Fig. S5A). These results are consistent with above observations showing no indication of implantation of postmitotic differentiated cells, thus determinations described above were mostly restricted to the DA potential of dividing ventricular NPCs.

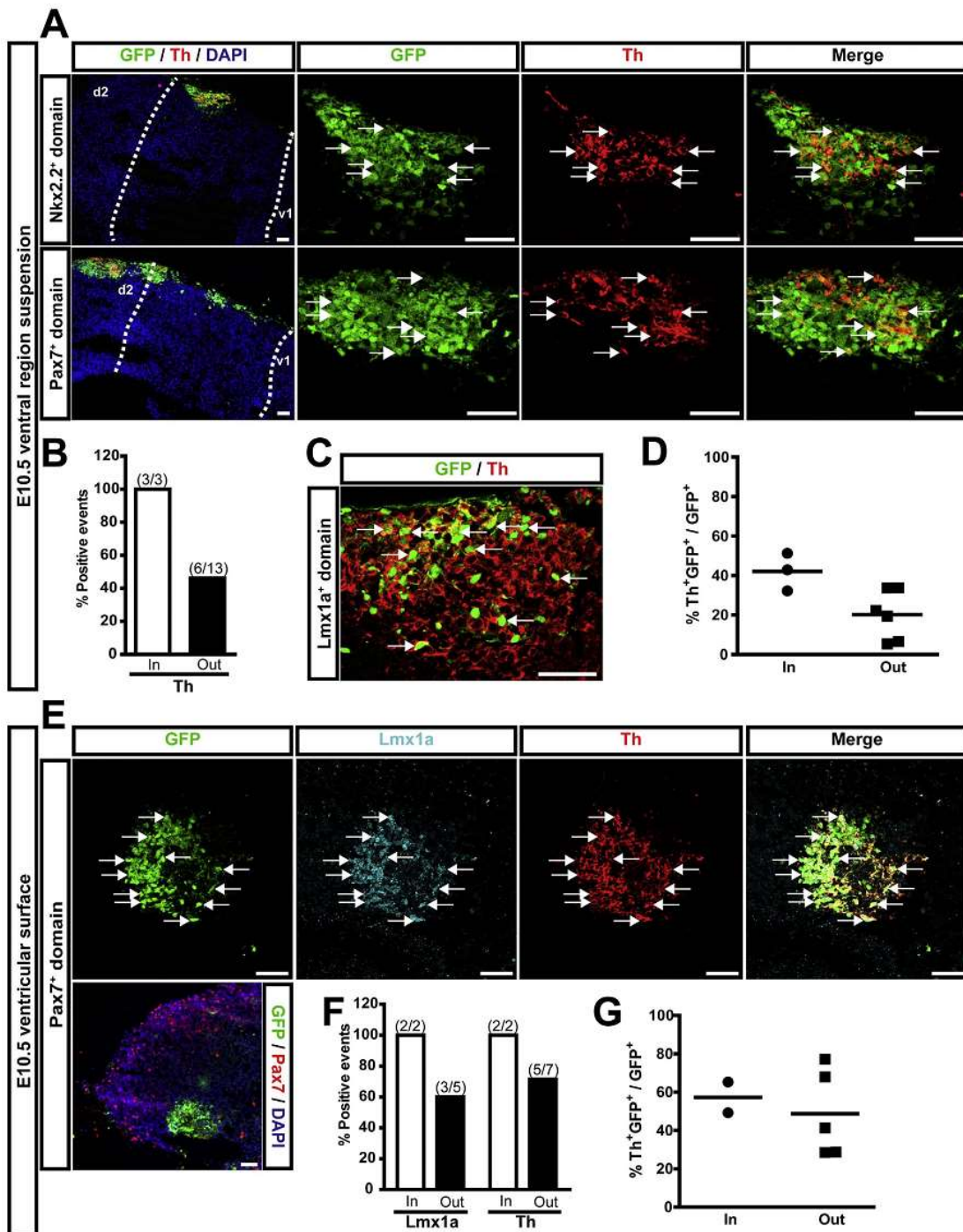


Fig. 4. A population of committed mDA NPCs appeared at around E10.5. A suspension of whole ventral E10.5 midbrains was implanted in dorsal regions of midbrain explants. (A) Implanted cells differentiated into Th⁺ neurons in Nkx2.2⁺ (arrows, upper panel) and Pax7⁺ (arrows, lower panel) domains. Dotted lines mark borders of v1 and d2 domains. (B) Quantification of events with Th⁺ neurons “in” and “out” the mDA niche. (C) NPCs also differentiated into Th⁺ cells in their niche (arrows). (D) Quantification of Th⁺ neurons emerging from implanted NPCs “in” and “out” the mDA niche. (E) Cells of the ventricular surface of ventral E10.5 midbrains were implanted in midbrain explants. NPCs remained Lmx1a⁺ and differentiated into Th⁺ neurons in dorsal regions (arrows). (F) Quantification of transplantation events with Lmx1a⁺ or Th⁺ cells derived from implanted cells “in” or “out” the mDA niche. (G) Quantification of differentiation efficiency “in” and “out” the mDA niche. Scale bar 50 μ m.

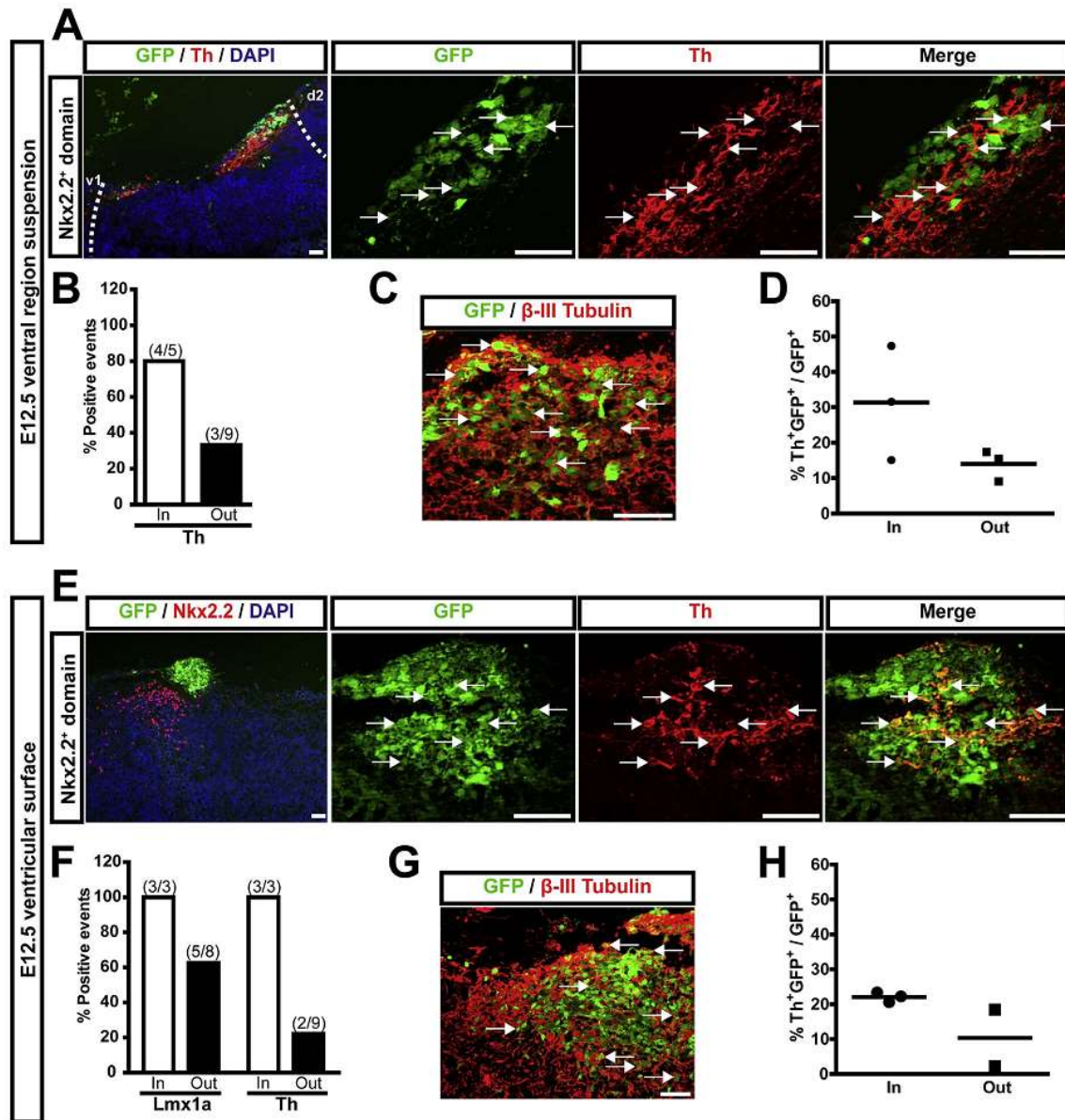


Fig. 5. The population of mDA NPCs committed diminish around E12.5. A suspension of whole ventral E12.5 midbrains was implanted in dorsal regions of midbrain explants. (A) Few implanted cells differentiated into Th⁺ neurons in Nkx2.2⁺ domain (arrows). Dotted lines mark border of v1 and d2 domains. (B) Quantification of transplantation events with Lmx1a⁺ or Th⁺ cells derived from implanted cells “in” and “out” the mDA niche. (C) Most implanted (GFP⁺) NPCs differentiated into immature neurons β -III Tubulin⁺ (arrows). (D) Quantification of Th⁺ neurons generated from implanted cells “in” and “out” the mDA niche. (E) Cells of the ventricular surface of ventral E12.5 midbrains were implanted in midbrain explants. NPCs did not re-specified (i.e., no Nkx2.2⁺ cells were found) and few differentiated into Th⁺ neurons in dorsal regions (arrows). (F) Quantification of transplantation events with Lmx1a⁺ or Th⁺ cells derived from implanted cells. (G) Implanted NPCs differentiated into β -III Tubulin⁺ (arrows). (H) Quantification of differentiation efficiency “in” and “out” the mDA niche. Implanted cells differentiated into Th⁺ neurons in the mDA niche is shown in Fig. S4. Scale bar 50 μ m.

3.4. mDA progenitors and immature neurons can survive and differentiate in an adult environment

The environment of the embryonic explant could still influence DA differentiation and mask the actual commitment state of vmNPCs. Thus, we evaluated their differentiation potential in the adult brain,

where neurogenic and specification signals are lacking or reduced. We transplanted cells of E10.5 and E12.5 ventral mesencephalons to the striatum and to the substantia nigra, which we have recently shown own low and high permissiveness for neuronal differentiation, respectively (Maya-Espinosa et al., 2015). Regardless of the host region, six days after transplantation a significant number of transplanted me-

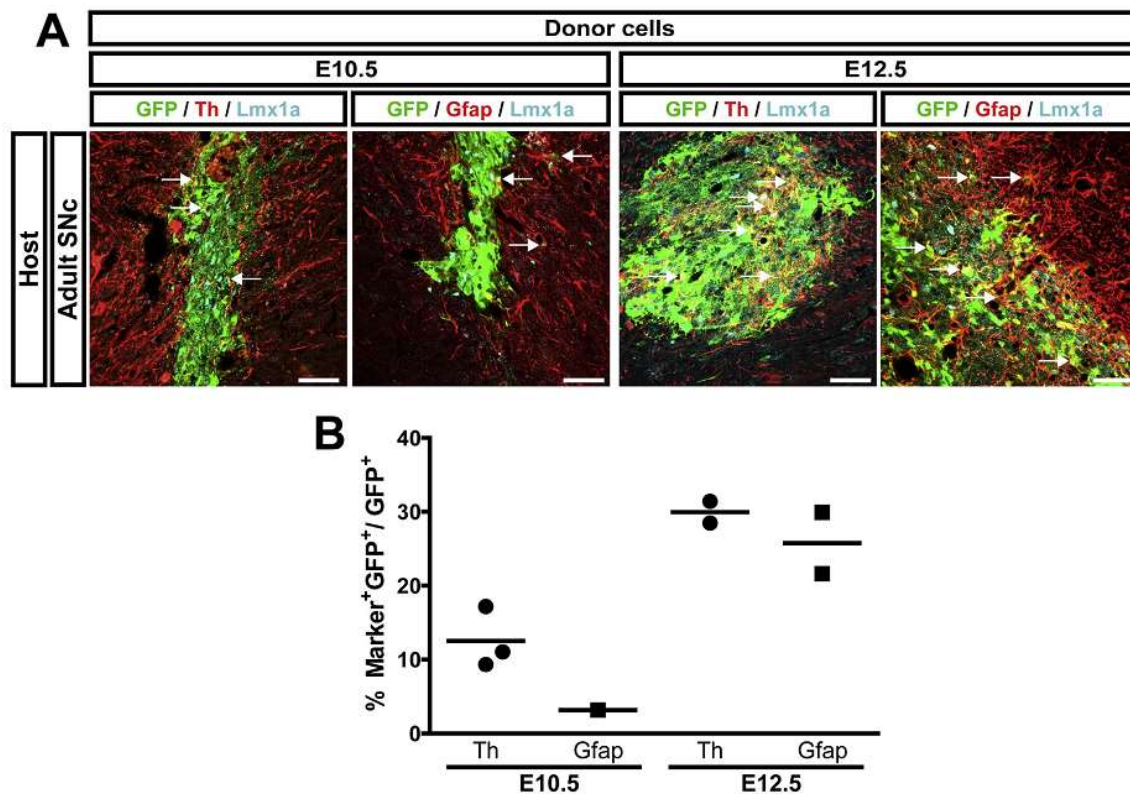


Fig. 6. mDA NPCs differentiate and immature neurons survive in the adult substantia nigra. (A) A suspension of whole ventral midbrains from E10.5 or E12.5 embryos (donor cells) was transplanted to the adult rat substantia nigra (SN; host). After six days, many cells showed Lmx1a presence and several Th⁺ neurons were found in transplants from both populations (arrows). E12.5 NPCs differentiated into astrocytes Gfap⁺ (arrows, right panel) while very few Gfap⁺ cells were obtained from E10.5 NPCs (left panel). (B) Quantification of Th⁺ neurons found in transplants from both populations. Each point represents one transplanted substantia nigra. Scale bar 50 μ m.

sencephalic cells from either E10.5 or E12.5 embryos showed *Lmx1a* expression (Fig. 6A and data not shown). Th⁺ neurons were detected in all cases but a higher proportion was determined in transplants of E12.5 than of E10.5 cells (Fig. 6B). Therefore, the differentiation potential displayed by E10.5 cells in the adult brain is in agreement with the previous experiments with explants, but the higher proportion of mDA neurons derived from E12.5 mesencephalic cells suggest that progenitors or immature neurons can survive and continue their differentiation in the adult brain.

3.5. The astrogenic potential is an intrinsic property of vmNPCs after DA differentiation

The above transplant-to-explant experiments showed that, independent of the DA potential, vmNPCs from any of the stages tested revealed neurogenic potential in ectopic sites (i.e., in all cases β -III Tubulin⁺ neurons were detected). However, the capacity for differentiation into astrocytes could not be evaluated in those experiments, because the E10.5 explant is not a suitable environment for astrocytic differentiation (Baizabal and Covarrubias, 2009). Interestingly, transplantations done into the adult brain showed astrocytic differentiation of ventral mesencephalic cells of E12.5 but not of E10.5 embryos, determined by the presence of cells expressing the astrocytic marker Gfap (Fig. 6).

To evaluate the astrogenic potential of NPCs in the mDA niche, we treated cultures of mesencephalic explants from embryos at different

developmental stages with Fgf2 and/or LIF, two growth factors known to promote astrocytic differentiation (Morrow et al., 2001; Song and Ghosh, 2004). Consistent with the idea that precursors change their neurogenic-to-astrogenic potential as development proceeds (Rowitch and Kriegstein, 2010), mesencephalic explants from E9.5 embryos were insensitive to the treatment with Fgf2 and/or LIF (data not show), whereas those from E10.5 (Fig. S6A) and E11.5 embryos responded to the treatment giving rise to Gfap⁺ cells. This response was stronger with Fgf2+LIF and in E11.5 explants (Fig. 7A-B). Most Gfap⁺ cells in E11.5 explants were also Nestin⁺ (Fig. 7C, left panel) indicating that they had not reached terminal differentiation in these conditions. It is of note that Gfap⁺ cells were mostly found in dorsal regions of explants, and only in cases with high induction also in the mDA niche. In addition, it is apparent that Gfap⁺ cells in the mDA niche maintained Lmx1a, which indicates that they emerged from specified mDA NPCs (Fig. 7C, right panel). No obvious differences were observed in Nestin⁺ or β -III Tubulin⁺ cells among the treatments (Fig. S6C).

The inability of vmNPCs to efficiently differentiate into astrocyte in previous experiments could be due to the presence of factors that inhibit astrocytic differentiation in the context of the tissue. Therefore, we evaluated the astrogenic potential of NPCs in monolayer cultures. Since primary NPCs in long-term cultures in the presence Fgf2 lose neuronal and gain astrogenic potential (Anderson et al., 2007; Chang et al., 2004), we decided to compare the original astrogenic potential of vmNPCs in freshly seeded cultures (i.e., one day after seeding) treated for 2 days with growth factors. E10.5 primary cells showed no

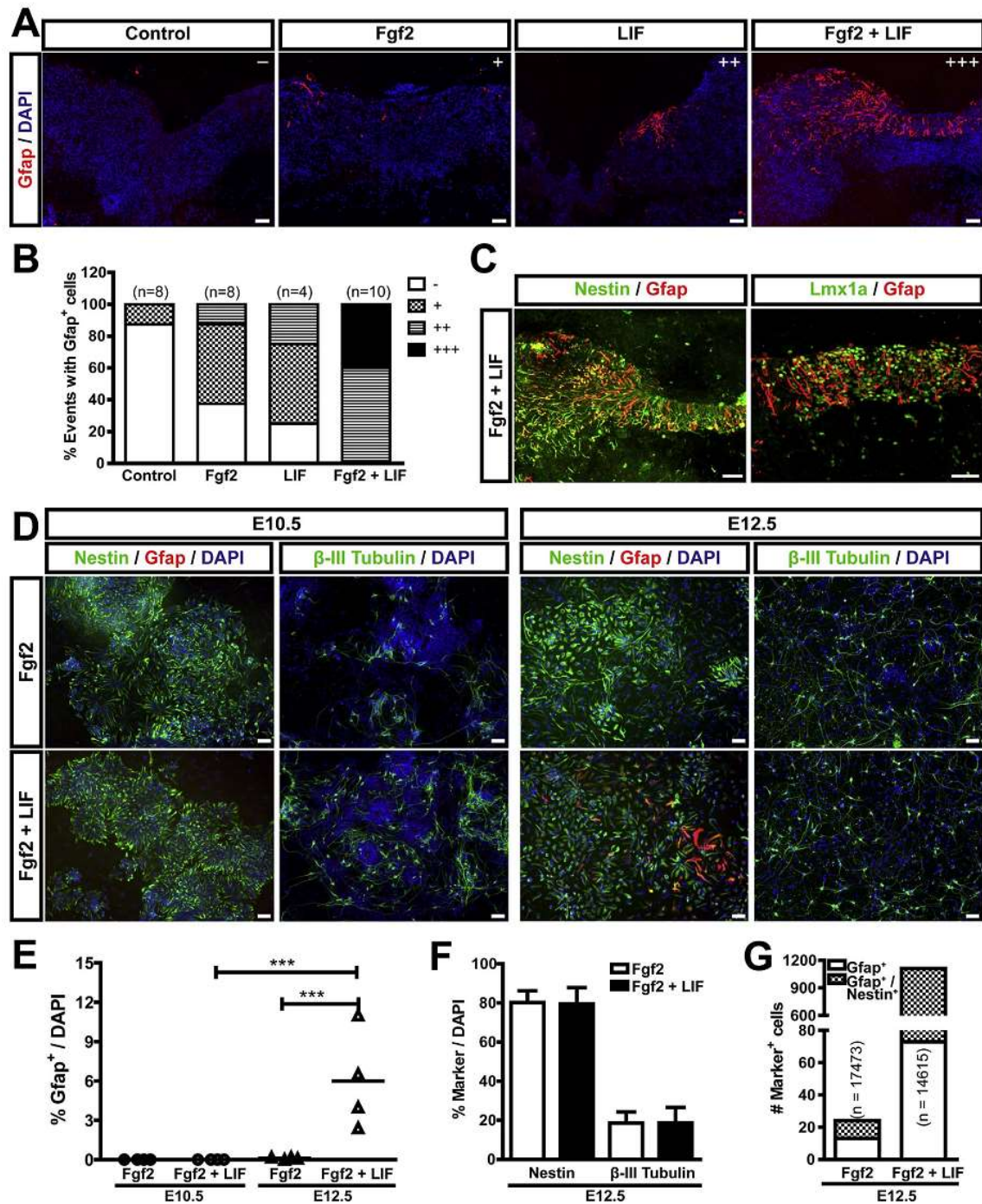


Fig. 7. “Late” mDA NPCs show capacity to differentiate into astrocytes in contrast with “early” NPCs. (A) E11.5 midbrain explants were cultured with Fgf2, LIF or both for 6 days. Different degrees of astrogenic induction were observed (–, no Gfap+ cells; +, very few Gfap+ cells; ++, few Gfap+ cells mostly in medial and dorsal regions; +++, many Gfap+ cells including some in ventral regions). (B) Quantification of cases with different degree of astrogenic differentiation (n = number of explants). (C) Gfap+ cells colocalize with Nestin (left panel), and few Lmx1a+/Gfap+ cells were found (right panel). (D) Ventral midbrain NPCs from E10.5 and E12.5 embryos were cultivated for 2 days in astrogenic conditions. Images show the presence of Nestin+ NPCs and immature neurons β-III Tubulin+. No generation of Gfap+ cells were observed in E10.5 (left panels) but some Gfap+ cells appeared in E12.5 (right panels). (E) Quantification of Gfap+ cells in cultures from E10.5 and E12.5 ventral midbrains. Asterisks mean significant difference (p < 0.001). Each point represents the mean of each independent experiment done. (F) Quantification of Nestin+ and β-III Tubulin+ cells in E12.5 NPC cultures; values are shown as mean ± SD. (G) Quantification of Gfap+/Nestin+ in E12.5 NPC cultures (n = number of cells counted). Scale bar 50 μm.

induction of astrogenesis in any culture condition (Fgf2, or Fgf2+LIF; Fig. 7D, left panel), whereas some cells expressing Gfap were found in cultures from E12.5 midbrains in the presence of LIF ($5.98 \pm 3.75\%$, Gfap⁺ cells; Fig. 7D-E). As in the explants, most of these Gfap⁺ cells were not fully differentiated into astrocytes as they maintained the NPC marker Nestin (Fig. 7G). No differences were noted in the number of Nestin⁺ or β -III Tubulin⁺ cells in the different condition analyzed (Fig. 7F). Taking all these data together, the astrogenic potential is an intrinsic property gained by vmNPCs since E11.5, but factors that promote terminal differentiation arise at later stages.

4. Discussion

Two relevant decisions need to take place to give rise specific neurons. During early neurulation, epiblastic cells gain the potential to differentiate into neurons (i.e., NPCs); this property is transient, since after neurogenesis these cells mainly differentiate into glial cells. Concomitantly, NPCs need to be instructed such that the neurons derived after differentiation have the proper characteristics needed for their function in the brain (e.g., specific neurotransmitter, receptors and axon projections). mDA neuron development starts at around E8.5, when NPCs are established in the midbrain, but specified DA cells can be clearly identified at E9.5 in ventral mesencephalon when they express a well-defined code of markers and are dividing extensively. Next, after E10.5, they exit the cell cycle giving rise to intermediate progenitors that differentiate into mDA neurons, evident at E11.5; these neurons rapidly accumulate in the basal zone where they begin to mature and migrate.

Our current knowledge about in vivo mDA differentiation mostly derives from the characterization of gene expression patterns within the ventral mesencephalic niche. Recently, single-cell RNA-sequencing during mDA differentiation (from E10.5 to E13.5) identify different cell populations in the ventral mesencephalon, some of which belong to the mDA lineage (Kee et al., 2017; La Manno et al., 2016). These populations include a single mDA progenitor type located in the ventricular zone of E11.5 ventral mesencephalons that expresses *Msx1*. In addition, based in the expression of genes that are markers of astrocyte precursors (e.g., *Slc6a11*, *Tnc*, *Aldoc*), radial glial-like cells that may be initiating gliogenesis were detected since E11.5 (La Manno et al., 2016). Different neuroblast populations were also detected including two major intermediates, possibly corresponding to those proposed in a mathematical model of mDA differentiation (Trujillo-Paredes et al., 2016), a single early mDA neuroblast type (Igfbp1⁺, NeuroD1⁺, Neurog2⁺, Nr4a2⁺, Pitx3⁺) that derives into another neuroblast (Igfbp1⁺, NeuroD1⁺, Neurog2⁺, Nr4a2⁺, Pitx3⁺) before *Th* expression starts to be detected in, apparently, three distinct types of immature mDA neurons (La Manno et al., 2016). Null mutations in some of the genes detected have been produced in mice and, accordingly, show to affect mDA differentiation (Andersson et al., 2006a, 2006b; Kele et al., 2006; Nunes et al., 2003; Saucedo-Cardenas et al., 1998; Smidt et al., 2004; Smits et al., 2003). Despite this detailed knowledge about the molecular network directing mDA neuronal development, the actual differentiation potential and commitment of the mDA differentiating cells is still unclear.

Here, we took advantage of the re-specification power of the milieu present in the E10.5 mesencephalic explant (Baizabal et al., 2010) to determine how vmNPCs change their mDA differentiation potential as development proceeds. We found that E9.5 vmNPCs failed to re-specify when implanted along different areas out of the dopaminergic niche and the commitment to differentiate into mDA neurons was also not attained. Interestingly, progeny of these NPCs retained *Lmx1a* expression when implanted in ectopic regions, and efficiently differentiated into β -III Tubulin⁺ neurons, but rarely acquired *Th* expression. These observations contrast with most studies showing coupling between neurogenesis and acquisition of molecular characteristics of a particular neuronal type, especially at early stages of differentiation

(Trujillo-Paredes et al., 2016; Yun et al., 2002). Actually, despite the fact mDA specification factors appear to regulate proneural genes such as *Neurog2*, (Andersson et al., 2006a, 2006b; Ferri et al., 2007; Omodei et al., 2008; Ono et al., 2010; Puelles et al., 2004) and mDA differentiation genes such as *Nr4a2* (Chung et al., 2009; Ferri et al., 2007), our data suggest that extrinsic factors in the mDA niche are required to keep the coupling between neurogenesis and DA differentiation. At the present time, our experiments exclude *Shh* as the missing factor in dorsal regions though, interestingly, it contributes to vmNPC maintenance in ectopic sites.

The presence of DA inhibitory factors in non-DA mesencephalic domains could also prevent the termination of E9.5 vmNPCs differentiation, but the fact that E10.5-E11.5 vmNPCs can differentiate within the diversity of active niches present in E9.5-E10.5 explants (Baizabal and Covarrubias, 2009) makes unlikely this possibility. Alternatively, the recent discovery of NPCs in the rostral area of the *Lmx1a* domain that derive into glutamatergic neurons of the diencephalic STN (Kee et al., 2017) opens the possibility that they contributed to the *Lmx1a*⁺/*Th*⁻ neurons detected. Although the dissection of the ventral midbrain performed in the present study left out most of the developing diencephalic area, it cannot be excluded that some NPCs from this area were present in the transplanted cell population. However, when the NPC population was returned to the dopaminergic niche, more *Lmx1a*⁺/*Th*⁺ neurons emerged from E10.5 than from E9.5 NPCs (i.e., 50% vs. 20%; Figs. 2G, 4D, G), an expected pattern for mDA NPCs. Therefore, although this does not discard the possibility that diencephalic *Lmx1a*⁺ NPCs committed to become STN neurons were present in the transplanted E9.5 NPCs, it is rather likely that many of those that differentiated into *Lmx1a*⁺/*Th*⁻ neurons in the dorsal region were actually mDA NPCs that could not complete the specific differentiation.

In contrast with vmNPCs of E9.5 embryos, those of E10.5 and E11.5 contained NPCs with full commitment to become *Th*⁺ neurons in ectopic sites, which number decreased by E12.5 (Fig. 8A). Single-cell gene expression patterns indicate that ventricular NPCs with mDA potential are very similar from E10.5 to E12.5 (La Manno et al., 2016). Unfortunately, similar transcriptomic data are not available for E9.5 vmNPCs, yet many genes are known to be common with those of later stages, including some encoding transcription factors essential for mDA specification (i.e., *Lmx1a/b*, *Otx2*, *Foxa1/2*, *Ferd31*, *Dmrt5*) (Andersson et al., 2006a, 2006b; Ferri et al., 2007; Gennet et al., 2011; Omodei et al., 2008; Ono et al., 2010). On the other hand, during acquisition of mDA commitment in the transit from E9.5 to E10.5, *Nr1h2/3* (Liver X receptors β and α , respectively) are expressed in the ventricular zone of the ventral midbrain; interestingly, their expression markedly upregulates at E10.5 and the levels decrease in the following days (Sacchetti et al., 2009), in concurrence with the exhaustion of committed mDA NPCs. Accordingly, *Nr1h2/3* gain of function promotes DA differentiation and suppress glial differentiation in part through upregulation of *Neurog2* expression. Therefore, the committed NPCs detected here may be transient cells actively giving birth to *Neurog2*⁺ progenitors.

Some studies have pointed out the *Neurog2*⁺ progenitor population in ventral midbrain as the source of committed mDA NPCs (Jonsson et al., 2009; Thompson et al., 2006). In agreement with this, we observed that E12.5 vmNPCs containing this population derive into many *Th*⁺ neurons in the adult brain. However, since the same population transplanted to E10.5 explants poorly contribute to the *Th*⁺ neurons detected, it is apparent that the *Neurog2*⁺ cells are unable to implant following the transplant to explant protocol. In addition, *Neurog2*⁺ cells could not be the direct source of the abundant number of *Th*⁺ neurons derived from E10.5 vmNPCs transplanted to the adult brain, not only because few of them are present at this stage, but also because they efficiently contribute to the ectopic *Th*⁺ neurons after transplantation to the E10.5 explant. These observations are consistent with a selective integration of cells through the ventricular side of

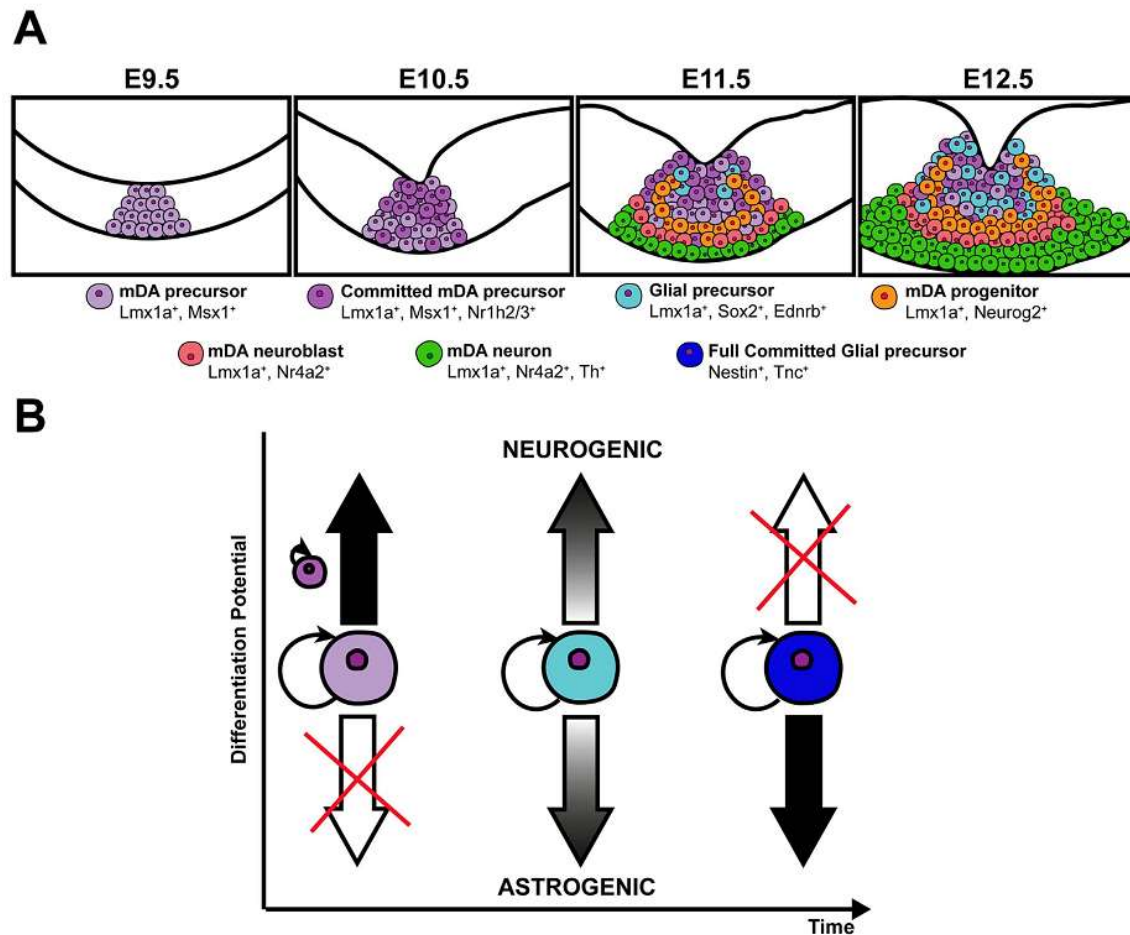


Fig. 8. Model of NPCs commitment during mDA differentiation. (A) At E9.5 mDA niche is composed of specified NPCs (Lmx1a⁺Msx1⁺) actively proliferating. By E10.5 most NPCs are transiting to the committed mDA fate and some start to be detected (Lmx1a⁺Msx1⁺Nr1h2/3⁺). Consequently, at E11.5 the mDA niche is now composed of specified (Lmx1a⁺Msx1⁺) and committed NPCs (Lmx1a⁺Msx1⁺Nr1h2/3⁺), which are actively deriving into progenitors (Lmx1a⁺Neurog2⁺), neuroblast (Lmx1a⁺Nr4a2⁺), and neurons (Lmx1a⁺Nr4a2⁺Th⁺); at this stage, NPCs, possible derived from the same DA NPCs start to acquire gliogenic potential (Lmx1a⁺Sox2⁺Ednr^b). At E12.5 mDA neurogenesis reach its peak, Th⁺ neurons accumulate rapidly, committed mDA NPCs begin to decrease and gliogenic NPCs continue to proliferate. (B) Throughout development, distinct types of NPCs emerge in the mDA niche. Early NPCs can only generate neurons even in presence of gliogenic signals and, as differentiation proceeds become committed to the mDA phenotype. Then, gliogenic NPCs emerge but they maintain some neurogenic potential that can be detected in culture conditions. Later in development, gliogenic NPCs lose their remaining neurogenic properties and become fully committed to the gliogenic fate.

explants, such that only ventricular-like NPCs have the capacity to interact with the explant surface and subventricular progenitors are passively excluded. In agreement with the capacity of actively proliferating cells for ventricle wall integration (Campbell et al., 1995; Cattaneo et al., 1994), cell aggregation experiments show association between ventricular cells, whereas other more differentiated cells rarely were found within aggregates. Therefore, the committed vmNPCs population referred above in E10.5 and E11.5 is a distinct upstream NPC population to the Neurog2⁺ progenitors. It is relevant to mention that, in agreement with previous reports (Lacomme et al., 2012; Thompson et al., 2006), high Neurog2⁺ cells are non-expandable postmitotic progenitors.

It is well documented that as neurogenesis extinguishes, astrogenesis emerges as the major fate of NPCs (Panchision and McKay, 2002). Gene expression detects cells with astrocytic markers in the DA niche at late phases of neuronal differentiation (La Manno et al., 2016), however, it is not clear whether this is due to the rise of input factors

that promotes astrocytic differentiation of NPCs or an intrinsic property gained by ventricular NPCs before actual astrocytic differentiation. We found that vmNPCs before E11.5 are refractory to initiate astrogenesis in two settings: when transplanted to the adult brain environment or after exposing them to astrogenic factors (Fgf2 and/or LIF). In contrast, E12.5 NPCs can differentiate into astrocytes in those conditions.

The gain in gliogenic potential through development has been observed in cortical progenitor, where CNTF or LIF has no astrogenic inductive effect in E12.5 NPCs but efficiently instructs E14.5 NPCs (Johe et al., 1996). This gain in astrogenic capacity has been associated with the demethylation of a *Gfap* promoter region (Fan et al., 2005; Takizawa et al., 2001). It is apparent that the gain in astrogenic potential is a default property of most embryonic NPCs, as it can be estimated in different culture conditions (Anderson et al., 2007; Chang et al., 2004; Qian et al., 2000). Cultured NPCs, although reduced, still retain the capacity to differentiate into neurons, but even in the

neurogenic environment of embryonic explants they behave as committed to the astrocytic fate (Baizabal et al., 2012). Taken together these observations, the common model of a bipotent NPC capable of giving rise to neurons and glial cells cannot be sustained and, rather, early NPCs are only capable of giving rise to neurons, and the late NPC progeny progressively gets committed to the astrocytic fate (Fig. 8B).

In conclusion, mDA neuronal commitment seems to be a transient property of vmNPCs that it is followed by the generation of committed postmitotic progenitors and proliferating astrogenic NPCs (Fig. 8). Expansion of committed NPCs to a specific neuronal fate has not been achieved up to date. Of note is that common attempts to culture committed mDA NPCs have been done at late phases of differentiation when few dividing NPCs with neurogenic potential remain (Bang et al., 2015; Chung et al., 2006; Meyer et al., 2012; Yan et al., 2001). In this work, we have characterized functionally the differentiation potential of vmNPCs during mDA differentiation, disclosing their specified and committed identity. Consistent with our results, vmNPCs from rat E12 embryos (equivalent to mouse E10.5) can be expanded for 7 days, differentiate and produce Th⁺ neurons and very few astrocytes (Studer et al., 1998). Furthermore, early NPCs seem to have a broad plasticity that, as described here, only once neurogenesis is initiated, commitment can be detected. Therefore, future efforts need to be done to establish whether it is possible to maintain dividing NPCs with high neurogenic capacity and with the *in vivo* identity that warrants specific mDA differentiation.

Acknowledgements

We are grateful to Concepción Valencia, Andrés Saralegui, Elizabeth Mata, Graciela Cabeza and Rubén Blancas for their technical assistance; and, to all members of the Covarrubias' group for the inquisitive comments along the accomplishment of the work presented. We also want to recognize that some experiments done here were motivated by observations from experiments performed by L.C. in Andras Nagy's laboratory (work partly supported by a DGAPA-UNAM fellowship). The present work was supported by grant [131031] from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) and IMPULSA2-UNAM. G.G.-F., A. B-P and O. C-N were recipients of a CONACyT fellowship for graduate studies.

Appendix A. Supporting information

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at doi:10.1016/j.ydbio.2017.07.008.

References

- Alvarado-Mallart, R.M., Martínez, S., Lances-Jones, C.C., 1990. Pluripotentiality of the 2-day-old avian germinative neuroepithelium. *Dev. Biol.* 139, 75–88.
- Anderson, L., Burnstein, R.M., He, X., Luce, R., Furlong, R., Foltynic, T., Sykacek, P., Menon, D.K., Caldwell, M.A., 2007. Gene expression changes in long term expanded human neural progenitor cells passaged by chopping lead to loss of neurogenic potential *in vivo*. *Exp. Neurol.* 204, 512–524.
- Andersson, E., Jensen, J.B., Parmar, M., Guillemot, F., Björklund, A., 2006a. Development of the mesencephalic dopaminergic neuron system is compromised in the absence of neurogenin 2. *Development* 133, 507–516.
- Andersson, E., Tryggvason, U., Deng, Q., Friling, S., Alekseenko, Z., Robert, B., Perlmann, T., Ericson, J., 2006b. Identification of intrinsic determinants of midbrain dopamine neurons. *Cell* 124, 393–405.
- Baizabal, J.M., Covarrubias, L., 2009. The embryonic midbrain directs neuronal specification of embryonic stem cells at early stages of differentiation. *Dev. Biol.* 325, 49–59.
- Baizabal, J.M., Valencia, C., Guerrero-Flores, G., Covarrubias, L., 2010. Telencephalic neural precursor cells show transient competence to interpret the dopaminergic niche of the embryonic midbrain. *Dev. Biol.* 349, 192–203.
- Baizabal, J.M., Cano-Martinez, A., Valencia, C., Santa-Olalla, J., Young, K.M., Rietze, R.L., Bartlett, P.F., Covarrubias, L., 2012. Glial commitment of mesencephalic neural precursor cells expanded as neurospheres precludes their engagement in niche-dependent dopaminergic neurogenesis. *Stem Cells Dev.* 21, 1047–1058.
- Bang, A.G., Goulding, M.D., 1996. Regulation of vertebrate neural cell fate by transcription factors. *Curr. Opin. Neurobiol.* 6, 25–32.
- Bang, S.Y., Kwon, S.H., Yi, S.H., Yi, S.A., Park, E.K., Lee, J.C., Jang, C.G., You, J.S., Lee, S.H., Han, J.W., 2015. Epigenetic activation of the Foxa2 gene is required for maintaining the potential of neural precursor cells to differentiate into dopaminergic neurons after expansion. *Stem Cells Dev.* 24, 520–533.
- Campbell, K., Olsson, M., Björklund, A., 1995. Regional incorporation and site-specific differentiation of striatal precursors transplanted to the embryonic forebrain ventricle. *Neuron* 15, 1259–1273.
- Cattaneo, E., Magrassi, L., Butti, G., Santi, L., Giavazzi, A., Pezzotta, S., 1994. A short term analysis of the behaviour of conditionally immortalized neuronal progenitors and primary neuroepithelial cells implanted into the fetal rat brain. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 83, 197–208.
- Chang, M.Y., Park, C.H., Lee, S.Y., Lee, S.H., 2004. Properties of cortical precursor cells cultured long term are similar to those of precursors at later developmental stages. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 153, 89–96.
- Chen, J.K., Taipale, J., Young, K.E., Maiti, T., Beachy, P.A., 2002. Small molecule modulation of *Smoothed* activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 14071–14076.
- Chung, S., Shin, B.S., Hwang, M., Lardaro, T., Kang, U.J., Isaacson, O., Kim, K.S., 2006. Neural precursors derived from embryonic stem cells, but not those from fetal ventral mesencephalon, maintain the potential to differentiate into dopaminergic neurons after expansion *in vitro*. *Stem Cells* 24, 1583–1593.
- Chung, S., Leung, A., Han, B.S., Chang, M.Y., Moon, J.I., Kim, C.H., Hong, S., Pruszek, J., Isaacson, O., Kim, K.S., 2009. *Wnt1-lmx1a* forms a novel autoregulatory loop and controls midbrain dopaminergic differentiation synergistically with the *SHH-FoxA2* pathway. *Cell Stem Cell* 5, 646–658.
- Fan, G., Martinovich, K., Chin, M.H., He, F., Fouse, S.D., Hutnick, L., Hattori, D., Ge, W., Shen, Y., Wu, H., ten Hoeve, J., Shuai, K., Sun, Y.E., 2005. DNA methylation controls the timing of astroglialogenesis through regulation of JAK-STAT signaling. *Development* 132, 3345–3356.
- Ferri, A.L., Lin, W., Mavromatakis, Y.E., Wang, J.C., Sasaki, H., Whitsett, J.A., Ang, S.L., 2007. Foxa1 and Foxa2 regulate multiple phases of midbrain dopaminergic neuron development in a dosage-dependent manner. *Development* 134, 2761–2769.
- Fishell, G., 1995. Striatal precursors adopt cortical identities in response to local cues. *Development* 121, 803–812.
- Frank-Kamenetsky, M., Zhang, X.M., Bottega, S., Guicherit, O., Wichterle, H., Dudek, H., Bumcrot, D., Wang, F.Y., Jones, S., Shulok, J., Rubin, L.L., Porter, J.A., 2002. Small-molecule modulators of Hedgehog signaling: identification and characterization of *Smoothed* agonists and antagonists. *J. Biol. Chem.* 277, 10377–10384.
- Gardner, C.A., Barald, K.F., 1991. The cellular environment controls the expression of engrailed-like protein in the cranial neuroepithelium of quail-chick chimeric embryos. *Development* 113, 1037–1048.
- Gennet, N., Gale, E., Nan, X., Farley, E., Takacs, K., Oberwallner, B., Chambers, D., Li, M., 2011. Doublesex and mab-3-related transcription factor 5 promotes midbrain dopaminergic identity in pluripotent stem cells by enforcing a ventral-medial progenitor fate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108, 9131–9136.
- Grapin-Botton, A., Bonnin, M.A., Le Douarin, N.M., 1997. Hox gene induction in the neural tube depends on three parameters: competence, signal supply and paralogous group. *Development* 124, 849–859.
- Hirabayashi, Y., Gotoh, Y., 2010. Epigenetic control of neural precursor cell fate during development. *Nat. Rev. Neurosci.* 11, 377–388.
- Hynes, M., Porter, J.A., Chiang, C., Chang, D., Tessier-Lavigne, M., Beachy, P.A., Rosenthal, A., 1995. Induction of midbrain dopaminergic neurons by Sonic hedgehog. *Neuron* 15, 35–44.
- Itasaki, N., Sharpe, J., Morrison, A., Krumlauf, R., 1996. Reprogramming Hox expression in the vertebrate hindbrain: influence of paraxial mesoderm and rhombomere transposition. *Neuron* 16, 487–500.
- Johe, K.K., Hazel, T.G., Muller, T., Dugich-Djordjevic, M.M., McKay, R.D., 1996. Single factors direct the differentiation of stem cells from the fetal and adult central nervous system. *Genes Dev.* 10, 3129–3140.
- Jonsson, M.E., Ono, Y., Björklund, A., Thompson, L.H., 2009. Identification of transplantable dopamine neuron precursors at different stages of midbrain neurogenesis. *Exp. Neurol.* 219, 341–354.
- Kee, N., Volakakis, N., Kirkeby, A., Dahl, L., Stovall, H., Nollbrant, S., Lahti, L., Björklund, A.K., Gillberg, L., Joodmardi, E., Sandberg, R., Parmar, M., Perlmann, T., 2017. Single-cell analysis reveals a close relationship between differentiating dopamine and subthalamic nucleus neuronal lineages. *Cell Stem Cell* 20, 29–40.
- Kele, J., Simplicio, N., Ferri, A.L., Mira, H., Guillemot, F., Arenas, E., Ang, S.L., 2006. Neurogenin 2 is required for the development of ventral midbrain dopaminergic neurons. *Development* 133, 495–505.
- La Manno, G., Gyllborg, D., Codeluppi, S., Nishimura, K., Salto, C., Zeisel, A., Borm, L.E., Stott, S.R., Toledo, E.M., Villaescusa, J.C., Lonnerberg, P., Ryge, J., Barker, R.A., Arenas, E., Linnarsson, S., 2016. Molecular diversity of midbrain development in mouse, human, and stem cells. *Cell* 167, 566–580, (e519).
- Lacomme, M., Liaubet, L., Pituello, F., Bel-Vialar, S., 2012. *NEUROG2* drives cell cycle exit of neuronal precursors by specifically repressing a subset of cyclins acting at the G1 and S phases of the cell cycle. *Mol. Cell. Biol.* 32, 2596–2607.
- Maya-Espinosa, G., Collazo-Navarrete, O., Millan-Aldaco, D., Palomero-Rivero, M., Guerrero-Flores, G., Drucker-Colin, R., Covarrubias, L., Guerra-Crespo, M., 2015. Mouse embryonic stem cell-derived cells reveal niches that support neuronal differentiation in the adult rat brain. *Stem Cells* 33, 491–502.
- Meyer, A.K., Jarosch, A., Schurig, K., Nuesslein, I., Kissenkötter, S., Storch, A., 2012. Fetal mouse mesencephalic NPCs generate dopaminergic neurons from post-mitotic precursors and maintain long-term neural but not dopaminergic potential *in vitro*. *Brain Res.* 1474, 8–18.
- Morrow, T., Song, M.R., Ghosh, A., 2001. Sequential specification of neurons and glia by developmentally regulated extracellular factors. *Development* 128, 3585–3594.
- Nunes, I., Tovmasian, L.T., Silva, R.M., Burke, R.E., Goff, S.P., 2003. *Pitx3* is required for

- development of substantia nigra dopaminergic neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 4245–4250.
- Olsson, M., Campbell, K., Turnbull, D.H., 1997. Specification of mouse telencephalic and mid-hindbrain progenitors following heterotopic ultrasound-guided embryonic transplantation. *Neuron* 19, 761–772.
- Olsson, M., Bjerregaard, K., Winkler, C., Gates, M., Bjorklund, A., Campbell, K., 1998. Incorporation of mouse neural progenitors transplanted into the rat embryonic forebrain is developmentally regulated and dependent on regional and adhesive properties. *Eur. J. Neurosci.* 10, 71–85.
- Omodei, D., Acampora, D., Mancuso, P., Prakash, N., Di Giovannantonio, L.G., Wurst, W., Simeone, A., 2008. Anterior-posterior graded response to Otx2 controls proliferation and differentiation of dopaminergic progenitors in the ventral mesencephalon. *Development* 135, 3459–3470.
- Ono, Y., Nakatani, T., Sakamoto, Y., Mizuhara, E., Minaki, Y., Kumai, M., Hamaguchi, A., Nishimura, M., Inoue, Y., Hayashi, H., Takahashi, J., Imai, T., 2007. Differences in neurogenic potential in floor plate cells along an anteroposterior location: midbrain dopaminergic neurons originate from mesencephalic floor plate cells. *Development* 134, 3213–3225.
- Ono, Y., Nakatani, T., Minaki, Y., Kumai, M., 2010. The basic helix-loop-helix transcription factor Noto3 controls neurogenic activity in mesencephalic floor plate cells. *Development* 137, 1897–1906.
- Panchision, D.M., McKay, R.D., 2002. The control of neural stem cells by morphogenic signals. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 12, 478–487.
- Puelles, E., Annino, A., Tuorto, F., Usiello, A., Acampora, D., Czerny, T., Brodski, C., Ang, S.-L., Wurst, W., Simeone, A., 2004. Otx2 regulates the extent, identity and fate of neural progenitor domains in the ventral midbrain. *Development* 131, 2037–2048.
- Qian, X., Shen, Q., Goderie, S.K., He, W., Capela, A., Davis, A.A., Temple, S., 2000. Timing of CNS cell generation: a programmed sequence of neuron and glial cell production from isolated murine cortical stem cells. *Neuron* 28, 69–80.
- Rowitch, D.H., Kriegstein, A.R., 2010. Developmental genetics of vertebrate glial-cell specification. *Nature* 468, 214–222.
- Sacchetti, P., Sousa, K.M., Hall, A.C., Liste, I., Steffensen, K.R., Theofilopoulos, S., Parish, C.L., Hazenberg, C., Richter, L.A., Hovatta, O., Gustafsson, J.A., Arenas, E., 2009. Liver X receptors and oxysterols promote ventral midbrain neurogenesis in vivo and in human embryonic stem cells. *Cell Stem Cell* 5, 409–419.
- Sasaki, H., Hui, C., Nakafuku, M., Kondoh, H., 1997. A binding site for Gli proteins is essential for HNF-3beta floor plate enhancer activity in transgenics and can respond to Shh in vitro. *Development* 124, 1313–1322.
- Saucedo-Cardenas, O., Quintana-Hau, J.D., Le, W.D., Smidt, M.P., Cox, J.J., De Mayo, F., Burbach, J.P., Conneely, O.M., 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. USA* 95, 4013–4018.
- Smidt, M.P., Smits, S.M., Bouwmeester, H., Hamers, F.P., van der Linden, A.J., Hellemons, A.J., Graw, J., Burbach, J.P., 2004. Early developmental failure of substantia nigra dopamine neurons in mice lacking the homeodomain gene Pitx3. *Development* 131, 1145–1155.
- Smits, S.M., Ponnio, T., Conneely, O.M., Burbach, J.P., Smidt, M.P., 2003. Involvement of Nurr1 in specifying the neurotransmitter identity of ventral midbrain dopaminergic neurons. *Eur. J. Neurosci.* 18, 1731–1738.
- Song, M.R., Ghosh, A., 2004. FGF2-induced chromatin remodeling regulates CNTF-mediated gene expression and astrocyte differentiation. *Nat. Neurosci.* 7, 229–235.
- Studer, L., Tabar, V., McKay, R.D., 1998. Transplantation of expanded mesencephalic precursors leads to recovery in parkinsonian rats. *Nat. Neurosci.* 1, 290–295.
- Takahashi, T., Nowakowski, R.S., Caviness, V.S., Jr., 1993. Cell cycle parameters and patterns of nuclear movement in the neocortical proliferative zone of the fetal mouse. *J. Neurosci.* 13, 820–833.
- Takizawa, T., Nakashima, K., Namihira, M., Ochiai, W., Uemura, A., Yanagisawa, M., Fujita, N., Nakao, M., Taga, T., 2001. DNA methylation is a critical cell-intrinsic determinant of astrocyte differentiation in the fetal brain. *Dev. Cell* 1, 749–758.
- Thompson, L.H., Andersson, E., Jensen, J.B., Barraud, P., Guillemot, F., Parmar, M., Bjorklund, A., 2006. Neurogenin2 identifies a transplantable dopamine neuron precursor in the developing ventral mesencephalon. *Exp. Neurol.* 198, 183–198.
- Trujillo-Paredes, N., Valencia, C., Guerrero-Flores, G., Arzate, D.M., Baizabal, J.M., Guerra-Crespo, M., Fuentes-Hernandez, A., Zea-Armenta, L., Covarrubias, L., 2016. Regulation of differentiation flux by Notch signalling influences the number of dopaminergic neurons in the adult brain. *Biol. Open* 5, 336–347.
- Yan, J., Studer, L., McKay, R.D., 2001. Ascorbic acid increases the yield of dopaminergic neurons derived from basic fibroblast growth factor expanded mesencephalic precursors. *J. Neurochem.* 76, 307–311.
- Ye, W., Shimamura, K., Rubenstein, J.L., Hynes, M.A., Rosenthal, A., 1998. FGF and Shh signals control dopaminergic and serotonergic cell fate in the anterior neural plate. *Cell* 93, 755–766.
- Yun, K., Fischman, S., Johnson, J., Hrabe de Angelis, M., Weinmaster, G., Rubenstein, J.L., 2002. Modulation of the notch signaling by Mash1 and Dix1/2 regulates sequential specification and differentiation of progenitor cell types in the subcortical telencephalon. *Development* 129, 5029–5040.

APENDICE. MEDIOS, SOLUCIONES Y PROCEDIMIENTOS GENERALES

Cultivo de Células Troncales Embriónicas (CTE) y Formación de Cuerpos Embrioides (CE)

1. *Dulbecco Modified Eagle Medium (DMEM) (Gibco)*

- Disolver el medio en polvo en aproximadamente 800 mL de H₂O grado cultivo mediante agitación suave.
- Añadir 3.7 g de NaHCO₃ (Sigma).
- Agitar hasta disolver (no sobre mezclar).
- Ajustar el pH a 6.9.
- Aforar a 1 L en un matraz volumétrico y mezclar por inversión.
- Esterilizar por filtración con una membrana de 0.22 µm.
- Guardar a 4°C.

2. *Suero Bovino Fetal (SBF) (Gibco o Hyclone)*

- Inactivar el suero calentándolo a 56°C por 30 min.
- Almacenar a -20°C. Después de descongelar mantener a 4°C por hasta 1 mes.

3. *GlutaMAX (Gibco) – Penicilina (Sigma) – Estreptomicina (Sigma) (GPS)*.

Para una solución 100X:

- A 10 mL de solución GlutaMAX (200mM) agregar 300 mg de penicilina y 500 mg de estreptomicina.
- Esterilizar la solución por filtración con membrana de 0.22 µm y agregarla al resto del contenido del GlutaMAX. Mezclar homogéneamente.
- Alicuotar y guardar a -20°C. Después de descongelar mantener a 4°C.

4. *Tripsina (Gibco) (0.25%)*

- Disolver en verseno (Gibco) la tripsina (Gibco) llevándola a 0.25% o 0.05%.
- Almacenar a 4°C.

5. *PBS*

Para 1 L de solución 1X:

- Agregar 8 g de NaCl (J. T. Baker), 0.2 g de KCl (Sigma), 1.44 g de Na₂HPO₄ (Sigma) y 0.24 g de KH₂PO₄ (Sigma) a 1 L de H₂O grado cultivo.
- Disolver agitando suavemente y esterilizar por filtración con membrana de 0.22 µm.
- Almacenar a temperatura ambiente por hasta 2 meses.

6. *Gelatina (Sigma) (1%)*

Para 300 mL:

- Agregar 3 g de gelatina en polvo en 300 mL de H₂O grado cultivo.
- Calentar hasta que se disuelva.
 - Filtrar con membrana de 0.22 µm.
- Almacenar a temperatura ambiente por hasta 2 meses.

7. *Mitomicina (Teva)*

Para preparar un stock 50X:

- Tomar 0.5 mL de PBS 1X con jeringa de 1 mL y clavarlo en la tapa de plástico del frasco de mitomicina (2 mg) para despresurizar e inyectar el PBS para empezar a disolver.
- Agregarlo al resto del PBS (3.5 mL) en un tubo falcon de 15 mL.
- Almacenar a 4°C en oscuridad.

8. Medio STO

- SFB (final 7%).
- GPS 100X (final 1X).
- Llevar al volumen deseado con DMEM.
- Almacenar a 4°C.

9. Medio de congelación 2X

- DMEM (final 60%)
- DMSO grado cultivo (Sigma) (final 20%)
- SFB (final 20%)

Cultivo de células STO

Las CTE crecen sobre una capa de células *feeders* (alimentadoras) que son células STO mitomizadas.

Para subcultivar las células:

- Cubrir las cajas de cultivo (de 6 a 10 cm de diámetro) con gelatina 0.1%. Distribuir bien la gelatina por toda la superficie de la caja e incubar a 37°C al menos 10 min (hasta 2 h). Aspirar la gelatina antes de sembrar las células.
- Aspirar el medio y lavar 2 veces con PBS 1X.
- Agregar 1 mL de tripsina 0.25% a una caja de 10 cm de diámetro. Repartir la tripsina por toda la superficie moviendo la caja.
- Cuando las células comiencen a desprenderse agregar al menos un volumen de medio STO para inactivar la tripsina y dispersar las células pipeteando suavemente.

- Transferir las células a un tubo estéril de 15 mL. Centrifugar a 1000 RPM por 5 min.
- Aspirar el sobrenadante, cuidando de no llevarse el pellet de células al final del tubo.
- Resuspender en una cantidad de medio STO fresco (aprox. 5 mL de medio). Tomar una alícuota y contar las células. (Ir a conteo de células en la cámara de Neubauer).
- Sembrar alrededor de 5×10^5 células en una caja de 10 cm de diámetro o bien sembrar 1/10 para mantener la línea, agregando 10 mL de medio STO.

Para preparar la monocapa de células *feeders*:

- Crecer las células STO a confluencia en cajas de 10 cm de diámetro con 10 mL de medio.
- Utilizar guantes y cubreboca. Agregar 1/50 de volumen (200 μ L) de mitomicina a 0.5mg/mL para inactivarlas mitóticamente. Incubar 2 h con la droga a 37°C.
- Aspirar el medio y lavar 2 veces con PBS 1X para eliminar la mitomicina.
- Agregar 1 mL de tripsina al 0.25% a caja de 10 cm de diámetro, repartir por toda la superficie y esperar a que se desprendan las células. Inactivar la tripsina añadiendo al menos un volumen de medio STO y dispersar las células pipeteando suavemente.
- Transferir a un tubo estéril de 15 mL. Centrifugar a 1000 RPM por 5 min.
- Aspirar el sobrenadante y resuspender las células en medio STO. Contar en la cámara de Neubauer.
- Sembrar las células en la siguiente proporción:

3x10⁶ células por caja de 10 cm de diámetro (12 mL de medio)

1x10⁶ células por caja de 6 cm de diámetro (4 mL de medio)

5x10⁵ células por caja de 3 cm de diámetro (2 mL de medio)

- Incubar toda la noche para que las células se adhieran antes de usarse.
- Cambiar el medio para eliminar las células muertas.
- Pueden mantenerse hasta 1 mes en la incubadora pero deben inspeccionarse bajo el microscopio para verificar que la monocapa esté intacta antes de usarse

Cultivo de CTE

Para subcultivar las células:

- Aspirar el medio y lavar 2 veces con PBS 1X.
- Añadir 0.5 mL de tripsina al 0.05% a caja de 6 cm de diámetro y repartir por toda la caja moviéndola suavemente. Incubar a 37°C por 5-10 min.
- Agregar al menos un volumen de medio M15 para inactivar la tripsina y dispersar las células pipeteando.
- Transferir a un tubo estéril de 15 mL y centrifugar a 1000 RPM por 4 min.
- Resuspender las células en medio M15. Tomar una alícuota y contar en la cámara de Neubauer.
- Sembrar aproximadamente 5x10⁵ células en una caja de feeders de 6 cm de diámetro en 4 mL de medio M15.
- Cambiar el medio diariamente sin dejar que se acidifique (se torna de color amarillo) hasta que el cultivo llegue a semiconfluencia.

Formación de cuerpos embrioides

- Subcultivar las CTE a una densidad de 5×10^5 células en una caja de 6 cm de diámetro previamente gelatinizado sin *feeders*.
- Agregar 4 mL de medio M15 y 4 μ L de LIF (final 1000 U/mL).
- Cultivar las células por 3-4 días cambiando el medio diariamente.
- Aspirar el medio y lavar 2 veces con PBS 1X.
- Agregar 0.5 mL de tripsina al 0.05% e incubar a 37°C por 5-10 min.
- Inactivar la tripsina con al menos un volumen de medio M15 y transferir a un tubo de 15mL.
- Centrifugar a 1000 RPM por 3 min. Resuspender las células en 5 mL de medio M15.
- Tomar una alícuota y contar en la cámara de Neubauer. Se esperan aproximadamente 15×10^6 células por plato de 10 cm de diámetro.
- Sembrar 1×10^6 por plato bacteriológico de 10 cm de diámetro en 10 mL de medio M15.
- Cultivar las células por 4 días a 37°C, 5% de CO₂. Cambiar el medio el segundo día de la siguiente manera:
 - Transferir los CE a un tubo de 50 mL con una pipeta de 25 mL para que no se dañen los CE.
 - Dejar que se asienten en el fondo del tubo (aproximadamente 5 min).
 - Aspirar el medio y resuspender en 10 mL de medio M15 fresco.
 - Transferir gentilmente los CE con pipeta de 25 mL a la caja de 10 cm de diámetro original.

Suspensión celular de los cuerpos embrioides

- Tomar los CE con una pipeta de 25 mL, pasarlos a un tubo falcon de 15 mL y dejar que se asienten.
- Aspirar el medio.
- Agregar 1 mL de tripsina 0.05% e incubar por 10 min a 37°C.
- Inactivar la tripsina con 4 mL de medio M15.
- Resuspender mecánicamente (no más de 50 pases).
- Dejar asentar un poco, tomar un pequeño volumen del sobrenadante y ponerlo en un tubo eppendorf.
- Centrifugar 3 min a 1000 RPM.
- Resuspender la pastilla en aproximadamente 50 μ L (que la suspensión quede muy concentrada).

Congelación y descongelación de células

Congelación:

- Tripsinizar a las células en la forma descrita anteriormente.
- Tomar una alícuota y contar en la cámara de Neubauer.
- Centrifugar a 1000 RPM por 5 min.
- Resuspender en la mitad del volumen requerido para obtener una densidad de 1×10^6 células/0.25 mL de medio para CTE y 2×10^6 células/0.25 mL de medio para células STO.
- Agregar gradualmente (muy lentamente por la pared o por goteo) un volumen de medio para congelar 2X agitando constantemente el tubo.

- Alicuotar rápidamente en viales de congelación. Agregar 0.5 mL de la suspensión celular por vial. Etiquetar con el nombre de la línea, número de pase, cantidad de células y fecha.
- Transferir los viales de congelación a -70°C por 24hrs y posteriormente almacenar en el tanque de nitrógeno líquido.

Descongelación

- Sacar el vial de las células requeridas del tanque de nitrógeno líquido y transferir inmediatamente a un baño de agua a 37°C .
- Esperar a que el vial se descongele (de 1 a 2 minutos) y transferir la suspensión celular a un tubo estéril de 15mL. Agregar 1 mL del medio que corresponda muy lentamente por la pared del tubo. Mezclar por inversión.
- Centrifugar las células a 1000 RPM por 3 min.
- Aspirar el sobrenadante y resuspender las células en el medio apropiado y a la densidad requerida.

Conteo en la cámara de Neubauer

- Limpiar la cámara y el cubreobjetos con un papel con etanol 70% con cuidado de no rayar la región plateada en donde se ubica la cuadrícula.
- Colocar la cámara en el microscopio y el cubreobjetos sobre ella, de manera que este cubra homogéneamente la superficie plateada.
- Tomar una alícuota de 10 μL de una suspensión celular homogénea y agregarla a otros 10 μL de azul de tripano en un tubo eppendorf.

- Tomar las células con una pipeta de 20 μL subiendo y bajando la suspensión un par de veces.
- Colocar 10 μL de la mezcla inmediatamente en el receptáculo de la cámara permitiendo que la suspensión se deslice hacia el interior de la cámara por capilaridad.
- Seleccionar el objetivo de 10X y contar las células en la cuadrícula central que se encuentra delimitada por tres líneas.
- Las células deben ser más de 100 para que el conteo sea preciso. Si son menos de 100 es necesario contar la cuadrícula central para realizar un promedio. El número de células en la cuadrícula central (de 1mm^2) corresponde a el número de células en 0.1 μL de la suspensión celular por lo tanto al multiplicar el número de células en la cuadrícula por 20 000 (tenemos 10 μL de suspensión celular y 10 μL de azul de tripano), obtendremos el número de células por mL de la suspensión celular inicial. Para obtener el número total de células en la suspensión, debemos multiplicar el valor obtenido por el número de mL que conforman la suspensión celular de interés.

Cultivo de células precursoras neurales

1. Dulbecco Modified Eagle Medium F12 con hepes (DMEM/F12) (Gibco)

Para 1 L:

- Disolver el medio en polvo en aproximadamente 800 mL de H_2O grado cultivo mediante agitación suave.
- Añadir 1.2 g de NaHCO_3 .

- Agitar hasta disolver (no sobre mezclar).
- Ajustar el pH a 6.9.
- Aforar a 1 L en un matraz volumétrico y mezclar por inversión.
- Esterilizar por filtración con una membrana de 0.22 μm .
- Guardar a 4°C.

2. N2

Soluciones:

- a. Albúmina sérica bovina fracción V (Sigma) al 7.5%. Diluir en agua y esterilizar por filtración.
- b. Progesterona (Sigma) (6mg/mL). Combinar 100 mg de progesterona con 16.6 mL de etano. Mezclar por inversión un par de veces hasta que se disuelva completamente. Alicuotar y congelar a -20°C. Las alícuotas pueden almacenarse hasta por 6 meses.
- c. Putrescina (Sigma) (160mg/mL). Combinar 5 g de putrescina con 31.25 mL de agua. Mezclar por inversión un par de veces hasta que se disuelva completamente. Alicuotar y congelar a -20°C. Las alícuotas pueden almacenarse hasta por 6 meses.
- d. Selenita de sodio (Sigma) (30mM; 5.18 mg/mL). Combinar 200 mg de selenita de sodio con 38.6 mL de agua. Mezclar por inversión un par de veces hasta que se disuelva completamente. Alicuotar y congelar a -20°C. Las alícuotas pueden almacenarse hasta por 6 meses.

- e. Insulina (Sigma) (25 mg/mL). Dejar que el frasco se tempere. Agregar 4 mL de ácido clorhídrico 0.01 M esterilizado a una botella de insulina (de 100 mg), todo en condiciones de esterilidad. Mezclar con vortex y guardar a 4°C toda la noche.
- f. Apotransferrina (Sigma) (100 mg/mL). Dejar que el frasco se tempere. Agregar 5 mL de agua estéril a una botella de transferrina en condiciones de esterilidad. Mezclar con vortex y guardar a 4°C toda la noche.
- g. DMEM/F12
- h. Hidróxido de Sodio (J. T. Baker) 1 M filtrado y almacenado a 4°C.
- Mezclar 33 mL de DMEM/F12 con 480 µL del stock de Putrescina, 15.84 µL del de progesterona y 4.8 µL del de selenita de sodio.
 - Pasar la mezcla por un filtro de 0.22 µm.
 - Tomar 28 mL de esa solución y agregar lentamente 4 mL de Insulina, 4 mL de transferrina y 4 mL de albúmina y mezclar.
 - Agregar lentamente 180 µL de NaOH y mezclar.
 - Agregar 120 µL más de NaOH.
 - Hacer alícuotas de 1 mL.
 - Se puede formar una solución turbia después de la adición del NaOH, primero amarillenta y después rojiza. Esto es normal y el N2 funcionará correctamente.

3. *Medio de precursores*

Para 100 mL de medio:

- 49 mL de DMEM/F12
- 49 mL de Neurobasal (Gibco)
- 1 mL de B27 (Gibco)

- 0.5 mL de GPS
- 0.5 mL de N2
- 100 μ L de β -mercaptoetanol (final 0.1 mM)
- 40 μ L de insulina (stock de 25 mg/mL)

Filtrar con membrana de 22 μ m

4. *Cajas recubiertas con Ornitina (Sigma) y Laminina (Invitrogen)*

- Un día antes de obtener la suspensión celular se recubren cajas de 24 pozos con poli-d-ornitina (0.0025% v/v en agua destilada) y se incuba por 2 h a temperatura ambiente (TA).
- Se quita la poli-d-ornitina, se lava 2 veces con H₂O estéril y se deja secar en la campana de flujo laminar.
- Se agrega laminina (10 mg/mL en Neurobasal), la mínima cantidad para que cubra el pozo (aproximadamente 200 μ L) y se deja incubando toda la noche en la incubadora.
- Al día siguiente se quita la laminina y se siembran las células. Las cajas pueden quedarse con medio Neurobasal en la incubadora por un par de días.

Cultivo de explantes e implantes

1. *Glucosa (Sigma) 2M*

Disolver 3.604 g de glucosa en 10 mL de agua bidestilada y filtrar con membrana de 0.22 μ m.

2. *Medio para explantes*

Para 50 mL:

- Mezclar 36 mL de medio Optimem con Glutamax (Gibco) con 12.5 mL de DMEM/F12.
- Agregar 1 mL de glucosa 2 M y 0.5 mL de GPS.
- Filtrar con membrana de 0.22 μm .

3. *NaCl (Sigma) 1.5 M*

Disolver 0.876 g de NaCl en 10 mL de agua bidestilada y filtrar con membrana de 0.22 μm .

4. *NaHCO₃ (Sigma) al 7.5%*

Disolver 0.75g de NaHCO₃ en 10 mL de agua bidestilada y filtrar con membrana de 0.22 μm .

5. *Gel de colágena*

- 700 μL de medio para explantes
- 250 μL de colágena de rata (donada por el Dr. Alfredo Echavarría).
- Agregar 25 μL de una solución de NaCl 1.5 M y 25 μL de solución NaHCO₃ al 7.5%.
- Mantener en hielo.

Inmunofluorescencias

1. *Paraformaldehído (Sigma) 4% (PFA)*

Para 100 mL:

- Disolver 4 g de PFA en 4 mL de agua bidestilada.
- Agregar 50 mL de PBS 2X.
- Ajustar el pH a 7.2.

- Aforar a 100 mL con agua bidestilada.
- Filtrar con membrana de 0.45 μm .
- Mantener a -20°C .

2. Sacarosa (*J. T. Baker*) 30%

Para 30 mL:

- Pesar 9 g de sacarosa.
- Aforar a 30 mL con PBS 1X.
- Filtrar con membrana de 0.45 μm .
- Mantener a 4°C .

3. Tritón X (*Bio-Rad*) al 20%

Para 10 mL:

- Mezclar 2 mL de Tritón X en 8 mL de PBS 1X.
- Almacenar a 4°C .

4. Azida de sodio (*Sigma*) al 10%

Para 10 mL:

- Pesar 1 g de azida de sodio. Utilizar guantes.
- Aforar a 10 mL con PBS 1X.
- Almacenar a 4°C .

5. Solución bloqueadora

Para 50 mL:

- Mezclar 0.25 mL de Tritón X al 20% con 0.5 mL de Suero Fetal Bovino.
- Agregar 50 μL de Azida de sodio al 10%.
- Llevar a 50 mL con PBS 1X.

Extracción de ARN y qPCR

1. Extracción de ARN

- El tejido se congela en hielo seco o nitrógeno líquido (puede almacenarse a -70°C por varios meses) y se homogeniza con 500 µL de Riboex (GeneAll).
- Se incuban las muestras por 5 min a TA.
- Añadir 100 µL de cloroformo (J. T. Baker), agitar por inversión por 10-15 s y dejar reposar 5 min a TA.
- Centrifugar a 10,000 rpm por 30 min a 4°C.
- Se formarán tres fases, se toma la fase acuosa, cuidando de no tomar parte de alguna de las otras, y transferir a un tubo limpio.
- Añadir 250 µL de isopropanol (J. T. Baker) y mezclar suavemente por inmersión por 15 s. Dejar 2 h (o toda la noche) a -20°C (también puede dejarse 10 min a TA pero la precipitación suele ser menos eficiente).
- Centrifugar a 10,000 rpm, 4°C, por 30 min (se formará un pellet).
- Quitar el sobrenadante y añadir 500 mL de etanol (Merck) al 75% (diluirlo en H₂O estéril y libre de ARNasas) y dar vórtex por 5-10 s.
- Centrifugar a 14,000 rpm a 4°C por 15 min.
- Remover el sobrenadante y dejar secar a TA.
- Disolver en agua estéril y libre de ARNasas, entre 5 – 20 µL dependiendo del tamaño del pellet.
- Tratamiento con ADNasa (Roche): mezclar 5 µL de RNA, 1 µL de buffer ADNasa 10x, 0.2 µL ADNasa, llevar a 10 µL con H₂O. Calentar por 15 min a 37°C.
- Cuantificar el ARN en el nanofotómetro (Implen).

- Para verificar la integridad del ARN se mezcla el volumen que contenga 1 µg de ARN y se agregan 3 volúmenes de buffer de urea (10 M Urea (Sigma), 2% azul de bromofenol (Sigma)), se mezcla y se calienta a 55°C por 5 min. La mezcla se corre en un gel de agarosa al 2% con TAE, dejando que el azul salga del pozo (10-15 min a 100 V).
- Para corroborar que las muestras no contengan ADN genómico, se hace un PCR con el ARN utilizando un par de oligonucleótidos que logren distinguir ARNm (oligos para el gen *Th*) de ADN genómico.

2. Síntesis de ADNc

- Se mezclan el oligo dT, el ARN y los dNTPs y se calientan 5 min a 65°C. Se centrifugan 1 min.
- Se añade el buffer, DTT, la enzima y el agua y se mezcla.
- Se incuba a 42°C por una hora y luego 10 min a 72°C.

Componente	Cantidad
Buffer 5X	6 µL
dNTPs 10mM	1.5 µL
Oligo dT 500 µg/mL	1 µL
Transcriptasa	0.5 µL
DTT	3 µL
ARN	1 µg
H ₂ O	Llevar a 30 µL

- Se verificó mediante PCR de un gene constitutivo (*Ciclofilina* o *Rplp0*) que el ADNc se hubiese sintetizado bien y que no tuviera ADN genómico (oligos para *Th*).

3. PCR para verificar síntesis de ADNc, contaminación con ADN genómico y Tm de los oligonucleótidos.

Los oligonucleótidos utilizados primero se probaron por PCR punto final para determinar su Tm y que solo amplificara un producto (Fig. S1). Se utilizaron las cantidades recomendadas por el fabricante (Roche) para la reacción de PCR.

Componente	Cantidad
Buffer 10X con Mg	1.5 µL
dNTPs 10 mM	0.3 µL
Mix Oligos 2.5 µM	0.6 µL
ADNc o ARN	1 µL
Taq Polimerasa	0.06 µL
H ₂ O	Llevar a 15 µL

La reacción se realizó en un Termociclador (Eppendorf) bajo las siguientes condiciones: 5 min a 95°C; 40 ciclos de: 30 s – 95°C, 30 s – Tm °C, 30 s – 72°C; 10 min a 72°C. Para verificar la Tm de los oligonucleótidos se utilizó en gradiente de temperaturas entre 56°C y 64°C en los 30 s de Tm para encontrar la temperatura óptima. Para todos los oligonucleótidos utilizados la Tm quedó en 60°C.

a. TAE 50x

Para 1 L:

- Mezclar 242 g de Tris-base, 18.61 g de EDTA disódico, 57.1 mL de ácido acético glacial y llevar a 1 L con agua destilada.

b. Preparación del gel de agarosa

El porcentaje del gel de agarosa depende del tamaño de la banda que se desea observar. Para bandas de tamaño pequeño (menos de 500 pb) se hacen geles de porcentaje entre 2 y 3%. La agarosa se diluye en TAE 1X

calentándolo para que se solubilice. La cantidad de agarosa que se requiere depende del porcentaje del gel sobre el volumen total (Gel de 1%: 0.2 g de agarosa/20 mL de buffer).

4. Reacción para el PCR tiempo real.

El ADNc se diluyó 1:4 para disminuir el error al pipetear. Se utilizaron las cantidades recomendadas por el fabricante (KAPA Biosystems) para la reacción de PCR.

Componente	Cantidad
Buffer 2X	5 μ L
Rox	0.2 μ L
Mix Oligos 2.5 μ M	0.8 μ L
ADNc (1:4)	2 μ L
H ₂ O	Llevar a 10 μ L

La reacción se realizó en un Rotor-Gene 3000 (Corbett Research) bajo las siguientes condiciones: 3 min a 95°C; 40 ciclos de: 15 s – 95°C, 20 s – T_m °C, 20 s – 72°C (medición de fluorescencia); y para la curva *melting*: 50°-99°C aumentando 1° cada paso y esperando 5 s en cada uno.

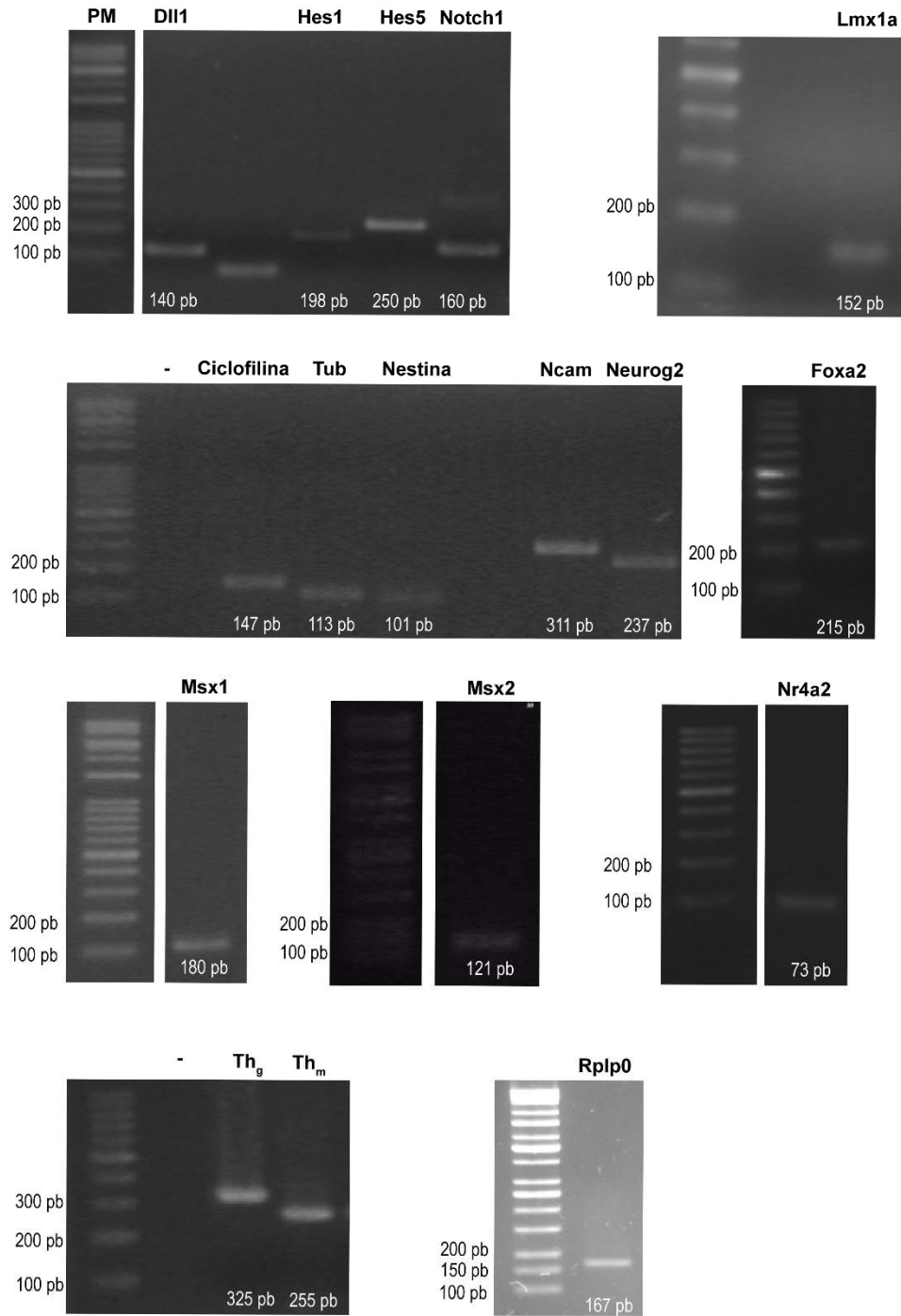


Figura S1. Imágenes de los productos de PCR de los oligonucleótidos utilizados, corridos en un gel de agarosa al 2%. El marcador de peso molecular para todos los casos fue Fermentas 100 pb Gene Ruler DNA ladder, excepto para el gel de *Rplp0* en el que se usó el de la marca Kappa Universal Ladder.