



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
CENTRO DE CIENCIAS GENÓMICAS**

**DIFERENCIACIÓN DOPAMINÉRGICA DE CÉLULAS TRONCALES
NEURALES INDUCIDAS EN LA SUBSTANTIA NIGRA DE CEREBROS
DE ROEDORES ADULTOS**

**T E S I S
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
DOCTORA EN CIENCIAS**

**PRESENTA:
M. en C. DULCE MARÍA ARZATE VÁZQUEZ**

**DIRECTOR DE TESIS
DR. LUIS FERNANDO COVARRUBIAS ROBLES
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA**

**COMITÉ TUTOR
DRA. MAGDALENA GUERRA CRESPO
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM**

**DR. JOSÉ VÍCTOR SEGOVIA VILA
CINVESTAV-ZACATENCO**

**CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX.
JULIO DE 2019**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis 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.

Dedicatoria

Con mucho amor dedico este trabajo a mi esposo Edwards y a mis hijos, Paula Binnizá y Eduardo Guuze. Gracias por entender las ausencias, las tardes de trabajo y los fines de semana en el laboratorio.

A mis padres, Celso y María Cristina, y a mi hermana Anahí. En la distancia siempre sentí su apoyo y agradezco infinitamente que al final de éste proyecto me hayan recibido a mí y a mi familia en casa.

A la vida, a los amigos y a los maestros.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico brindado como becaria número 366700 y al Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas de la UNAM.

A lo largo de estos años son muchas las personas que de alguna u otra manera han contribuido a la realización de éste trabajo y a mi formación personal y profesional.

Sin duda, agradezco al Dr. Luis Covarrubias por hacer equipo conmigo y comprometerse a ser mi tutor. Porque las largas pláticas no sólo ayudaron a definir el diseño experimental o a la interpretación de resultados, sino a mi formación personal.

A Gladys Mondragón Figueroa, por creer en mí como tutora y darme la oportunidad de guiarla en su proyecto de tesis.

A todos mis amigos y miembros del laboratorio con los cuales viví el día a día y compartí excelentes momentos: Javier Ramos, Vero Rojo, Gladys Mondragón, Celina García, Alejandra Guzmán, Mariana Werner, David Hernández, Gilda Guerrero, Raúl Pérez, Ana Karen Mojica, Karen Ivette De León, Daniel Fuentes, Sergio López, Alberto Valeriano, Ángel Martínez, Francisco Leyva, Álvaro Marín, Alan Cortés, y muy en especial a Conchita Valencia.

A mis tutores externos, la Dra. Magdalena Guerra y el Dr. José Segovia, por todos sus consejos y sugerencias que sin duda enriquecieron el proyecto.

Al grupo del Dr. René Drucker Colín y la Dra. Magda Guerra, porque en su laboratorio empecé a realizar mis primeros experimentos.

También quiero agradecer al Dr. Chris Wood y a la Dra. Celina García por sus consejos y apoyo.

A todo el equipo del Laboratorio Nacional de Microscopía Avanzada, por su asesoría y apoyo técnico. En especial a Xóchitl Alvarado Affantranger, por ser una gran amiga.

Al equipo del bioterio, las Dras. Elizabeth Mata y Graciela Cabeza, Sergio González, Rubén Blancas, Treicy Flores y Elvira Villa.

Al Dr. Raúl Paredes por darme un espacio en su laboratorio y ayudarme de manera indirecta a concretar mis estudios de doctorado.

Índice

Lista de abreviaturas	i
Abstract	iii
Resumen	iv
Introducción	1
Capítulo 1. Antecedentes	
1.1 Neurogénesis en el cerebro adulto.	3
1.2 Zonas neurogénicas clásicas	5
1.2.1 Hipocampo	5
1.2.2 Bulbo olfatorio.	5
1.3 Relevancia funcional de las neuronas nuevas en el cerebro adulto.	6
1.4 Potencial neurogénico del cerebro adulto	10
1.4.1 Neurogénesis a partir de células troncales neurales (típica)	10
1.4.2 Neurogénesis a partir de células neurales no troncales en el cerebro adulto (atípica)	14
1.5 La neurogénesis en el adulto desde un punto de vista evolutivo (recambio vs. neurogénesis reparativa)	15
1.6 Inducción de la diferenciación dopaminérgica	19
Capítulo 2	
2.1 Planteamiento del problema.....	22
2.2 Hipótesis	24
2.3 Objetivos	24
Capítulo 3. Materiales y métodos	
3.1 Animales experimentales	26

nigra de ratones tdTomato ⁺	35
3.8 Obtención del vector de expresión de Lmx1a, Foxa2 y Sox2.	36
3.9 Inmunofluorescencias	39
3.10 Microscopía y análisis de imágenes.....	40
3.11 Análisis estadístico	41
Capítulo 4. Resultados	
4.1 El trasplante de células de cuerpos embrioides estimula la neurogénesis en la sustancia nigra	42
4.1.1 Trasplante en ratas adultas	42
4.1.2 Trasplante en ratones adultos.....	44
4.2 Evaluación del potencial neurogénico de la sustancia nigra <i>in vitro</i>	49
4.2.1 Formación de neuroesferas de la sustancia nigra trasplantada de ratones adultos	49
4.2.2 Generación de células Dcx ⁺ en el cocultivo de células de la sustancia nigra intacta con células de cuerpos embrioides.....	52
4.2.3 Cultivo de células de la sustancia nigra en presencia de desferroxiamina	53
4.2.4 Cultivo de células de la sustancia nigra en presencia de GDNF, BDNF, Fgf-2 y ácido valproico.....	55
4.3 Astrocitos parenquimales de la sustancia nigra como fuente de neuronas nuevas	56
4.3.1 Astrocitos residentes de la sustancia nigra expresan marcadores de precursores neurales y de neuroblastos después del trasplante de células de cuerpos embrioides	56
4.3.2 Células Gfap ⁺ endógenas generan neuronas nuevas en la sustancia nigra	

trasplantada	61
4.4 Factores angiogénicos secretados por cuerpos embrioides estimulan el potencial neurogénico de la sustancia nigra.....	63
4.4.1 El bloqueo de la angiogénesis mediada por Vegf afecta la neurogénesis en la sustancia nigra trasplantada	63
4.4.2 Cultivo de células de la sustancia nigra en presencia de factores solubles secretados por células de cuerpos embrioides	66
4.4.3 Fgf-2 y Vegf inducen neurogénesis en la sustancia nigra en ausencia del trasplante de células de cuerpos embrioides.	68
4.5 Creación del vector policistrónico Lmx1a-Foxa2.....	71
Capítulo 5.	
5.1 Discusión	75
5.1.1 Activación de células troncales neurales quiescentes.....	75
5.1.2 Células gliales como fuente de neuronas nuevas.....	78
5.1.3 Neurogénesis dopaminérgica en la sustancia nigra del adulto.....	80
5.2 Conclusiones	83
5.3 Perspectivas	83
Bibliografía	85
Anexos	98
A. Figuras suplementarias.....	99
B. Tablas	100
C. Medios y soluciones.....	110
D. Protocolos	112
Formación de cuerpos embrioides	113

Cultivo primario de cerebro de ratón adulto	113
Cultivo de neuroesferas.....	114
Cultivo de células de la sustancia nigra en presencia de factores solubles secretados por células de cuerpos embrioides (Vegf + Fgf-2)	115
Inmunofluorescencia sobre caja de cultivo.....	115
Inmunofluorescencia contra BrdU en rebanadas de cerebro	116
Transfección de células de mamífero mediante polietilenimina lineal.....	117

Lista de Abreviaturas

BrdU: 5-bromo-2-desoxiuridina, por su acrónimo en inglés

BDNF: Factor neurotrófico derivado del cerebro, por sus siglas en inglés

Dcx: Doblecortina, marcador de neuroblastos

dpt: días postrasplante

EBs: Cuerpos Embrioides, por sus siglas en inglés

EBCs: Células de Cuerpos Embrioides, por sus siglas en inglés

Egf: Factor de crecimiento epidermal, por sus siglas en inglés

Egfp: Proteína verde fluorescente mejorada, por sus siglas en inglés

ESCs: Células Troncales Embrionarias, por sus siglas en inglés

Fgf-2: Factor de crecimiento fibroblástico tipo 2, por sus siglas en inglés

GDNF: Factor neurotrófico derivado de la glía, por sus siglas en inglés

Gfap: Proteína ácida fibrilar glial, marcador de células gliales

LIF: Factor inhibidor de leucemia, por sus siglas en inglés

NeuN: Núcleo neuronal, marcador de neuronas maduras

NPCs: Células Precursoras Neurales, por sus siglas en inglés

NSCs: Células Troncales Neurales, por sus siglas en inglés

pAq: zona periacueductal, por su acrónimo en inglés

PH3: Fosfohistona-3, por sus siglas en inglés

Psa-Ncam: Forma polisializada de la molécula de adhesión celular neural, marcador de neuroblastos

S100b: Proteína de unión a calcio S100 tipo B, marcador de células gliales

SN: Sustancia nigra

Sox1/Sox2: SRY-box 1/2, marcador de precursores neurales

Tubb3: Tubulina beta clase III neuronal

Vegf: Factor de crecimiento del endotelio vascular, por sus siglas en inglés

ZSV: Zona subventricular, por sus siglas en inglés

ZSG: Zona subgranular, por sus siglas en inglés

Abstract

Neurogenesis in the substantia nigra (SN) has been a controversial issue. The present study evaluated the neurogenic potential of the adult SN through the transplantation of embryoid body cells (EBCs) derived from mouse embryonic stem cells. The detection of Sox2⁺ dividing (BrdU⁺) putative host neural precursor cells (NPCs) between 1-6 days post-transplantation (dpt) supported the neurogenic capacity of the adult SN. Later, at 15 dpt, a significant number of SN Dcx⁺ neuroblasts were detected. However, a continuous BrdU administration after transplantation showed that only a fraction (about 20-30%) of those host Dcx⁺ progeny derived from dividing cells and few BrdU⁺ cells, some of them NeuN⁺, survived up to 30 dpt. However, we were not able to identify any dopaminergic neuron. Unexpectedly, 25-30% of Dcx⁺ or Psa-Ncam⁺ cells at 15 dpt displayed astrocytic markers such as Gfap and S100b. Using a genetic lineage tracing strategy, we demonstrated that a large proportion of host Dcx⁺ and/or Tubb3⁺ neuroblasts originated from astrocytes. Remarkably, new blood vessels CD31⁺ formed in association with the neurogenic process that, when precluded, caused a reduction in neuroblast production. Accordingly, two proteins secreted by EBCs, Fgf2 and Vegf, were able to promote the emergence of Dcx⁺, Tubb3⁺ and NeuN⁺/BrdU⁺ cells *in vivo* in the absence of EBCs and neurosphere formation *in vitro*. In agreement with the awakening of NPCs by EBCs, only host cells from implant-bearing SN were able to generate neurosphere-like aggregates in the presence of Egf and Fgf2, and we detected Dcx⁺/Egfp⁻ cells in a SN cell culture with EBCs. Furthermore, we identified a Nes⁺/Gfap⁻ cell population that when exposed to GDNF, BDNF, Fgf2 and valproic acid gave rise to Tubb3⁺ cells in comparison to controls. We propose that the adult SN is a mostly silent neurogenic niche with the ability to generate new neurons by typical and atypical mechanisms. However, it remains to be elucidated the capacity of these precursors to generate new dopaminergic neurons by the overexpression of Lmx1a and Foxa2, transcription factors implicated in embryonic dopaminergic differentiation, through expression vectors that we designed.

Resumen

La neurogénesis en la sustancia nigra (SN) del cerebro adulto ha sido evaluada en varias ocasiones sin obtener resultados que lleguen a una misma conclusión. Este trabajo estudió la capacidad que tiene el cerebro adulto para generar neuronas nuevas, con un enfoque particular en el potencial neurogénico de la SN. Después de realizar el trasplante de células de cuerpos embrioides (EBCs) derivadas de células troncales embrionarias de ratón (mESCs, del inglés) en la SN de roedores adultos observamos la presencia secuencial de células comarcadas con 5-bromo-2'-desoxiuridina (BrdU) y Sox1/Sox2/Nestina en los primeros días postrasplante (dpt), lo cual apoya la presencia de células precursoras neurales (NPCs, por sus siglas en inglés) residentes, que dan origen a nuevos neuroblastos $Dcx^+/Psa-Ncam^+$ a los 15 dpt y nuevas neuronas maduras, $NeuN^+$ a los 30dpt, de las cuales ninguna correspondía al linaje dopaminérgico. Sin embargo, la administración continua de BrdU sólo permitió marcar entre el 20-30% de las células Dcx^+ encontradas alrededor del trasplante. Esto sugiere que dichas células no provienen de la expansión de NPCs, y por lo tanto, dificulta su identificación si es que llegan a una diferenciación neuronal terminal. Debido a que en trabajos recientes se muestra la generación de nuevas neuronas a partir de astrocitos en el estriado del cerebro adulto, realizamos el comarcaje de estos neuroblastos $Dcx^+/Psa-Ncam^+$ con marcadores gliales como Gfap y S100b, de lo cual encontramos una coexpresión en el 25-30% de estas células. Para confirmar estas observaciones, realizamos el trasplante de células de EBCs en la SN de ratones doble transgénicos $Gfap-cre/ERT2;Gt(ROSA)26Sor^{tm4(ACTB-tdTomato,-EGFP)}$, en los cuales podíamos evaluar si los neuroblastos endógenos procedían de astrocitos o precursores tipo glía (células $Gfap^+$). Los resultados obtenidos en la evaluación del trasplante a los quince días muestran células $Dcx^+/Egfp^+$ confirmando que provienen de células gliales. Posteriormente, realizamos la evaluación del trasplante a los 30 días y encontramos células $Egfp^+$ con morfología neuronal e inmunorreactivas a Tubb3, un marcador de neuronas. Cabe mencionar que alrededor del sitio de trasplante se observaron abundantes vasos sanguíneos identificados por medio del marcador CD31 y al bloquear la angiogénesis, por medio de un inhibidor de Vegf, también se observó una reducción en el número de células Dcx^+ . Por otra parte, dos proteínas secretadas por células de EBCs, Fgf-2 y el factor de crecimiento del endotelio vascular (Vegf), promueven la formación de neuroesferas y generan neuroblastos endógenos ($Dcx^+/Psa-Ncam^+$) en la SN en ausencia de trasplante a los 15 dpt y nuevas neuronas ($NeuN^+/BrdU^+$) a los 30 dpt. En concordancia con la

activación de NPCs a causa del trasplante de EBCs, las células de la SN trasplantada tienen la capacidad de generar neuroesferas cuando se cultivan en presencia del factor de crecimiento epidermal (Egf) y el factor de crecimiento fibroblástico tipo 2 (Fgf-2). Asimismo, se detectó la presencia de células $Dcx^+/Egfp^-$ en un cocultivo de células de la SN con EBCs. Por otro lado, en cultivos primarios de SN intacta, se detectó una población de células $Nes^+/Gfap^-$ que al ser tratadas con GDNF, BDNF, Fgf-2 y ácido valproico generaron células $Tubb3^+$, lo cual no se observó en la condición control. Con estos resultados proponemos que la SN es un nicho neurogénico silencioso con la habilidad de generar neuronas nuevas a partir de células precursoras y otros tipos celulares que no parecen ser de esta naturaleza. Aunque aparentemente la neurogénesis dopaminérgica no ocurre en estas condiciones también construimos vectores para inducir la sobreexpresión de *Lmx1a* y *Foxa2*, factores clave en la diferenciación dopaminérgica, y así evaluar la capacidad de las células precursoras identificadas para generar la población neuronal específica de la SN.

Introducción

La neurogénesis en los mamíferos adultos parece ser un proceso limitado a dos nichos neurogénicos independientes (Alvarez-Buylla y Garcia-Verdugo, 2002; Alvarez-Buylla y Lois, 1995). Los nichos neurogénicos que contienen células troncales neurales (NSCs, por sus siglas en inglés) con capacidad de división son: la zona subventricular (ZSV) localizada en las paredes de los ventrículos laterales (Lois y Alvarez-Buylla, 1993) y la zona subgranular (ZSG) del hipocampo (Cameron et al., 1993). En los humanos se ha postulado que también existen ambos nichos (Bedard y Parent, 2004; Eriksson et al., 1998), aunque el grupo de investigación del Dr. Arturo Álvarez-Buylla ha mostrado evidencia de que estos nichos pierden actividad a temprana edad (Sanai et al., 2011; Sorrells et al., 2018). La capacidad neurogénica en otras áreas, especialmente en aquellas afectadas por enfermedades neurodegenerativas, sigue en estudio. En específico, varios trabajos sugieren la existencia de neurogénesis en otras estructuras, como la neocorteza, el estriado, la amígdala, el hipotálamo y la sustancia nigra (SN), que parecen activarse bajo manipulaciones experimentales como hipoxia, infusión de factores de crecimiento o fármacos (Gould, 2007). En el hipotálamo del ratón se ha descrito una población de tanicitos en la eminencia media del tercer ventrículo que puede generar nuevas neuronas (Kokoeva et al., 2005; Recabal et al., 2017). Algunos grupos han evaluado éste proceso en la SN pero sus resultados son contradictorios. Por un lado, hay evidencia de que la SN contiene células precursoras neurales (NPCs) con capacidad de proliferación, las cuales no pueden generar nuevas neuronas dopaminérgicas (Frielingsdorf et al., 2004), pero sí pueden dar origen a nuevas neuronas cuando son trasplantadas a un nicho neurogénico (Lie et al., 2002). De esta manera se sugiere que la SN contiene células con capacidad neurogénica, las cuales también son responsivas a señales de diferenciación y de especificación pero que su nicho carece de las señales inductivas necesarias para generar la neurona sitio específica. Sin embargo, otros grupos sugieren que la neurogénesis dopaminérgica ocurre a lo largo de la vida aunque a una tasa más baja, si se compara con la ZSV y la ZSG (Albright et al., 2016; Morrison, 2016) pero que puede ser incrementada en respuesta a una lesión (Shan et al., 2006; Zhao et al., 2003). De manera alternativa, se ha sugerido que nuevas neuronas dopaminérgicas que se integran a la SN nacen de NPCs residentes de la zona periventricular del acueducto (pAq; (Hermann et al., 2006; L'Episcopo et al., 2014).

Comúnmente, la neurogénesis en el cerebro adulto se estima mediante la detección de células en división y la coexpresión de marcadores de especificación neurales. Esta aproximación asume que el proceso neurogénico en todas las regiones cerebrales ocurre a través de un mecanismo similar. En este sentido es importante considerar que la dificultad para detectar neurogénesis en ciertas regiones puede estar relacionada con un ambiente pobre para la diferenciación neuronal o la sobrevivencia de neuronas maduras bajo condiciones fisiológicas regulares. Un ambiente proneurogénico puede estar constantemente activo o emerger ante una condición fisiológica particular o de daño. Recientemente, nuestro grupo de investigación demostró que la capacidad del cerebro adulto de llevar a cabo neurogénesis puede determinarse mediante el trasplante de células con potencial neurogénico. Las células de cuerpos embrioides (EBCs) derivadas de células troncales embrionarias de ratón (mESCs, por sus siglas en inglés), las cuales poseen un alto potencial neurogénico (Baizabal y Covarrubias, 2009) diferencian eficientemente a neuronas en distintas regiones cerebrales (Maya-Espinosa et al., 2015). El estriado muestra una pobre capacidad para inducir/permitir un proceso neurogénico, sin embargo esta capacidad mejora ante el daño. Interesantemente, la SN intacta promueve la neurogénesis en las células trasplantadas con una alta eficiencia, similar a la detectada en un nicho neurogénico clásico, como la ZSV. Esto sugiere que la SN tiene señales inductivas o permisivas, las cuales podrían permitir la generación de neuronas nuevas a través de NPCs locales. Esta propuesta tuvo origen en la detección de neuroblastos endógenos $Dcx^+/Psa-Ncam^+$ alrededor de la zona de trasplante de EBCs, particularmente abundantes en la SN. En el presente estudio, nos enfocamos en evaluar la presencia de células con capacidad neurogénica en la SN de roedores adultos, así como su capacidad de generar neuronas dopaminérgicas nuevas.

Capítulo 1

Antecedentes

1.1 Neurogénesis en el cerebro adulto

En el año 1913, Don Santiago Ramón y Cajal publicó su libro “Estudios sobre la degeneración y regeneración del sistema nervioso” en el cual demostraba la factibilidad de la regeneración axonal y, por el contrario, afirmaba que las neuronas no podían proliferar (Ramón y Cajal, 1913). Sin embargo, pocos años después de dicha publicación, Ezra Allen sacaba a la luz la primera evidencia de divisiones celulares en el cerebro de la rata adulta, con ayuda de una nueva técnica de fijación y deshidratación a base de anilinas que permite observar los detalles citológicos de las células en división (Allen, 1916). Sin embargo, no fue sino hasta 1965 que Joseph Altman, describió la existencia de células granulares nuevas en el hipocampo de ratas adultas. Posteriormente, realizó estudios en los cuales reportó la migración de células generadas en la zona subependimal al bulbo olfatorio (BO) y propuso que era en esta estructura cerebral donde se diferenciaban a neuronas. Estos hallazgos fueron confirmados en 1977, con el uso de microscopía electrónica por Michael Kaplan quien demostró la naturaleza neuronal de las células marcadas con timidina tritiada, la primera sustancia utilizada para marcar células nuevas (Kempermann, 2006).

Actualmente, sólo se reconocen dos regiones en los mamíferos adultos y sanos, incluyendo al ser humano (Bedard y Parent, 2004; Eriksson et al., 1998) que de manera independiente son capaces de dar lugar a neuronas nuevas: la ZSG del giro dentado del hipocampo que genera células granulares y la ZSV localizada en las paredes de los ventrículos laterales que genera células que se integran a las capas granulares y periglomerulares del BO (Alvarez-Buylla y Lois, 1995). Aunque también empiezan a aceptarse otras zonas como el hipotálamo, ver Figura 1.

La neurogénesis en el adulto se define como la generación y desarrollo de neuronas nuevas en el cerebro de sujetos adultos (Kempermann, 2006). Las cuales se originan a partir de NSCs con capacidad de autorenovación y multipotencialidad, es decir, con la facultad de dar origen a nuevas neuronas, astrocitos y oligodendrocitos. Marcadores clásicos de NSCs como Sox1/2 o Nestina (Nes) pueden ser indicadores de su presencia, aunque no de un proceso activo de neurogénesis. Dado que varios marcadores de diferenciación neuronal se mantienen en las neuronas maduras, p.ej. Tubb3, su detección no distingue las existentes de las que recién se están

formando; sin embargo, marcadores tempranos y transitorios de neurogénesis como Dcx o Psa-Ncam sí pueden indicar un proceso activo de formación de neuronas nuevas.

Por otro lado, la proliferación de NSCs supone un proceso activo de neurogénesis y ha sido comúnmente identificada por la incorporación de análogos de la timidina como, BrdU y timidina tritiada, o la expresión de marcadores de ciclo celular como Ki67 y PH3 (fosfohistona-3). Además, la incorporación de BrdU puede también diagnosticar el destino de las células en proliferación, de tal forma que las neuronas generadas *de novo* se encontrarían marcadas con este análogo de la timidina. No obstante, dado que BrdU es un marcador de síntesis de ADN, también se incorpora durante la reparación de éste o previo a la apoptosis (Taupin, 2007). Por lo tanto, la evidencia más fuerte para indicar neurogénesis *in vivo* es la maduración progresiva de las células marcadas con BrdU que se puede determinar por la expresión secuencial de marcadores característicos de cada etapa de diferenciación (p.ej., Nes-Dcx-NeuN). Otro indicador que es coincidente con la presencia de NSCs, es la capacidad de una suspensión celular proveniente de una región cerebral particular de formar neuroesferas. Una neuroesfera se define como un agregado de origen clonal que contiene NSCs con capacidad de derivar los principales tipos celulares del sistema nervioso central (Guo et al., 2012). Aunque en un cultivo de alta densidad el origen clonal de cada neuroesfera no está asegurado, el número de neuroesferas que se pueden derivar de una región es indicativo del número de NSCs presentes. Típicamente, este agregado se forma en presencia de factores de crecimiento como Egf y Fgf-2. Sin embargo, también se ha reportado la existencia de una población de NSCs denominadas AdpNSCs (células troncales neurales primitivas derivadas del adulto) responsivas a LIF (Factor Inhibidor de Leucemia). Estas células, hasta ahora identificadas en la región periventricular, son Gfap⁻/Oct4⁺ y tienen la propiedad de integrarse a la masa celular interna de blastocistos, de manera similar a las ESCs. Experimentos *in vitro* e *in vivo* han demostrado que son células quiescentes que dan lugar a la población de células Gfap⁺ que se encuentran en la capa subependimal de los ventrículos (Sachewsky et al., 2014).

En síntesis, una región que se considere neurogénica debe cumplir todos los criterios anteriormente mencionados, sin embargo la escasez de NSCs puede dificultar su identificación. El recambio de un tejido puede depender de su función, de tal forma que sólo ocurra bajo condiciones fisiológicas de alta actividad. Por lo tanto, la neurogénesis del cerebro puede variar acorde a esas condiciones fisiológicas que requieren recambio en regiones específicas.

Alternativamente, la neurogénesis del cerebro puede ser un mecanismo de reparación de tal forma que solo se active ante un daño. Aunque esto parece coincidir con algunos modelos experimentales, estos también son indicativo de la limitada capacidad de regeneración del cerebro adulto. A este respecto, Magnusson et al. (2014), reportaron la generación de nuevas neuronas a partir de astrocitos parenquimales del estriado como respuesta a isquemia, en un proceso que parece depender de una baja actividad de la vía de Notch. Esta evidencia sugiere que el nacimiento de nuevas neuronas en el cerebro adulto no necesariamente debe partir de NSCs.

1.2 Zonas neurogénicas clásicas

1.2.1 Hipocampo

La región neurogénica del hipocampo se conoce como giro dentado. En la capa granular residen neuronas excitatorias que participan en el circuito local (Ehninger y Kempermann, 2008). Al hacer contacto con el área CA3 modulan la separación de patrones espaciales, es decir, la capacidad de discriminar experiencias en contextos similares tanto en roedores como en seres humanos (Yassa et al., 2011).

Las NSCs del giro dentado residen en la zona subgranular (ZSG) y dan origen a células gliales y neuronales en la capa granular del giro dentado (Figura 1). Las células granulares nuevas migran durante tres días aproximadamente para llegar a la capa granular y al día diez extienden sus dendritas y axones. Mientras que, alrededor del día dieciséis se forman las primeras espinas dendríticas (Whitman y Greer, 2009).

1.2.2 Bulbo olfatorio

En el sistema olfatorio la población de NSCs del tipo astrocitario, denominadas así porque expresan la proteína ácida fibrilar glial (Gfap), se encuentra en la ZSV de las paredes del ventrículo lateral (Alvarez-Buylla y Garcia-Verdugo, 2002). Las células progenitoras viajan a través de la vía migratoria rostral (VMR) hacia el BO, ahí se diferencian en interneuronas granulares y periglomerulares (Kempermann, 2006), ver Figura 1. Petreanu y Alvarez-Buylla (2002) definieron cinco etapas del proceso de diferenciación de las células granulares nuevas. En la etapa 1 (2-7 días), las células tienen un proceso apical prominente y un proceso terminal pequeño, y migran tangencialmente a través de la VMR; en la etapa 2 (5-7 días), migran radialmente a través de la capa granular; en la etapa 3 (9-13 días), dejan de migrar y llegan a su posición final, tienen una dendrita simple que aún no atraviesa la capa mitral; en la etapa 4 (11-

22 días), tienen un árbol dendrítico extenso sin espinas; y finalmente, en la etapa 5 (15-30 días) presentan la morfología de células granulares maduras con espinas dendríticas. Por otro lado, el potencial de las NSCs de la ZSV para generar nuevos astrocitos y oligodendrocitos ha sido demostrada *in vivo* a través de la inducción de daño (Faiz et al., 2015; Gonzalez-Perez y Alvarez-Buylla, 2011).

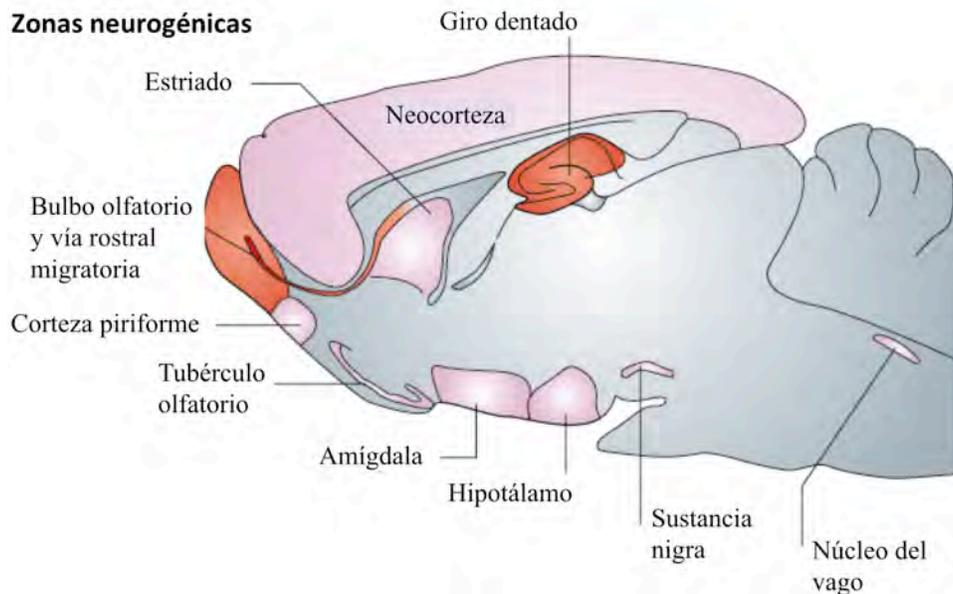


Figura 1. Zonas neurogénicas en el cerebro del roedor adulto. Actualmente, sólo se reconocen dos regiones neurogénicas en los mamíferos adultos y sanos que de manera independiente son capaces de dar lugar a neuronas nuevas: la ZSG del giro dentado del hipocampo y la ZSV localizada en las paredes de los ventrículos laterales (rojo). Sin embargo, varios trabajos sugieren la existencia de neurogénesis en otras áreas como: la neocorteza, el estriado, estructuras de la corteza olfatoria (la corteza piriforme, el tubérculo olfatorio y la amígdala), el hipotálamo, la sustancia nigra y el núcleo del vago, que parecen activarse bajo manipulaciones experimentales como hipoxia, infusión de factores de crecimiento o fármacos (modificado de Gould, 2007).

1.3 Relevancia funcional de las neuronas nuevas en el cerebro adulto

En las principales regiones neurogénicas, la ablación de la neurogénesis tiene consecuencias fisiológicas. En el hipocampo, las neuronas nuevas corresponden a células granulares excitatorias que son las neuronas principales que conectan con el área CA3. Por lo tanto, la neurogénesis hipocámpal tiene un papel crucial en la potenciación a largo plazo (Saxe et al., 2006) y contribuye en procesos de aprendizaje y memoria (Yassa et al., 2011). Cuando el proceso neurogénico es bloqueado se observan deficiencias conductuales que han sido reportadas mediante diferentes pruebas como el laberinto acuático de Morris y actividad en campo abierto

object/context mismatch (Spanswick et al., 2011). Tres hipótesis han sido propuestas para explicar la participación de las neuronas granulares nuevas por Aimone et al. (2014): 1) las neuronas nuevas ayudan a formar nuevos aprendizajes, como consecuencia ayudan a distinguir eventos altamente similares en composición y configuración; 2) el papel de las neuronas nuevas se centra en codificar el contexto temporal para distinguir dos eventos temporalmente cercanos; y, 3) las neuronas nuevas son capaces de codificar eventos novedosos, mientras que las neuronas viejas codifican eventos pasados, permitiendo una resolución en la memoria (Aimone et al., 2014). Es importante mencionar que independientemente de que un proceso neurogénico tiene lugar en el hipocampo, sólo unas pocas neuronas son capaces de integrarse a los circuitos preexistentes y la mayoría muere cerca de las primeras semanas de su nacimiento (Ehninger y Kempermann, 2008). Sin embargo, su proliferación y sobrevivencia pueden ser incrementadas mediante ciertos estímulos como correr o por exposición a un ambiente enriquecido, respectivamente.

En el caso del bulbo olfatorio, la pérdida de las nuevas interneuronas parece afectar las propiedades electrofisiológicas. Las interneuronas granulares crean sinapsis dendrodendríticas inhibitorias sobre las dendritas laterales de las células mitrales –neuronas de proyección del bulbo olfatorio- y al disminuir este tipo de sinapsis disminuye la actividad sincronizada y las corrientes miniaturas inhibitorias espontáneas, mIPSCs (Breton-Provencher et al., 2009).

La ejecución de la conducta sexual en roedores es un ejemplo de la relevancia de los sistemas olfatorios principal (BOP) y accesorio (BOA) (Keller et al., 2006; Mackay-Sim y Rose, 1986; Saito y Moltz, 1986). Por lo que ha servido como modelo para evaluar la relevancia de la neurogénesis en el bulbo olfatorio. A este respecto se ha observado un incremento en las neuronas nuevas del BOP de hembras ratón expuestas a feromonas de machos dominantes (Mak et al., 2007). También se ha reportado que la estimulación sexual regulada repetida (interacción sexual regulada por la hembra en frecuencia e intensidad, la cual incrementa el éxito reproductivo) promueve el arribo de más células granulares nuevas en el BOA y el BOP de hembras rata adultas (Arzate et al., 2013). Asimismo, las células granulares nuevas en el BOA parecen ser esenciales para el reconocimiento de pareja (Oboti et al., 2011) y el cuidado de las crías (Shingo et al., 2003) en el ratón hembra; de hecho, la ablación de la neurogénesis en el BO mediante radiación focal en la ZSV de ratones hembra adultas altera la interacción social con machos pero no con hembras (Feierstein et al., 2010). Por otro lado, Kermen et al. (2010)

propusieron que la consolidación de un aprendizaje olfativo es determinante en la sobrevivencia de las neuronas nuevas, las cuales ayudan a la formación de las memorias de largo plazo.

Es importante mencionar que neuronas de axón corto e interneuronas son el principal tipo de neuronas generadas en el cerebro adulto, por lo que al parecer, la conexión local parece ser el único requisito para su integración a los circuitos preexistentes. Es bien conocido que las interneuronas inhibitorias y excitatorias, además de sincronizar a las neuronas principales, ayudan a potenciar la sensibilidad a estímulos fluctuantes y a refinar el procesamiento de información (Shepherd, 1994), ver Figura 2. En el caso del hipocampo adulto, las neuronas nuevas se incorporan porque esta estructura crece con el tiempo. Sin embargo, en el caso del BO, parece que las nuevas neuronas remodelan los circuitos, ya que las neuronas viejas son reemplazadas. Esta observación sugiere que las interneuronas sufren de un desgaste que provoca su muerte haciendo necesario su reemplazo para mantener los circuitos en funcionamiento. Además, en el BO este reemplazo puede deberse al recambio continuo de las neuronas sensoriales del epitelio olfatorio, una región neurogénica externa el SNC, en un proceso que puede requerir el remodelamiento de los circuitos olfatorios. Sin embargo, diversos experimentos han mostrado que la ablación de la neurogénesis en el BO afecta la discriminación olfatoria pero no la capacidad de oler (Whitman y Greer, 2009).

En el hipocampo, la ablación de la neurogénesis afecta la formación de la memoria espacial y el condicionamiento de miedo al contexto (Imayoshi et al., 2008; Saxe et al., 2006); mientras que, la inducción fisiológica de la neurogénesis en esta región, mediante ambientes interactivos y ejercicio, incrementan la memoria y la capacidad de aprendizaje.

De las observaciones realizadas en las dos áreas neurogénicas principales, es posible considerar que la neurogénesis puede volverse un proceso necesario para un circuito en específico cuando su función requiere en recambio o reclutamiento neuronal constante. Entonces, ¿es posible que una demanda funcional bajo ciertas condiciones fisiológicas activen un programa neurogénico en áreas aparentemente no-neurogénicas? En el hipotálamo, una región cerebral particularmente responsiva a la actividad metabólica y hormonal, estudios recientes han demostrado que se integran neuronas nuevas a la eminencia media y al núcleo arcuato en animales adultos. Este proceso parece depender del estado metabólico y nutricional (Chaker et al., 2016).

En la corteza y el estriado, nuevas neuronas GABAérgicas parecen ser generadas a una tasa lenta para proveer de plasticidad a los circuitos, lo cual parece ser una opción más segura que la renovación de neuronas de proyección (Figura 2). La neurogénesis dopaminérgica sigue siendo un tema controversial, ya que en la mayoría de los estudios reportados no han identificado neuronas dopaminérgicas nuevas usando marcaje con BrdU. Sin embargo, se ha demostrado que neuronas dopaminérgicas derivadas de ESCs humanas y trasplantadas a la sustancia nigra del ratón tienen la habilidad de proyectar al estriado (Grealish et al., 2014) mostrando la factibilidad de que nuevas neuronas de proyección alcancen su blanco en el cerebro del mamífero adulto. De esta manera, a pesar de que es poco probable la existencia de las claves necesarias para guiar la formación de circuitos primarios en el cerebro adulto, el andamiaje que puede prevalecer después de un proceso neurodegenerativo puede ser usado por las neuronas nuevas para restablecer las proyecciones adecuadas.

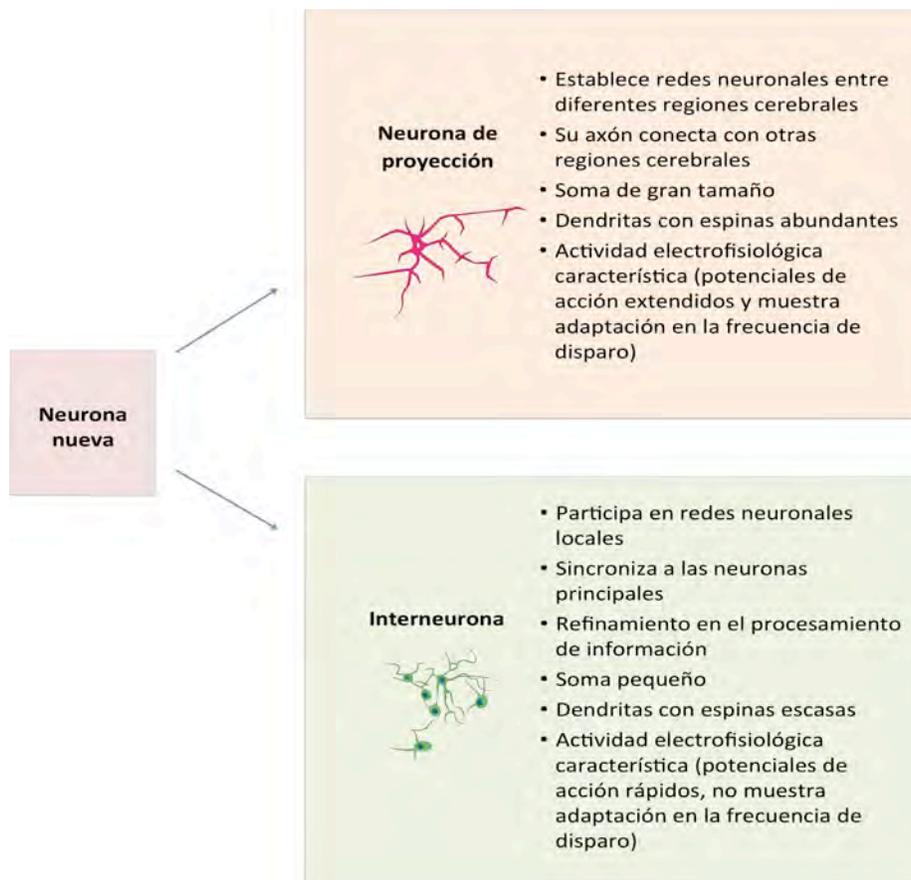


Figura 2. Principales características de una neurona de proyección y una interneurona.

1.4 Potencial neurogénico del cerebro adulto

Dada la evidencia que existe sobre el origen de neuronas nuevas en el cerebro adulto. Hemos clasificado al proceso neurogénico en típico y atípico. El primero involucra la participación de NSCs, mientras que el segundo parte de células diferenciadas o precursoras de otros linajes, que no necesariamente atraviesan por una etapa de división celular (Figura 3).

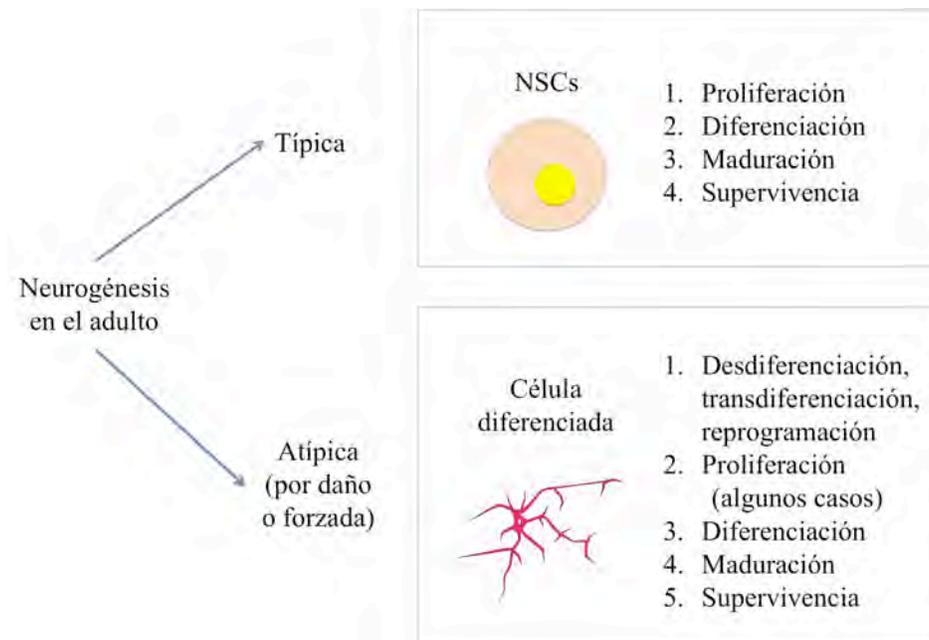


Figura 3. La neurogénesis en el adulto se puede dividir en típica y atípica. Un proceso típico involucra la participación de NSCs, las cuales proliferan para autorrenovarse y dar origen a células de amplificación transitoria que a su vez derivarán en neuronas nuevas que se integrarán a circuitos neuronales preexistentes. En el proceso atípico no necesariamente se parte de NSCs o NPCs, sino que células diferenciadas pueden entrar en un proceso de desdiferenciación, transdiferenciación o reprogramación pasando o no por etapas de proliferación, para posteriormente diferenciar en neuronas nuevas que se integrarán a circuitos neuronales preexistentes.

1.4.1 Neurogénesis a partir de células troncales neurales (típica)

Respecto a la posibilidad de que otras regiones del cerebro adulto posean potencial neurogénico, muchos estudios se han enfocado en la búsqueda de NSCs y su progenie por la combinación de inmunomarcajes contra BrdU y marcadores de neuroblastos y neuronas maduras. Células en división (BrdU⁺), las cuales potencialmente son NSCs, y su progenie neuronal identificada por marcadores neuronales como Tubb3, NeuN, HuD, MAP2, entre otros, han sido detectados en la

corteza, el estriado, la amígdala, la corteza piriforme, el hipotálamo, la SN y en el núcleo del vago (Gould, 2007).

En 2014, Conway y Schaffer reportaron una amplia distribución de células inmunorreactivas al receptor EphB4 (EphB4R) –algunas de las cuales coexpresaban al marcador de NSCs, Sox2-. La administración de su ligando efrina B2, normalmente producido por astrocitos hipocampales, incrementó la neurogénesis en el hipocampo y el surgimiento de células marcadas con Dcx en el estriado y la corteza, un indicador de la presencia de NSCs quiescentes en estas regiones (Conway y Schaffer, 2014).

Específicamente, neuronas nuevas han sido detectadas en la amígdala, la corteza piriforme y la corteza temporal de primates no humanos (Bernier et al., 2002); la amígdala e hipotálamo en hembras de topillos de la pradera (Fowler et al., 2002) y de ratón (Chaker et al., 2016); y en el núcleo del vago en ratas (Bauer et al., 2005). En algunos casos, el tipo neuronal específico ha sido identificado. Por ejemplo, en la corteza y estriado de ratas, las neuronas nuevas expresan marcadores GABAérgicos como GABA/GAD-67, calbindina y calretinina (Dayer et al., 2005). Mientras que en el núcleo caudado de conejos, las neuronas nuevas son calretinina positivas (Luzzati et al., 2006). De manera similar, en el estriado de humanos las interneuronas GABAérgicas nuevas parecen generarse *in situ* a partir de NSCs (Ernst et al., 2014).

En ningún caso reportado, las neuronas nuevas identificadas parecen ser de proyección, por el contrario todas parecen integrarse a los circuitos locales. Una excepción parece ser la SN, estructura en la cual se había reportado el nacimiento de neuronas dopaminérgicas nuevas (Zhao et al., 2003) sin haber sido replicado por otros grupos (Frielingsdorf et al., 2004; Lie et al., 2002). Hasta años recientes, se ha sugerido que la neurogénesis dopaminérgica continúa a lo largo de la vida aunque a una tasa baja en comparación con los nichos neurogénicos ampliamente reconocidos (Albright et al., 2016; Morrison, 2016). Mediante el uso de ratones Nes-CreER o Sox2-CreER a los cuales se les eliminaron los alelos “floxeados” *Th*, Albright et al. (2016) han propuesto que la fuente de neuronas dopaminérgicas nuevas son células Nes⁺/Sox2⁻. De manera alternativa, otro grupo de trabajo ha sugerido que las células precursoras capaces de dar origen a nuevas neuronas dopaminérgicas en la SN, no residen en esa región, sino en una zona ventricular cercana, la región periacueductal (pAq; (Hermann et al., 2006; L'Episcopo et al., 2014).

A pesar de estas observaciones, en contraste con la neurogénesis en la ZSV y la ZSG, el número de NSCs en división y/o el número de neuronas nuevas es relativamente bajo en condiciones normales. Sin embargo, se ha reportado que bajo condiciones de daño se estimula la proliferación de NSCs, así como el nacimiento de neuronas nuevas en estas zonas neurogénicas potenciales. Por ejemplo, condiciones isquémicas o el daño excitotóxico en el estriado inducen la generación de neuronas nuevas que expresan marcadores de neuronas medianas espinosas aunque con una eficiencia de recuperación del 0.2% de neuronas perdidas; el origen de estas neuronas parecen ser NSCs de la ZSV, lo cual sugiere que este nicho contiene células precursoras con el potencial de diferenciar a neuronas estriatales (Arvidsson et al., 2002; Collin et al., 2005). A este respecto, parece ser que las NSCs son reclutadas desde nichos vecinos.

Por otro lado, también se ha reportado el surgimiento de neuronas nuevas en la corteza de roedores después de realizar un daño, las cuales aparentemente son capaces de establecer conexiones corticotalámicas (Magavi et al., 2000). En la SN, el número de células proliferantes incrementa y nuevas neuronas emergen después de hacer un daño con 6-hidroxidopamina (6-OHDA), una toxina altamente específica de neuronas catecolaminérgicas (Zhao et al., 2003), sin embargo un estudio similar no corroboró esta conclusión (Frielingsdorf et al., 2004). De manera similar, la muerte de neuronas dopaminérgicas inducida por 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) despierta la actividad neurogénica de otra región descrita como nicho neurogénico, la pAq del mesencéfalo, la cual parece reparar la SN dañada mediante la incorporación de neuronas dopaminérgicas nuevas (Th^+ , Dat^+ ; (Hermann et al., 2006; L'Episcopo et al., 2014).

Así que, aun cuando la capacidad neurogénica del cerebro parece extenderse a otras regiones en el cerebro adulto, sigue siendo un proceso ineficiente. Las observaciones anteriores no excluyen la posibilidad de que células residentes que sean capaces de generar neuronas existan en diferentes regiones del cerebro adulto. Sin embargo, ninguna de las condiciones evaluadas han sido capaces de activarlas para iniciar un proceso neurogénico. Si este fuera el caso, la región neurogénica en cuestión debería poseer un ambiente si no inductivo, al menos permisivo para la neurogénesis. Ante esta circunstancia nuestro grupo de investigación decidió, en contraste con la identificación de NSCs, determinar el potencial neurogénico del cerebro adulto mediante la evaluación de la capacidad inductiva o permisiva a la neurogénesis de células transplantadas con potencial neurogénico amplio. Así, hemos reportado que las EBCs derivadas de ESCs [línea

celular R1B5; E gfp^+ (proteína verde fluorescente)] son un buen sensor de ambientes neurogénicos y de la presencia de señales de especificación en el embrión (Baizabal y Covarrubias, 2009). Con esta base, se evaluó el comportamiento de las EBCs trasplantadas a un nicho neurogénico del roedor adulto, la ZSV-vía migratoria rostral, encontrando que alrededor del 50% de las células trasplantadas alcanzaron un destino neuronal tres semanas después del trasplante. Esto indica que, las EBCs también detectan nichos inductivos o permisivos a la neurogénesis en el cerebro adulto y, entonces, pueden servir para identificar el potencial de otras regiones. Tomando esto en consideración, se evaluaron el estriado y la sustancia nigra pars compacta (SNpc), dos regiones cerebrales con un potencial neurogénico en entredicho y afectadas durante el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas. En el caso del estriado, se observó una abundante diferenciación glial, mientras que en la SNpc, un 48% de las células trasplantadas expresaron marcadores neuronales, sugiriendo que esta región es permisiva a la neurogénesis y, por lo tanto, pudiera contener NSCs. En concordancia con esta posibilidad, en estos experimentos se detectaron células endógenas (E gfp^-) en proceso de diferenciación neuronal, por la expresión del marcador de neuronas inmaduras, Dcx. Esto atrajo la atención del grupo de investigación, ya que otros grupos se habían dado a la tarea de evaluar la presencia de células con este marcador en condiciones normales o de daño sin encontrar evidencia alguna (Frielingsdorf et al., 2004). Es importante resaltar que las células trasplantadas no expresaron la enzima tirosina-hidroxilasa (Th), un marcador típico de las neuronas dopaminérgicas. Por lo que se estimó, que no existen las señales de especificación necesarias para dirigir la diferenciación al fenotipo dopaminérgico (Maya-Espinosa et al., 2015) o, alternativamente, las NSCs no responden a señales de especificación lo que dificultaría su cambio de destino aún bajo condiciones experimentales. De esta manera, pueden existir “nichos neurogénicos silenciosos” en espera de las condiciones necesarias para activar NSCs latentes que pueden existir en el cerebro adulto.

Como ya se mencionó, la estrategia que se ha utilizado para detectar neurogénesis en la SN es la incorporación de BrdU acoplada a la presencia de marcadores inmunofenotípicos neuronales como NeuN, o marcadores específicos del linaje dopaminérgico como Th. Sin embargo, los trabajos de investigación realizados han arrojado resultados contradictorios que pueden deberse a variaciones en la dosis administrada de BrdU, su vía de administración, así como en los criterios utilizados para identificar las neuronas marcadas con BrdU (Frielingsdorf et al., 2004; Lie et al., 2002; Zhao et al., 2003). En el estudio de Lie et al. (2002) también cultivaron las células en

presencia de Fgf-2 o Fgf-8 encontrando células con características de NPCs. Éstas células, sin embargo, no derivaron en neuronas en la SNpc pero sí en la ZSG del hipocampo. Por lo que, si bien no se puede considerar una conclusión definitiva, la postura general de la comunidad científica es que la SN es una región no o pobremente neurogénica. Otros investigadores han propuesto que la neurogénesis dopaminérgica continua toda la vida aunque a una tasa muy baja, en comparación con las zonas neurogénicas clásicas (Albright et al., 2016; Morrison, 2016) y otros proponen que la neurogénesis en esta zona se presenta y/o incrementa en respuesta a una lesión (Shan et al., 2006; Zhao et al., 2003)

Una alternativa en la generación de neuronas nuevas en una región particular puede ser la migración desde un sitio remoto como ocurre en el sistema ZSV-bulbo olfatorio. En este sentido, existe evidencia de la presencia de células progenitoras en la pAq que pueden migrar hacia la SN e inclusive adquirir características de neuronas dopaminérgicas previo a su arribo a la SNpc tras activar a esta población mediante una lesión con MPTP (Hermann et al., 2006; L'Episcopo et al., 2014).

1.4.2 Neurogénesis a partir de células neurales no troncales en el cerebro adulto (atípica)

Existe evidencia que sugiere que una amplia variedad de células en el cerebro adulto (astrocitos, oligodendrocitos y sus precursores) tienen potencial neurogénico cuando son estimuladas, por la infusión de factores de crecimiento o daño, o trasplantadas a un ambiente neurogénico. Células progenitoras NG2⁺ han sido identificadas en la corteza (Dayer et al., 2005) y en la SN (Lie et al., 2002; Steiner et al., 2006). Anteriormente se creía que estas células sólo podían generar nuevos oligodendrocitos *in vivo*, sin embargo también han mostrado potencial multipotente *in vitro* (Belachew et al., 2003) y producen neuronas cuando se trasplantan a una región neurogénica como el hipocampo (Aguirre et al., 2004; Lie et al., 2002).

Recientemente, se ha demostrado que astrocitos parenquimales ganan propiedades neurogénicas en respuesta a isquemia, transitando de células Gfap⁺/S100⁺ (gliales) a neuroblastos (Ascl1⁺/Dcx⁺) hasta derivar en nuevas neuronas maduras (NeuN⁺) (Magnusson et al., 2014). El mecanismo involucrado parece ser una reducción en la actividad de la vía de señalización de Notch, la cual también al reducirse experimentalmente sin provocar ningún daño en el estriado promueve neurogénesis. Esto sugiere que los astrocitos pueden activar un programa neurogénico latente y ganar potencial de precursor multipotente. Una conversión similar, dependiente de la

inhibición de Notch, también se ha reportado en la cóclea. En este caso, células de soporte transdiferencian directamente, con mínima proliferación celular, en nuevas células del pelo de la oreja, las cuales actúan como receptores encargados de transducir los estímulos acústicos (Bramhall et al., 2014).

Estas observaciones indican que hay células que tienen un potencial neurogénico intrínseco pero que debido a la falta de factores exógenos neurogénicos no puede ser manifestado. Además, deben de tomarse en cuenta las restricciones genómicas que las células diferenciadas pueden tener. En particular, los astrocitos reactivos han sido considerados una fuente potencial de nuevas neuronas (Robel et al., 2011), sin embargo no diferencian a nuevas neuronas cuando emergen en regiones lesionadas. Anteriormente se creía que el estado diferenciado de una célula era irreversible, aunque ahora se sabe que la expresión de ciertos “genes maestros”, los cuales codifican a factores de transcripción pueden incrementar la plasticidad del genoma o forzar la conversión en tipos celulares específicos. Por ejemplo, la expresión forzada del gen proneuronal *Ascl1* (también conocido como *Mash1*) no es suficiente para activar un programa neuronal en astrocitos “normales” en un modelo *in vivo*, sin embargo, astrocitos reactivos sí se convierten en nuevas neuronas, aunque con una eficiencia limitada.

A este respecto, también se ha demostrado que la expresión de *Sox2* en astrocitos dirigida por el promotor de *Gfap* promueve diferenciación neuronal (Niu et al., 2015). De manera similar, la combinación de *Ascl1* con factores reprogramadores como *Oct4*, *Sox* o *Nanog* en astrocitos humanos puede generar células precursoras que derivan en neuronas *in vitro* e *in vivo* (Corti et al., 2012). Estos datos apoyan la idea de cambiar el estado de estas células restringidas mediante manipulaciones genéticas con un propósito terapéutico pero no implica que estos procesos ocurran de manera normal en el cerebro o como un mecanismo de reparación.

1.5 La neurogénesis en el adulto desde un punto de vista evolutivo (recambio vs. neurogénesis reparativa)

La generación de neuronas nuevas tiene lugar en diferentes procesos (Figura 4). Cómo ya se ha mencionado, la neurogénesis en las zonas ampliamente reconocidas en el adulto como la ZSV-BO y la ZSG-giro dentado ocurre de manera pasiva aparentemente por la demanda funcional de las estructuras cerebrales involucradas. Mientras tanto, la regeneración neuronal que pudiera ocurrir ante una lesión (p.ej. choque isquémico) o para restituir las neuronas perdidas en el curso

de alguna enfermedad neurodegenerativa (p.ej. enfermedad de Parkinson y Alzheimer) implica la activación de un proceso que pretende conseguir una recuperación funcional. Otra reparación más demandante, la regeneración cerebral, implica no solo la recuperación de las neuronas perdidas sino del tejido completo con todos los tipos celulares neurales (astrocitos, oligodendrocitos, células endoteliales) y una organización adecuada. La ocurrencia y eficiencia de estos diferentes procesos varía enormemente entre los diferentes filos del reino animal.

En ausencia de lesión, la neurogénesis también ha sido observada en vertebrados adultos no-mamíferos. El ejemplo inspirador es la neurogénesis en aves como el pinzón y el canario. La neurogénesis en estos pájaros es estacional y está relacionada con el aprendizaje del canto. Durante la época reproductiva, nuevas neuronas de proyección son reclutadas y como consecuencia, el núcleo de control del canto incrementa de tamaño en un proceso dependiente de testosterona. Las células precursoras residen en la zona ventricular (ZV) y las nuevas neuronas migran a través de las fibras de la glía radial hasta llegar al centro vocal (HVC) e integrarse a circuitos neuronales funcionales (Nottebohm, 1985; Nottebohm y Liu, 2010).

Otro ejemplo es la abundante y extensa neurogénesis observada en el cerebro adulto del pez cebra, un vertebrado con una alta capacidad neurogénica (Kizil et al., 2012). Se ha reportado neurogénesis activa en el bulbo olfatorio, el telencéfalo, el tálamo, el epitálamo, la región preóptica, el hipotálamo, el tectum, el rombencéfalo, la médula espinal y el cerebelo (Becker y Becker, 2008; Kaslin et al., 2008). Sus dieciséis nichos progenitores están distribuidos a lo largo del eje rostro-caudal y contienen células troncales neurales, entre ellas glía radial, que dan lugar a diversos tipos neuronales (Kizil et al., 2012). En otro teleosteo, *Apteronotus leptorhynchus*, una lesión en el cerebelo induce proliferación celular y la regeneración de neuronas granulares (Zupanc y Ott, 1999).

Los urodelos (anfibios con cuatro patas y cola en su etapa adulta) y ciertos lagartos muestran proliferación restringida en el telencéfalo y el diencefalo rostral en condiciones normales. Sin embargo, en la salamandra, se ha reportado que tras realizar un daño en el mesencéfalo –una región normalmente quiescente– se induce la generación de neuronas dopaminérgicas (Berg et al., 2010). Los reptiles, en general, incorporan células nuevas en el telencéfalo mientras que, en particular, algunos lagartos muestran una extensa regeneración de la corteza cerebral después de un daño. La cual parece ser tan eficiente como para hacer indistinguible un cerebro regenerado de

uno intacto (Font et al., 2001). Sin embargo, un estudio reciente realizado en ajolotes adultos demuestra que la regeneración después de la resección de parte de un hemisferio es un proceso incompleto, y que a pesar de regenerar todos los tipos neuronales perdidos el proceso falla en la recuperación de la arquitectura normal del tejido y en la reconexión de axones a grandes distancias (Amamoto et al., 2016). Por lo que, la regeneración aun en especies altamente regenerativas parece ser un proceso limitado.

Desde un punto de vista filogenético, la regeneración parece ser una característica propia de los metazoarios que ha sido perdida por razones aun desconocidas. Comúnmente, especies con la habilidad de regenerar cierta parte del cuerpo, por ejemplo, alguna extremidad o la cola, también son capaces de regenerar otros órganos con alta eficiencia. Como consecuencia, no sorprende encontrar en urodelos, reptiles y peces una neurogénesis incrementada y la habilidad de regenerar la médula espinal (Tanaka y Ferretti, 2009). La regeneración es un proceso que requiere un extensa proliferación y diferenciación celular, entonces uno podría suponer que una capacidad regenerativa incrementada pudiera originarse, al menos en parte, en los mecanismos que controlan la proliferación, diferenciación y mantenimiento de las reservas de células troncales y progenitoras. Apoyando esta idea, el gen que codifica para el factor p19, un inhibidor del ciclo celular, no está presente en el locus Ink4 en urodelos (Pomerantz y Blau, 2013).

A pesar de las similitudes, hay ciertas características distinguibles entre los cerebros adultos de mamíferos, peces y anfibios, las cuales pueden marcar la diferencia en la capacidad regenerativa. Por ejemplo, las células de la glía radial –las células troncales neurales embrionarias- persisten en la etapa adulta como endimoglia en peces y anfibios (Berg et al., 2010). Mientras que en mamíferos, las células neuroepiteliales transitan hacia células de la glía radial y finalmente se convierten en astrocitos del cerebro adulto (Kriegstein y Alvarez-Buylla, 2009). De hecho, las células gliales más abundantes en el cerebro de mamíferos adultos son los astrocitos parenquimales.

Otra diferencia interesante es la distribución del sistema ventricular. En mamíferos y otros vertebrados, los nichos neurogénicos principales en el cerebro adulto estan asociados con el sistema ventricular en donde células tipo-astrocitos actúan como células precursoras.

El sistema ventricular del pez cebra cruza por encima del telencéfalo trazando una configuración en forma de T, desde una vista coronal (Mueller, 2012). Esta organización puede contribuir a la

distribución de los precursores neurales, y del proceso neurogénico en si mismo, a diferentes partes del cerebro. Mientras que en el cerebro del mamífero adulto, el sistema ventricular envuelve a los nichos neurogénicos.

Otras características en contra de la regeneración cerebral en mamíferos es la presencia de mielina, la cual actúa como un aislante alrededor de los axones, y que a su vez es inhibitoria para la regeneración axonal (Chaudhry y Filbin, 2007); y la formación de la cicatriz glial compuesta por matriz extracelular y proteoglicanos, la cual se forma después de algún daño y constituye una barrera para la regeneración axonal y la neurogénesis, mientras que en peces y lagartos los axones pueden regenerar aun en su presencia (Tanaka y Ferretti, 2009).

Asimismo, un estudio reciente mostró que las salamandras comparten los mismos nichos neurogénicos con los mamíferos, sin embargo después de realizar algún daño en una región aparentemente no neurogénica, el tipo neuronal perdido se puede regenerar a través de la activación de células endimogliales, un tipo celular aparentemente ausente en mamíferos, como ya se ha mencionado. Esta última observación apoya la idea de que existen áreas quiescentes en el cerebro de estas especies que pueden ser activadas para generar nuevas neuronas bajo ciertas condiciones fisiológicas o patológicas (Berg et al., 2010).

Interesantemente, astrocitos parenquimales en mamíferos tienen la capacidad de proliferar y re-expresar proteínas características de la glía radial y de CTN, como vimentina y nestina, durante la reacción astrogial que ocurre después de un daño. In vitro, se ha reportado que estos astrocitos adquieren la capacidad de formar neuroesferas en contraste con astrocitos derivados del cerebro intacto (Robel et al., 2011). En este contexto, existe la posibilidad de que astrocitos parenquimales derivados directamente de células de la glía radial mantengan memoria y se comporten como células precursoras tras un daño o ciertas condiciones fisiológicas. A este respecto, un reporte realizado por Magnusson et al. (2014) muestra que astrocitos parenquimales del estriado adquieren identidad neuronal. Como consecuencia, es posible pensar que células gliales cercanas a un sitio de daño puedan ganar potencial multipotente y sean una fuente de neuronas nuevas, en analogía con la población de endimoglia presente en los urodelos.

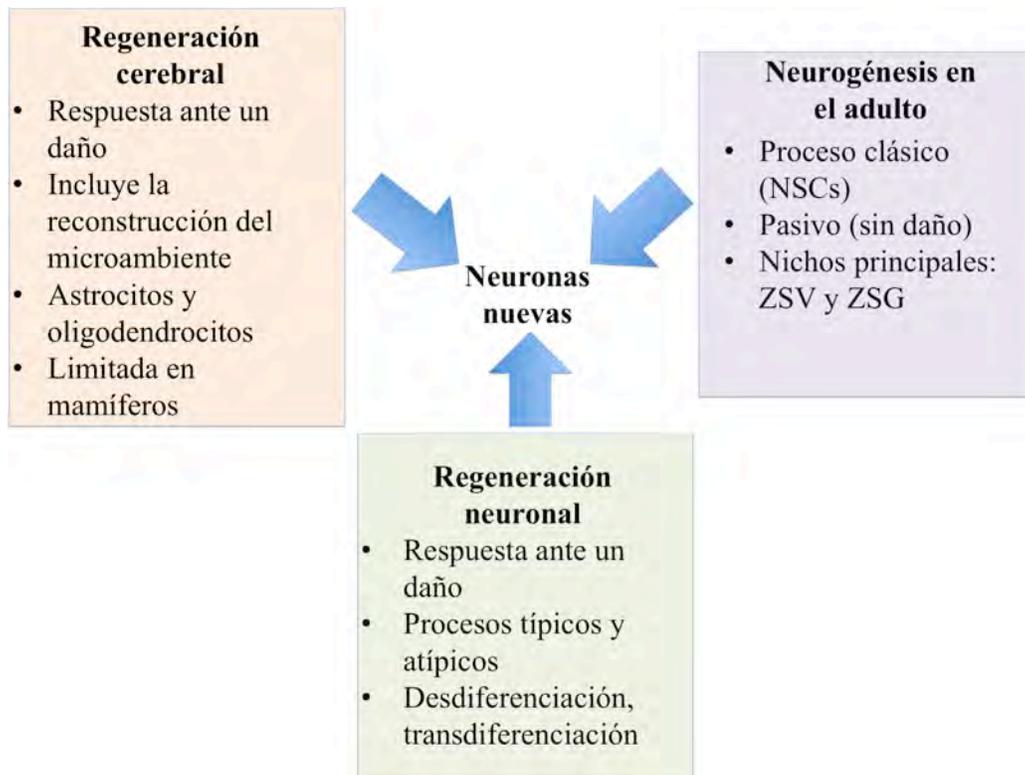


Figura 4. Procesos a través de los cuales se pueden generar neuronas nuevas en el cerebro adulto: regeneración cerebral, neurogénesis y regeneración neuronal.

1.6 Inducción de la diferenciación dopaminérgica

La confirmación de la generación de neuronas nuevas en el cerebro adulto abrió la posibilidad de regenerar aquellas poblaciones perdidas en el curso de alguna enfermedad neurodegenerativa o lesión cerebral. Sin embargo, para obtener un rescate funcional es necesario restablecer la población neuronal específica y su integración a los circuitos preexistentes. Para poder identificar la señalización y los mecanismos necesarios para generar un tipo neuronal en particular se ha recurrido a los estudios realizados en embriones, ya que durante la etapa embrionaria se cuentan con todos los factores internos y externos para dirigir la especificación y compromiso celulares. Actualmente, se considera que los factores tróficos y los factores de transcripción son una buena opción para inducir mecanismos de proliferación, especificación y diferenciación de NSCs (Guerrero-Flores, 2011). Si por un lado, analizamos a los factores involucrados en la especificación de neuronas dopaminérgicas durante el desarrollo embrionario. Se han identificado a *Lmx1a* y *Foxa2* como factores transcripcionales relevantes en este proceso (Andersson et al.,

2006; Lin et al., 2009). *Lmx1a* se expresa en la placa del piso al día de desarrollo embrionario E9 de ratón en los progenitores dopaminérgicos mesencefálicos ubicados en la línea media ventral (Figura 5), y su eliminación conlleva a una reducción en la producción de neuronas dopaminérgicas. Además, existe evidencia de que la sobreexpresión de *Msx1* o *Lmx1b* (Andersson et al., 2006) o de la combinación de *Nurr1* y *Pitx3* (Martinat et al., 2006) permite especificar la diferenciación de ESCs. Por otro lado, se ha reportado un incremento de más del 50% en el número de neuronas dopaminérgicas mesencefálicas a partir de ESCs de ratón (Andersson et al., 2006) y de humanos (Friling et al., 2009) que sobreexpresan *Lmx1a* bajo el control del promotor de *Nes* y se han expuesto al factor *Shh* (Sonic hedgehog), un morfógeno producido por las células de la placa del piso. *Foxa2*, por su parte, es un factor que confiere identidad a las células de la placa del piso mediante la inducción de *Shh* pero, independientemente de esta función también contribuye en la especificación dopaminérgica. De hecho, se ha demostrado que su coexpresión con *Lmx1a* genera neuronas dopaminérgicas sin la presencia de *Shh*, lo cual no se obtiene con la sobreexpresión de este factor en solitario (Nakatani et al., 2010).

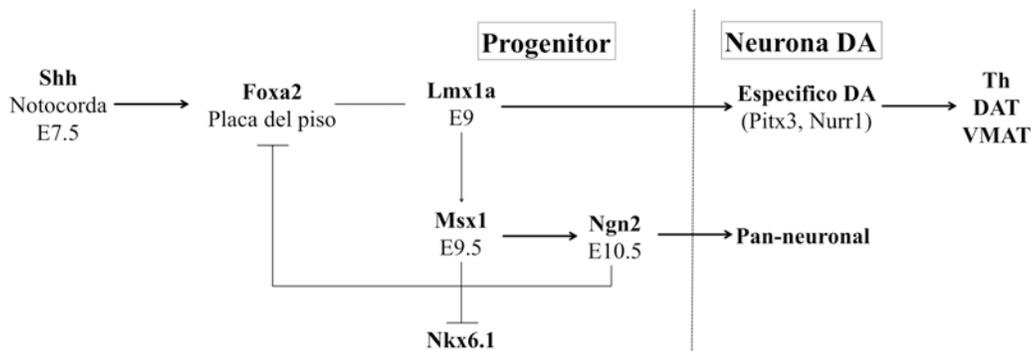


Figura 5. Modelo de especificación dopaminérgica (DA) modificado de Andersson et al., 2006. *Shh* secretado por la notocorda hacia E7.5 induce la formación de la placa del piso cuyas células expresan *Foxa2*. La inducción de *Lmx1a* se da de manera indirecta. *Lmx1a* a su vez induce a *Msx1* en los progenitores DA (E9.5) activando propiedades celulares específicas. *Msx1* también reprime a *Nkx6.1* y destinos celulares alternativos e induce la expresión de *Ngn2*. Esta inducción de *Ngn2* reprime características de placa del piso e induce la diferenciación neuronal. Dado que *Lmx1a* induce la generación de neuronas DA solamente en progenitores ventrales, la señalización mediada por *Shh* opera en paralelo con *Lmx1a*.

En el caso de animales adultos, se ha reportado la obtención de neuronas dopaminérgicas inducidas a partir de astrocitos mediante la sobreexpresión de *Lmx1a* en conjunto con dos factores de transcripción proneuronales como *NeuroD1* y *Ascl1* (*Mash1*) (Rivetti di Val Cervo et

al., 2017). Así como, la conversión directa de fibroblastos humanos y murinos a través de la sobreexpresión de *Ascl1*, *Nurr1* y *Lmx1a* (Caiazzo et al., 2011). En los casos de los protocolos para obtener neuronas dopaminérgicas a partir de fibroblastos de diferentes fuentes (Xu et al., 2017) pareciera ser necesaria la participación de *Ascl1* para activar genes neuronales que normalmente no expresan los fibroblastos (Wapinski et al., 2013). Mientras que entre los factores necesarios para la especificación dopaminérgica *Lmx1a* (Caiazzo et al., 2011; Jiang et al., 2015) y *Foxa2* (Lim et al., 2015) siguen siendo clave.

Tomando en cuenta estos antecedentes, en el presente proyecto se consideró a la pareja *Lmx1a-Foxa2* como factores transcripcionales clave que permitirían inducir la diferenciación a neuronas dopaminérgicas mesencefálicas a partir de NPCs que no tuvieran dicho compromiso.

Capítulo 2

2.1 Planteamiento del Problema

El proceso de neurogénesis en el cerebro adulto se ha descrito en diferentes especies de mamíferos, incluyendo al ser humano, aunque con ciertas reservas. Actualmente, se reconocen dos nichos neurogénicos independientes: la zona subgranular (ZSG) del hipocampo y la zona subventricular (ZSV) localizada en las paredes de los ventrículos laterales. Dichas regiones generan nuevas interneuronas que se integran a la capa granular del giro dentado y a las capas granulares del bulbo olfatorio, respectivamente. Sin embargo, varios trabajos sugieren la existencia de neurogénesis en otras estructuras, como la corteza, el estriado, la amígdala, el hipotálamo y la SN, que parecen activarse bajo manipulaciones experimentales como hipoxia, infusión de factores de crecimiento o fármacos. Recientemente, nuestro grupo de trabajo reportó que los EBs derivados de las ESCs sirven como un buen sensor de ambientes neurogénicos y de la presencia de señales de especificación de NPCs en el embrión en desarrollo. Tomando en consideración estos resultados, en colaboración con el grupo del Dr. Drucker-Colín, se determinó que las EBCs también sensan nichos permisivos a la neurogénesis en el cerebro adulto. En particular, el trasplante de EBCs en la SNpc muestra que esta región es permisiva a la neurogénesis (e.g., 48% de las células expresan marcadores neuronales), aunque la especificación y la diferenciación dopaminérgica no parecen ocurrir (e.g., no se detectan células Th^+). Interesantemente, en estos experimentos se detectaron células endógenas que llevan a cabo neurogénesis (Dcx^+ , doblecortina positivas), aunque al igual que las células trasplantadas, la diferenciación no parece ser dopaminérgica. Con estos resultados podemos sugerir que el trasplante de EBCs crea un ambiente que favorece la neurogénesis, no solo originada desde las propias EBCs sino también desde células del tejido hospedero. En principio, esto implicaría la activación de NPCs “durmientes” en la SN, o la activación de un proceso de desdiferenciación o transdiferenciación en las células diferenciadas en esta región. Alternativamente, las nuevas neuronas podrían originarse de células progenitoras en la región periventricular del acueducto que se ha mostrado tienen potencial de generar nuevas neuronas dopaminérgicas, las cuales eventualmente migran a la SNpc. Independientemente del mecanismo neurogénico involucrado, es importante preguntarnos si este proceso es específico (e.g., comprometido a generar neuronas dopaminérgicas) o flexible tal que sea accesible a la especificación por factores de transcripción

provistos exógenamente. Entre los principales candidatos se encuentran *Lmx1a* y *Foxa2*, por ser elementos clave durante la especificación dopaminérgica en el embrión.

2.2 Hipótesis

Existen células en la SN que tienen la capacidad de generar neuronas nuevas y mantienen la plasticidad para dirigir su diferenciación hacia el fenotipo dopaminérgico.

2.3 Objetivos

Principal

Promover neurogénesis en la SN del cerebro de roedor adulto.

Particulares

a) Determinar la existencia de NPCs en la SN del cerebro adulto de rata y ratón a través de las siguientes estrategias:

1. Corroborar la presencia de células Dcx^+ en la SN después del trasplante de EBs.
2. Determinar la presencia y el destino de NPCs proliferantes en la SN trasplantada de rata y ratón.
3. Determinar la capacidad de células de la SN trasplantada de formar neuroesferas en cultivo.
4. Determinar la capacidad de células de la SN de generar neuronas en cultivo.
5. Evaluar la coexpresión de marcadores gliales y de neuronas inmaduras en las células Dcx^+ observadas a los 15dpt en la SN trasplantada.
6. Realizar el marcaje genético de las células Dcx^+ observadas a los 15dpt en la SN trasplantada mediante el uso de un ratón doble transgénico *Gfap-cre/ERT2;Gt(ROSA)26Sor^{tm4(ACTB-tdTomato,-EGFP)}*.

b) Identificar el origen de las NPCs encontradas en la SN.

1. Determinar la capacidad de generación de células Dcx^+ a partir del cocultivo de células de la SN intacta con células de EBs.

c) Evaluar la participación de un ambiente angiogénico en la inducción neurogénica en la SN trasplantada

1. Evaluar *in vitro* el comportamiento de células de la SN expuestas a Vegf y Fgf-2, factores solubles secretados por los EBs

2. Evaluar la inducción neurogénica por inyección de Vegf y Fgf-2 en la SN de ratones adultos
3. Evaluar el efecto del bloqueo de un proceso angiogénico mediado por Vegf sobre la neurogénesis en la SN trasplantada mediante la administración de Ciclosporina A

d) Inducir diferenciación dopaminérgica específica a partir de NPCs en la SN mediante la sobreexpresión de Lmx1a y Foxa2 usando un sistema inducible por doxiciclina.

1. Construir un vector de expresión inducible por doxiciclina.
2. Insertar Lmx1a, Foxa2 o ambos al vector referido.
3. Determinar la generación de neuronas dopaminérgicas mesencefálicas como resultado de la inducción.

Capítulo 3

Materiales y métodos

3.1 Animales experimentales

Para la ejecución de los experimentos fueron empleadas ratas macho adultas Wistar de entre 2-3 meses de edad (300 g) o ratones macho adultos (28-30 g). En el caso de los ratones, se emplearon como receptores del trasplante diferentes genotipos, ya sea silvestre (CD1), *Egfp*⁺ (cepa que expresa constitutivamente la proteína verde fluorescente, *Egfp*), *tdTomato* [B6.129(Cg)-*Gt(ROSA)26Sor*^{tm4(ACTB-tdTomato-EGFP)Luo}/J, <https://www.jax.org/strain/007676>], o doble transgénico *Gfap-cre/ERT2* [B6.Cg-Tg(*GFAP-cre/ERT2*)505Fmv/J, <https://www.jax.org/strain/012849>] y *tdTomato/Egfp*. En el ratón *tdTomato*, todas las células expresan de manera constitutiva la proteína reportera *tdTomato*, mientras que en el ratón doble transgénico *Gfap-cre/ERT2;Gt(ROSA)26Sor*^{tm4(ACTB-tdTomato,-EGFP)}, la recombinación mediada por una proteína Cre inducible por tamoxifen (CreERT2) apaga la expresión de *tdTomato* y prende la expresión de la *Egfp* solamente en células que expresan la proteína glial, *Gfap*. Una semana antes del trasplante, los ratones doble transgénicos fueron administrados con una dosis intraperitoneal diaria de tamoxifen (200 mg/kg) durante cinco días.

Todos los animales fueron mantenidos bajo condiciones estándar (ciclo 12 h luz/12 h oscuridad) con acceso *ad libitum* a comida y agua. Al término del experimento fueron sacrificados mediante una sobredosis de pentobarbital y se procedió a realizar una perfusión intracardiaca con una solución de PBS 0.1M seguida de una solución de paraformaldehído al 4%. El protocolo experimental del presente proyecto (#293) fue aprobado por el Comité de Bioética del Instituto de Biotecnología (Universidad Nacional Autónoma de México).

3.2 Formación de cuerpos embrioides (EBs)

Dos líneas celulares de ESCs de ratón fueron usadas para generar EBs: la R1 y su derivado R1B5, la cual expresa de manera constitutiva la proteína *Egfp*. Los EBs tienen la capacidad de recapitular algunas de las etapas tempranas de la embriogénesis en mamíferos. Su formación inicia al cultivar las ESCs en suspensión. Dichas células forman agregados, los cuales son evidentes al día 2, en los que las células externas empiezan a diferenciar a endodermo primitivo. Para el día 3, las células internas dan lugar a un ectodermo primitivo que se organiza de forma columnar y el endodermo primitivo diferencia a endodermo visceral y parietal. Entre el día 4-6,

las células del ectodermo primitivo generan progenitores ectodérmicos, mesodérmicos y endodérmicos (Baizabal-Carballo, 2009. Tesis de doctorado).

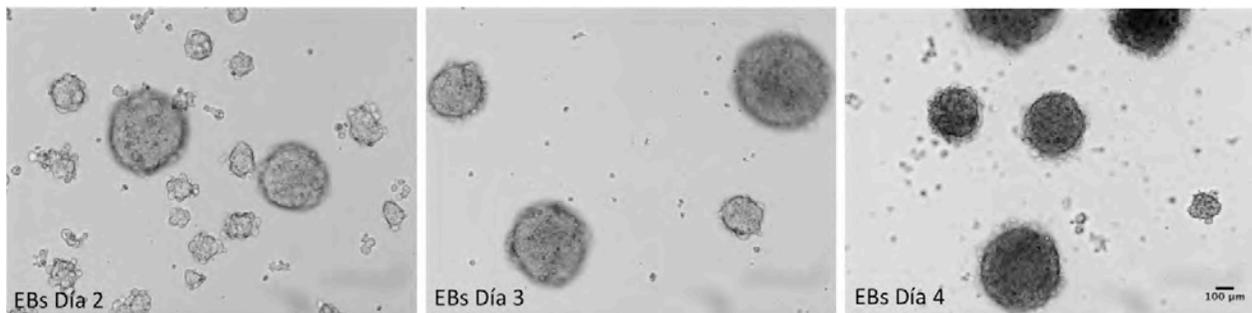


Figura 6. Formación de EBs. Al cultivar ESCs en condiciones no adherentes, estas forman agregados esféricos llamados cuerpos embrioides (EBs). Estos son evidentes apartir del día 2, continúan creciendo y hacia el día 4 in vitro, están rodeados en su mayoría por células tipo endodermo. EBs de 4 días fueron disgregados para el trasplante en la SN.

Para generarlos se siguió el protocolo descrito por Maya-Espinosa et al. (2015), el cual se describe brevemente a continuación y de manera detallada en la sección de Anexos. Para iniciar el cultivo de formación de EBs se sembraron 1×10^6 ESCs sobre una cama de fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs) mitomizados en medio M15 (ver Anexos). Después de dos días de cultivo, las ESCs fueron pasadas a platos sin células alimentadoras y fueron suplementadas con 1000 U de Lif (Factor inhibidor de leucemia) durante tres días. Para formar los EBs, 5×10^5 ESCs fueron transferidas a cajas bacteriológicas no adherentes de 10 cm y fueron cultivadas durante cuatro días sin Lif (Figura 6). Los agregados obtenidos al cabo de este tiempo fueron disgregados con tripsina al 0.25%, y se hizo una suspensión celular en medio Optimem (Gibco) para proceder con el trasplante.

3.3 Cultivos primarios de la sustancia nigra, zona subventricular y periacuedotal

Los cultivos primarios de diferentes áreas cerebrales se realizaron con el objetivo de identificar células con potencial de NPC. En la sección de Anexos se describe detalladamente el procedimiento para generar un cultivo primario de cerebro y a continuación se darán detalles de las diferentes manipulaciones que fueron aplicadas.

3.3.1 Cultivo de neuroesferas

Para confirmar la existencia de NPC en la SN trasplantada se realizó un cultivo de generación de neuroesferas a partir de la SN de 6 dpt en presencia de Egf y Fgf-2 (Figura 7). Primeramente, se

realizó la estandarización del protocolo mediante la generación de neuroesferas de la zona subventricular (ZSV) del cerebro de ratones adultos, ya que se ha demostrado que las NSCs residentes del nicho forman dichas neuroesferas a partir de los cinco días de cultivo en presencia de los factores Egf y Fgf-2.

Posteriormente, se inició el cultivo de EBs R1B5 (11 días) y se trasplantaron ratones CD1 adultos de 30g y a los 6 dpt se disecó la SN trasplantada y la SN sin trasplante (control). Asimismo, se disecaron ambas ZSV del último cerebro en procesar cómo control positivo. Cabe mencionar que para disecar las SN, primero se aisló la SN no trasplantada y posteriormente la SN trasplantada para evitar contaminación cruzada. También se tuvo cuidado de no tocar la zona periacueductal, ya que existe evidencia que sugiere la presencia de células progenitoras neurales en esta región (L'Episcopo et al., 2014). Se realizó la observación del cultivo a lo largo de quince días.

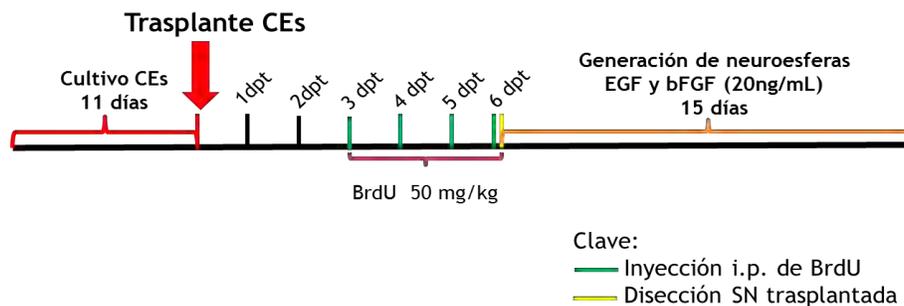


Figura 7. Esquema experimental del cultivo de neuroesferas a partir de la SN trasplantada a los seis días del trasplante de EBs.

3.3.2 Cocultivo de células de cerebro adulto con células de cuerpos embrioides

Con el propósito de evaluar la inducción neurogénica en un modelo *in vitro* que hiciera factible diversas manipulaciones experimentales como el uso de fármacos o transfecciones génicas. Se realizó el cocultivo de células obtenidas de la SN intacta con EBs de la siguiente manera: 1) Se realizó el cultivo de formación de EBs a partir de la línea celular de ESCs R1B5 como se ha descrito anteriormente (11 días). 2) Un día antes de que los EBs cumplieran 3.5 días de formación se realizó la disección de la SN, pAq, estriado y ZSV de tres ratones jóvenes adultos intactos (ver Anexos). Las células se cultivaron en presencia de los factores Egf y Fgf-2 (20ng/mL). 3) Al día siguiente se resuspendieron los EBs en medio definido y se agregaron 50µL de dicha suspensión con 10 EBs a cada caja de 35mm con las células de la correspondiente región cerebral disecada (SN, pAq, estriado y ZSV). 4) Al cuarto día de inicio del cocultivo se retiraron los factores de crecimiento y se dejó continuar el cultivo por cuatro días más. Al cumplirse este

plazo se fijaron las células con una solución de PFA al 4% y se procedió a realizar el análisis inmunofenotípico contra Dcx.

3.3.3 Cultivo de células de la sustancia nigra en presencia de desferroxiamina

Un posible mecanismo a través del cual las EBCs inducen neurogénesis en la SN adulta puede ser la generación de un ambiente hipóxico. Se ha descrito que las NSCs mantienen su potencial de proliferación y diferenciación en cultivo cuando se mantienen en condiciones de hipoxia. Asimismo, se sabe que en la ZSV se mantiene un ambiente relativamente hipóxico [(2.5-3%);(Santilli et al., 2010)].

HIF-1 es un factor de transcripción heterodimérico ubicuo que actúa como mediador de respuestas adaptativas a condiciones de hipoxia o isquemia. Consta de dos subunidades: HIF-1 α , cuya expresión es regulada por oxígeno molecular y HIF-1 β , expresada constitutivamente. Ambas unidades se dimerizan y se unen a los elementos de respuesta a hipoxia (HREs) entre los cuales se encuentran genes que codifican proteínas involucradas en procesos de angiogénesis, tono vascular y arteriogénesis (Mole et al., 2009; Rey y Semenza, 2010).

La desferroxiamina (DFX) es un agente quelante de Fe²⁺ que promueve la acumulación de HIF-1 α , ya que reduce la disponibilidad del hierro necesario para la actividad de las prolihidroxilasas que degradan a HIF-1 α (Rey y Semenza, 2010)

Para evaluar el efecto de la condición de hipoxia sobre la generación de neuroesferas de la SN en ausencia de EBCs, hicimos un cultivo primario de la SN y expusimos las células a tres diferentes concentraciones de DFX (0, 100, 200 y 400 μ M) durante tres periodos diferentes (3, 6 y 14 días) en presencia de los factores Egf y Fgf-2. Asimismo, generamos un cultivo de células de la ZSV como control.

3.3.4 Cultivo de células de la sustancia nigra en presencia de factores solubles secretados por células de cuerpos embrioides

Este experimento se realizó con el objetivo de evaluar la formación de neuroesferas en un cultivo de células de la SN en presencia de uno o varios factores solubles secretados por EBCs (ver protocolo en Anexos). El cultivo de células de la SN fue expuesto a Fgf-2, Vegf y BMP4 solos o en combinación en una concentración de 20 ng/mL. Se realizó la observación del cultivo a lo largo de dieciocho días.

3.3.5 Cultivo de células de la sustancia nigra en presencia de GDNF, BDNF, Fgf-2 y ácido valproico

En los cultivos primarios de células de la SN suplementados con Egf y Fgf-2 hemos encontrados grupos de células Nes positivas, que aparentemente no tienen la capacidad de formar neuroesferas. Por otro lado, la Biol. Gladys Mondragón observó durante sus estudios de licenciatura que al cultivar las células de la SN en condiciones de alto suero (20% de concentración final) se aísla una población con capacidad de proliferación Nes⁺/Vimentina⁺/Gfap⁻ (Mondragón-Figueroa, G., 2017. Tesis de licenciatura). Tomando en cuenta ambos antecedentes y sabiendo que GDNF (factor neurotrófico derivado de la glía) y BDNF (factor neurotrófico derivado del cerebro) promueven diferenciación neuronal en ESCs (Reyes et al., 2008); y el ácido valproico sesga a células de glioma C6 a diferenciar en neuronas, en lugar de astrocitos, así como a promover el crecimiento de neuritas (Benitez et al., 2008), y la maduración de neuroblastos inducidos en el cerebro adulto (Niu et al., 2015). Decidimos exponer un cultivo de SN previamente crecido en 20% de suero durante 15 días a GDNF, BDNF, Fgf-2 (20 ng/mL de cada factor) y ácido valproico 3 mM en medio N2B27 por 5 días más. Al finalizar este tiempo se realizaron inmunomarcajes contra Tubb3 y Gfap.

3.4 Trasplante de células de cuerpos embrioides en la sustancia nigra de ratas adultas

Para determinar la existencia de precursores neurales endógenos en la SN, se trasplantaron 150,000 células de EBs R1B5 (Egfp⁺) en ratas macho adultas Wistar de 250 g de peso y se administró una dosis diaria de 50 mg/kg de BrdU por vía intraperitoneal (i.p.), ver Figura 8. Utilizando una jeringa marca Hamilton de 10 µL se siguieron las siguientes coordenadas estereotáxicas respecto a Bregma: AP -4.7, L -1.6 y DV -8.1 (Paxinos y Watson, 2005). Para realizar el procedimiento los animales fueron anestesiados con una mezcla de ketamina (95 mg/kg) y xilazina (12 mg/kg).

En base a diversos estudios de neurogénesis en el adulto que han descrito sus diferentes etapas, así como los marcadores inmunofenotípicos expresados por las células nuevas y sus precursores (Alvarez-Buylla y Lois, 1995; Petreanu y Alvarez-Buylla, 2002). Nosotros propusimos el siguiente diseño experimental para evaluar las etapas y el destino de las células proliferantes endógenas de la SN. Para marcar las células en proliferación administramos i.p. 50 mg/kg de 5-

bromo-2'-desoxiuridina (BrdU) y evaluamos el destino de las células proliferantes detectando dicho marcador mediante inmunofluorescencia.

Proliferación: 1) Trasplantar los EBs y administrar i.p. BrdU media hora antes y al término del trasplante en una dosis de 50 mg/kg. Posteriormente, sacrificar a los animales 2 horas postrasplante (hpt). A este tiempo, la biodisponibilidad de BrdU para marcar nuevas células en el cerebro se ha reducido dramáticamente (Taupin, 2007). 2) Trasplantar los EBs y administrar BrdU al término del trasplante y dos horas antes del sacrificio, que será planeado 24 hpt. 3) Adicionalmente, se incluyó un grupo de sacrificio 2 días postrasplante (2 dpt) bajo el mismo sistema de administración de BrdU, al término del trasplante, un día después del trasplante y dos horas antes del sacrificio.

Diferenciación: 1) Trasplantar los EBs y administrar BrdU al término del trasplante, una dosis diaria y dos horas antes del sacrificio (50 mg/kg). Posteriormente, sacrificar a los animales 3 dpt. 2) Bajo el mismo esquema de administración de BrdU, sacrificar a los animales 6 dpt. 3) Trasplantar y administrar BrdU al término del trasplante y diariamente por seis días. Sacrificar a los animales 15 dpt.

Sobrevivencia: Trasplantar los EBs y administrar BrdU al término del trasplante y diariamente durante seis días. Sacrificar a los animales 30 dpt.

Para evaluar la presencia de NPC en la SN y su posible activación mediada por el trasplante de EBs, nosotros hicimos la evaluación de células inmunorreactivas a BrdU, un marcador mitótico, en conjunto con marcadores inmunofenotípicos de precursores neurales y su progenie a diferentes periodos postrasplante: 2 hpt (n=2), 24 hpt (n=3), 48 hpt (n=4), 72 hpt (n=4), 6 dpt (n=5), 15 dpt (n=3) y 30 dpt (n=2). Además se evaluó el número de células BrdU en la SN contralateral en todos los periodos. Posteriormente, se evaluó el destino de las células proliferantes a diferentes periodos postrasplante mediante la detección de diversos marcadores inmunofenotípicos como: Sox2 y nestina (precursor neural), Dcx (neurona inmadura), Gfap (astrocito), NeuN (neurona madura) y Th (neurona dopaminérgica). Para hacer las cuantificaciones se tomaron tres cortes seriados por sujeto de la SN con trasplante para cada inmunomarcaje.

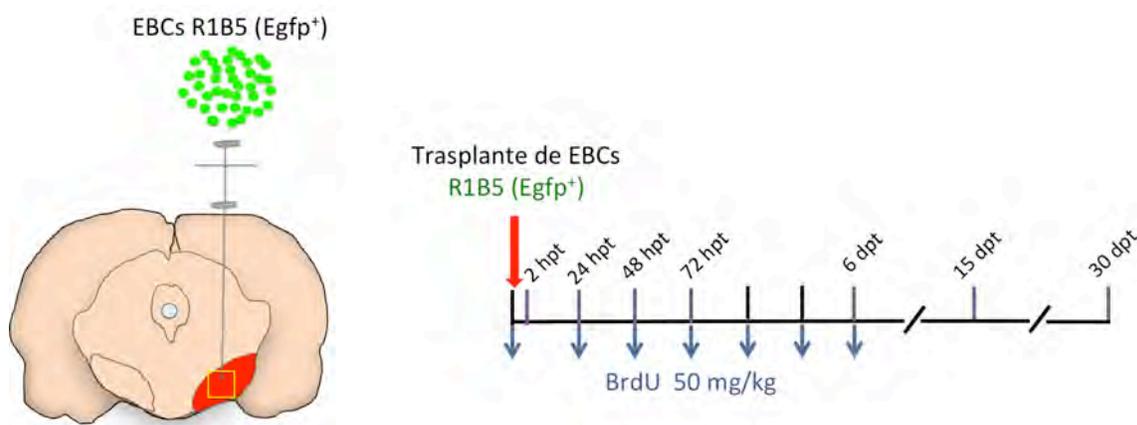


Figura 8. Esquema experimental de los trasplantes de EBCs de la línea celular R1B5 (Egfp⁺) en la SN de ratas macho adultas y la administración intraperitoneal del marcador de síntesis de ADN, BrdU. Así como el sacrificio de los grupos en las diferentes etapas indicadas.

3.5 Trasplante de células de cuerpos embrioides en la sustancia nigra de ratones adultos

Dado que, en el modelo de ratón se tiene la ventaja de utilizar diferentes estrategias experimentales cómo la manipulación genética y el cultivo celular, entre otras. Se propuso realizar el trasplante de EBs en la SN de ratones jóvenes adultos de 30 g de peso.

Las coordenadas con respecto a Bregma que fueron ajustadas para realizar el trasplante de 75,000 células de EBs de cuatro días en la SN fueron las siguientes: AP -3.0, DV -4.3 y L \pm 1.2 (Franklin y Paxinos, 2013). Todos los sujetos fueron administrados con una dosis diaria de BrdU (50 mg/kg) del día 3 al 15 postrasplante. Debido a que en el análisis realizado en la rata a los seis y quince días postrasplante se observó un mayor número de células ir-BrdU y de células ir-Dcx, respectivamente. Se diseñaron los siguientes grupos: 6, 15 y 30 dpt. Además, se añadieron grupos control de inyección con medio Optimem y se evaluó la SN contralateral (Figura 9). El análisis de marcadores inmunofenotípicos se realizó en cortes seriados de 30 μ m.

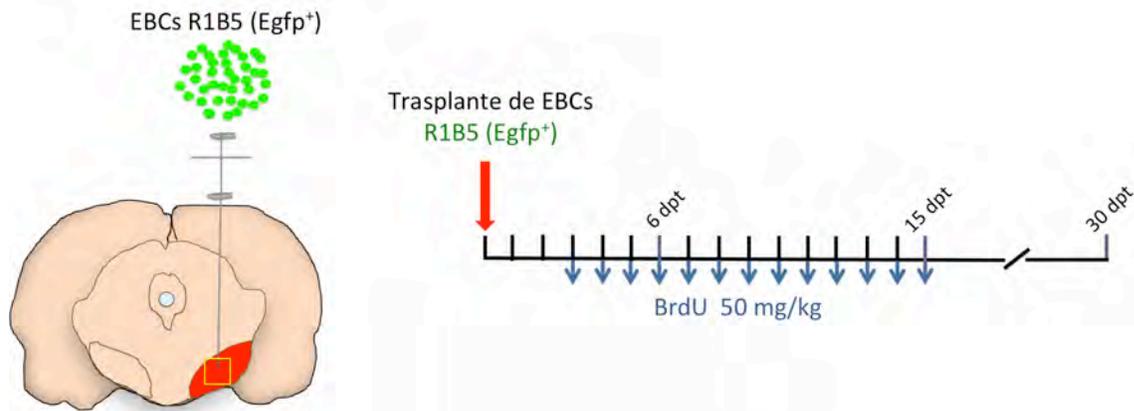


Figura 9. Esquema experimental de los trasplantes de EBCs de la línea celular R1B5 (Egfp⁺) en la SN de ratones macho adultos y la administración intraperitoneal del marcador de síntesis de ADN, BrdU. Así como el sacrificio de los grupos en los tres periodos posttrasplante indicados.

3.5.1 Trasplante de células de cuerpos embrioides R1 en la sustancia nigra de ratones adultos Egfp⁺ y células de cuerpos embrioides R1B5 en la sustancia nigra de ratones tdTomato⁺

Para descartar que las células Dcx⁺/Egfp⁻, observadas en los trasplantes realizados en rata a los 15 dpt, hayan apagado la expresión de la proteína verde fluorescente (Egfp) o que ésta se encuentre por debajo del umbral de detección (Toth et al., 2007), así como un proceso de fusión celular. Se realizó el trasplante de EBCs de la línea silvestre R1 en la SN de ratones Egfp⁺ (n=5) y células de EBs R1B5 en la SN de ratones tdTomato⁺ (n=3).

3.5.2 Trasplante de células de cuerpos embrioides y células alimentadoras e inyección de medio condicionado y medio M15 en la sustancia nigra de ratones adultos

Para evaluar sí el efecto observado en la SN trasplantada con células de EBs era solamente inducido por esta población celular, se realizó el trasplante de ESCs de la línea R1B5 en ratones CD1, ESCs R1 y células alimentadoras (MEFs, fibroblastos embrionarios de ratón) en ratones Egfp⁺. Asimismo, se realizó la inyección de medio condicionado de EBs y de medio M15 en el cual se crecen los EBs, para evaluar sí algún componente del medio en el cual se forman los EBs o algún factor soluble secretado por los mismos inducía el efecto observado tras el trasplante de células de EBs. Entre los factores solubles secretados por los EBs se encuentran: FGF5/10, BMP4, Shh, IGF1/2 y Vegf (Fathi et al., 2009; Mfopou et al., 2007; Ngangan et al., 2014) todos con pesos moleculares que van desde los 7.5 kDa a los 35kDa. Para concentrar el medio se utilizó

una unidad Amicon Ultra 0.5 de 3K marca Millipore, con la cual se obtiene un factor de concentración de 25 a 30x, y se inyectó 1µL en la SN.

Para los trasplantes de células se siguió el protocolo descrito en otras ocasiones. Se ajustó la cantidad de células a trasplantar a 75,000 células en 1µL para todos los casos. Las ESCs fueron cultivadas en monocapa de células alimentadoras por dos días y posteriormente en medio 2I (CHIR-99021 y PD0325901) con LIF, durante dos días más antes de ser trasplantadas. Los grupos que se formaron fueron los siguientes:

Ratones CD1: medio condicionado de EBs sin concentrar (n=1), medio condicionado de EBs concentrado (n=3), medio M15 sin concentrar (n=1), ESCs R1B5 (n=2)

Ratones Egfp⁺: ESCs R1 (n=3) y células alimentadoras (n=2)

3.5.3 Trasplante de EBCs R1 en ratones doble transgénicos *Gfap-cre/ERT2;Gt(ROSA)26Sortm4(ACTB-tdTomato,-EGFP)*

Para ayudar a la identificación de la fuente de NPC de la SN se realizó la gestión ante el Comité de Bioética y el Comité de Bioterio del Instituto de Biotecnología para adquirir dos líneas transgénicas: B6.CG-TG(*Gfap-CRE/ERT2*)505FMV/J y B6.129(CG)-GT(*ROSA*)26SORTM4(*ACTB-tdTOMATO,-Egfp*)LUO/J, con el objetivo de obtener un ratón doble transgénico reportero para la recombinación CreER en células gliales. En este ratón todas las células expresan de manera constitutiva la proteína reportera tdTomato y cuando hay recombinación dependiente de tamoxifen expresan la proteína reportera Egfp, que en este caso ocurre en aquellas células que expresan Gfap. Así, se pueden rastrear estas células aunque cambien de fenotipo, de manera similar a la estrategia usada por Magnusson et al. (2014).

En la primera camada se identificaron tres machos doble transgénicos y como primera prueba se administraron tres dosis de citrato de tamoxifen (100 mg/kg) diluido en una solución del alcohol al 10% por vía intraperitoneal. Sin embargo, dos ratones no toleraron la administración del tamoxifen. De acuerdo a la literatura, existe el riesgo de que el aceite de maíz o de girasol que se usa como vehículo se acumule en la cavidad abdominal y cause peritonitis estéril (Magnusson et al., 2014; Whitfield et al., 2015), por lo que es imprescindible realizar la administración de manera adecuada cuidando de no tocar órganos vitales. Por otro lado, a pesar de que transcurrieron 13 días para realizar el trasplante y 28 días para sacrificar al ratón doble transgénico no se detectó la proteína Egfp, la cual se expresa tras la recombinación mediada por Cre. Lo

anterior se pudo deber a que la cantidad administrada de tamoxifen no fue suficiente, ya que según lo reportado, toma dos semanas máximo para que se deje de observar a la proteína tdTomato y se exprese la proteína Egfp (Muzumdar et al., 2007), por lo que se descarta que no se hubiese dejado transcurrir el tiempo necesario para observar el resultado de la recombinación.

Con el objetivo de obtener una alta tasa de recombinación en las células Gfap positivas se probaron diferentes esquemas de administración de tamoxifen hasta llegar al esquema de cinco dosis i.p. de 200 mg/kg. Se administró una dosis cada tercer día y se esperó una semana para ejecutar el trasplante como se describió en la sección 3.4. Una vez realizado el trasplante esperamos quince días para sacrificar a los sujetos y evaluamos la presencia de células Dcx⁺/Egfp⁺, así como células Tubb3⁺/Egfp⁺ a los 30 dpt.

3.6 Administración de Ciclosporina A en ratones tdTomato⁺ trasplantados con células de cuepos embrioides R1B5 en la sustancia nigra

Para evaluar el papel de la angiogenesis mediada por Vegf, se realizó la administración de 20 mg/kg vía intraperitoneal de ciclosporina A (CypA; Sandimmune, Novartis) diluida en solución fisiológica (0.9% w/v NaCl), cada tercer día durante 15 días en total. Seis ratones tdTomato fueron previamente trasplantados con EBCs R1B5 y fueron separados en dos grupos de tres: el grupo experimental (CypA) y el grupo control inyectado con solución fisiológica.

3.7 Inyección de Vegf y Fgf-2 embebidos en una matriz de hidrogel en la sustancia nigra de ratones tdTomato⁺

Este experimento se realizó con el objetivo de evaluar si algún factor soluble secretado por las células de EBs inducía el efecto observado tras el trasplante de estas células en la SN. Como ya se comentó, entre los factores solubles secretados por los EBs se encuentran: Fgf-5/10, BMP4, Shh, Igf-1/2 y Vegf (Fathi et al., 2009; Mfopou et al., 2007; Ngangan et al., 2014). Y además se han reportado las propiedades neurogénicas de Fgf-2 y Vegf (Kim et al., 2006; Luo et al., 2015b; Shen et al., 2016).

En nuestro modelo *in vitro* evaluamos la capacidad de las células de la SN para generar neuroesferas en ausencia de EBCs. A este respecto, identificamos al Vegf y al Fgf-2 como inductores de la formación de estos agregados.

Basándonos en este resultado, realizamos la administración de 10 ng de dichos factores embebidos en hidrogel, en la SN de ratones tdTomato para evaluar si podíamos reproducir el fenómeno neurogénico en ausencia de células trasplantadas.

3.8 Obtención del vector de expresión de Lmx1a, Foxa2 y Sox2

A partir del vector TtRMPVIR (Figura 10), un sistema de expresión que requiere un transactivador dependiente de tetraciclina (rtTA) y un elemento responsive a tetraciclina (TRE). Se hicieron varias modificaciones para eliminar la secuencia de la proteína roja (dsRed) y los dos ARN (shRNA y miR30). Así, se insertaron tres sitios de restricción nuevos que permitieron insertar las secuencias deseadas, Lmx1a y Foxa2, en vectores independientes.

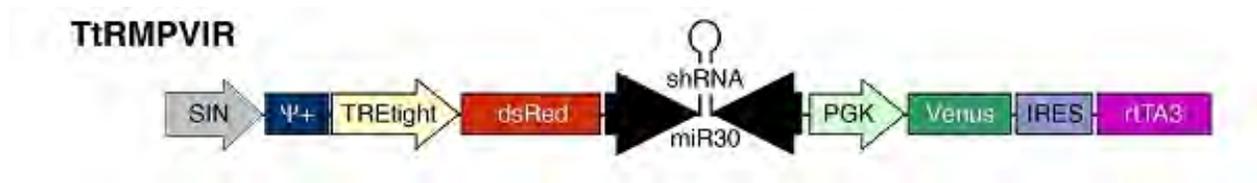


Figura 10. Esquema del vector TtRMPVIR.

Para obtener una cantidad suficiente del vector TtRMPVIR se utilizaron varias técnicas de rutina como: miniprep y midiprep (purificación del plásmido), generación de células competentes, transformación de células competentes con el plásmido, minipreps de varias colonias y confirmación de la identidad del vector mediante digestión con enzimas de restricción.

En la Figura 11, se muestra el gel de agarosa (0.8%) con los productos obtenidos de la digestión del vector TtRMPVIR con las enzimas de restricción, BamHI (Roche) y AgeI-HF (NEB) que nos permitieron eliminar la secuencia de la proteína roja (dsRed) y los dos ARN (shRNA y miR30).

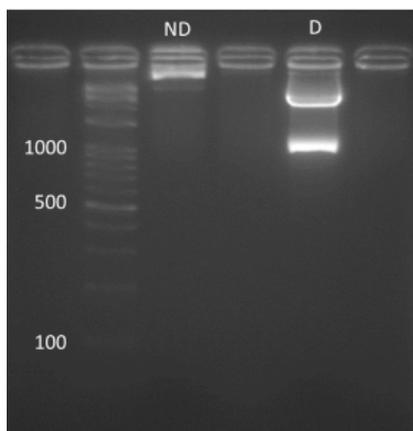
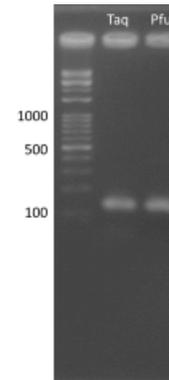


Figura 11. Digestión simultánea del vector TtRMPVIR con las enzimas BamHI y AgeI-HF que liberó un fragmento de 1195 pb correspondientes a las secuencias de la proteína roja (dsRed), los dos ARN (shRNA y miR30) y un fragmento de 120 pb del promotor PGK. ND= vector no digerido, D= vector digerido.

Dado que, al hacer la digestión del vector también se eliminaba un fragmento de 120 pb del promotor PGK y que era de nuestro interés insertar dos sitios de restricción que nos permitieran subclonar las secuencias de Lmx1a y Foxa2. Se mandaron diseñar a la Unidad de Síntesis y Secuenciación del Instituto de Biotecnología, un par de oligos (Anexos Tabla II) para generar un fragmento de 145 pb (Figura 12) perteneciente a la secuencia faltante de PGK y los sitios de restricción XhoI (C[^]TCGAG) y EcoRI (G[^]AATTC).

Figura 12. Electroforesis del fragmento de 145 pb sintetizado con el par de oligos 1. Se hicieron pruebas con una Taq polimerasa y una polimerasa de alta fidelidad (Pfu)



El fragmento generado mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con la polimerasa de alta fidelidad (Pfu) fue purificado a partir del gel de agarosa, al igual que el vector digerido. Cabe mencionar que para todos los ensayos PCR se ajustaron los parámetros de temperatura y tiempo para cada par de oligos y fragmento sintetizado.

Previo a la ligación, se digirió el fragmento con las mismas enzimas (BamHI y AgeI-HF). Después, la reacción de ligación se verificó en gel de agarosa al 1% y se procedió a hacer la transformación en células DH5 α . Después de sembrar en cajas LB con ampicilina, se seleccionaron doce clonas y se realizaron sus minipreps. Posteriormente, se realizó la digestión con la enzima de restricción NcoI para verificar su identidad (Figura 13).

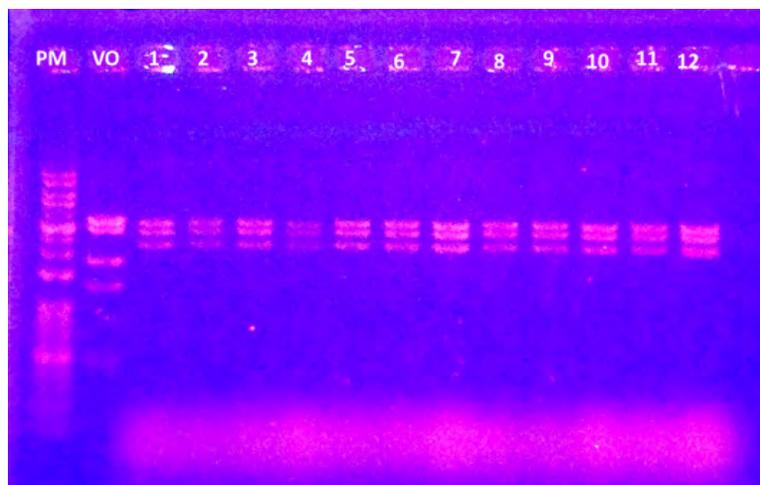


Figura 13. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de la digestión con NcoI del vector original (VO) y las doce colonias seleccionadas en placa con ampicilina.

Para confirmar que la secuencia del vector TtRMPVIR modificado fuera la correcta, se mandó secuenciar el producto de maxiprep (QIAGEN) de la colonia 12 (Figura 13), usando el segundo par de oligos de la Tabla II (Anexos). Ambos procedimientos se realizaron con ayuda de la Unidad de Síntesis y Secuenciación del IBt.

Al analizar el resultado de la secuenciación se concluyó que el vector estaba listo para subclonar Lmx1a. Por lo que, se procedió a mandar sintetizar el par de oligos necesarios para obtener el fragmento de Lmx1a (Figura 14 y Tabla II de Anexos) usando como templado el vector pNes-E-Lmx1a.

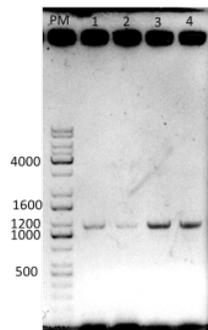


Figura 14. Electroforesis en gel de agarosa al 1% del fragmento sintetizado de Lmx1a mediante PCR usando la polimerasa Pfu. Los carriles 1 al 4 muestran el producto de PCR obtenido bajo diferentes condiciones de temperatura de alineación y digestión previa del templado.

De manera similar a lo realizado para obtener el vector Tt-Lmx1a, también se trabajó para obtener el vector Tt-Foxa2 (Figura 15). Aunque la secuencia de Foxa2 se obtuvo de un cDNA procedente de mesencéfalo embrionario de ratón E11.5 proporcionado por la estudiante de doctorado Gilda Guerrero Flores.

Tt-Lmx1a



Tt-Foxa2



Figura 15. Esquema de los dos vectores construidos, Tt-Lmx1a y Tt-Foxa2.

Para evaluar su funcionalidad, se realizó la transfección del vector Tt-Lmx1a en células de la línea AD293T mediante polietilenimina (PEI) y se indujo la expresión de Lmx1a con la administración de doxiciclina 48 horas después de la transfección.

Con el objetivo de aprovechar las cualidades del sistema inducible de las construcciones de la Figura 15 y del sistema de transposición, se realizó la fusión del vector Tt (sistema inducible) con el transposón Piggy-Bac generando un sistema de transposición de expresión inducible (PB-Tt; Figura 16). De esta manera se obtuvo el vector PB-Tt-Lmx1a-pA, para evaluar su funcionalidad, se realizó la transfección de la construcción en células de la línea COS7 mediante polietilenimina (PEI) y se evaluó la expresión de la proteína reportera Venus.

Asimismo, para nuestros propósitos se planteó construir un vector de expresión policistrónico Lmx1a-Foxa2-Cherry usando un par de péptidos autocatalíticos (T2A y P2A; Figura 16), así como el vector PB-Tt-Sox2-T2A-eBFP, en colaboración con la estudiante de Licenciatura en Ciencias Genómicas, Alejandra Guzmán Herrera. Primero, se procedió a subclonar en módulos los fragmentos Lmx1a, Foxa2 y la proteína reportera Cherry usando como adaptadores a los péptidos autocatalíticos T2A y P2A (Tabla II de Anexos). Esta estrategia es parecida a otras ya reportadas (Carey et al., 2009; Gao et al., 2012; Szymczak-Workman et al., 2012; Trichas et al., 2008) con la ventaja de poder modificar a necesidad los fragmentos ligados con los péptidos autocatalíticos.

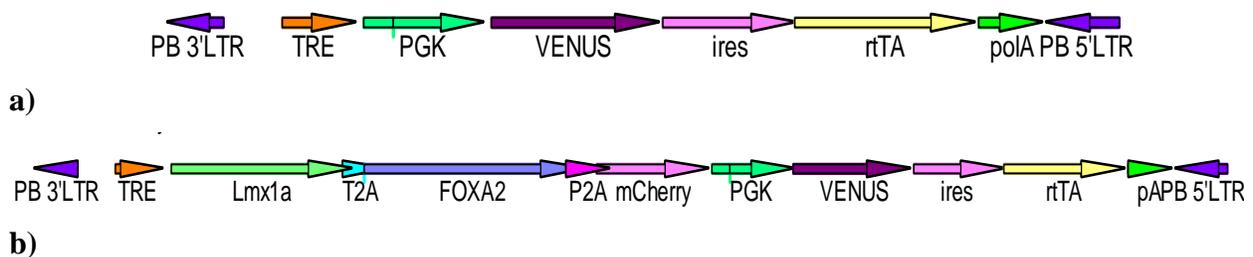


Figura 16. a) Mapa del sistema de transposición de expresión inducible (PB-Tt). b) Vector policistrónico para la sobreexpresión de Lmx1a y Foxa2.

3.9 Inmunofluorescencias

Para identificar los tipos celulares involucrados en todos los puntos anteriormente mencionados se hicieron inmunodetecciones utilizando marcadores neuronales, gliales y de NPC. En la sección de Anexos se describe el protocolo de inmunofluorescencia en cultivo e inmunofluorescencia por flotación sobre rebanadas de cerebro. Se usaron los siguientes anticuerpos primarios: anti-Gfp

policlonal de conejo 1:1000 (Santa Cruz Biotechnology Cat# sc-8334, RRID:AB_641123), anti-BrdU monoclonal de ratón 1:100 (BD Biosciences Cat# 347580, RRID:AB_400326), anti-Sox2 policlonal de cabra 1:200 (Santa Cruz Biotechnology Cat# sc-17320, RRID:AB_2286684), anti-Sox1 policlonal de cabra 1:200 (Santa Cruz Biotechnology Cat# sc-17318, RRID:AB_2195365), anti-Nestina monoclonal de ratón 1:500 (Millipore Cat# MAB353, RRID:AB_94911), anti-Dcx policlonal de cabra 1:200 (Santa Cruz Biotechnology Cat# sc-8067, RRID:AB_2088491), anti-Psa-Ncam monoclonal de ratón 1:200 (Millipore Cat# MAB5324, RRID:AB_95211), anti-Gfap policlonal de conejo 1:5000 (Dako Cat# Z0334, RRID:AB_10013382), anti-S100b policlonal de conejo 1:5000 (Abcam Cat# ab41548, RRID:AB_956280), anti-Tubb3 (β -Tubulina clase III neuronal) policlonal de conejo 1:500 (Covance Research Products Inc Cat# PRB-435P-100, RRID:AB_291637), anti-NeuN monoclonal de ratón 1:200 (Millipore Cat# MAB377, RRID:AB_2298772), anti-NeuN policlonal de conejo 1:500 (Novus Cat# NBP1-92716, RRID:AB_11033614), anti-Th policlonal de conejo 1:1000 (Millipore Cat# AB152, RRID:AB_390204), anti-CD31 monoclonal de rata 1:100 (BD Biosciences Cat# 550274, RRID:AB_393571), anti-Lmx1a policlonal de conejo 1:1000 (Millipore Cat# AB10533, RRID:AB_10805970), anti-Neurog2 policlonal de cabra 1:100 (Santa Cruz Biotechnology Cat# sc-19233, RRID:AB_2149513), anti-O4 monoclonal de ratón 1:100 (R&D Systems Cat# MAB1326, RRID:AB_357617) y anti-NG2 monoclonal de conejo 1:100 (Millipore Cat# AB5320, RRID:AB_11213678). Y los siguientes anticuerpos secundarios: anticuerpos Alexa (ThermoFisher Scientific) con fluoróforos conjugados (Alexa 488, 594 and 647) contra conejo, ratón y cabra; y el anticuerpo policlonal Cy3 anti-rata (Rockland Cat# 612-104-120, RRID:AB_218631).

3.10 Microscopía y análisis de imágenes

La captura de las imágenes de epifluorescencia se realizó con un microscopio Axio Observer Z1 (Zeiss, Alemania), mientras que las imágenes de microscopía confocal fueron capturadas en el Laboratorio Nacional de Microscopía Avanzada (LNMA, IBt-UNAM) con un microscopio Olympus FV1000. Los programas utilizados para editar y analizar las imágenes fueron AxioVision SE64 Rel. 4.9.1. y Fiji-ImageJ.

La expresión endógena de genes reporteros como *Egfp* de la línea celular R1B5 o del ratón transgénico *tdTomato/Egfp* hizo posible la discriminación entre células del huésped y las células

trasplantadas. El conteo de células y vasos sanguíneos, según fue el caso, se llevo acabo en cortes coronales abarcando la SN trasplantada o inyectada con factores/hidrogel, segun fuera el caso, siempre tomando en cuenta 600 μm adyacentes al trasplante o inyección de hidrogel. Se obtuvieron dos imágenes por corte y tres cortes por sujeto con un objetivo 20x; imágenes a lo largo del plano Z fueron capturadas con un objetivo 60x para analizar la co-expresión de marcadores cuando fuera necesario. Todo los resultados están expresados como media aritmética \pm EEM (células/ mm^2 , vasos sanguíneos/ mm^2 o diámetro de trasplante) o como el porcentaje (media aritmética \pm EEM) de células doblemente marcadas con respecto al total de células Gfap⁺ o Egfp⁺, según fuera el caso.

3.11 Análisis estadístico

Los datos generados por el conteo de células fueron analizados con la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk y la prueba de homogeneidad de varianza para confirmar su distribución normal y elegir la prueba estadística adecuada (paramétrica o no paramétrica). De esta manera, para comparar dos grupos se ejecutó la prueba t-student y para comparar tres o más grupos se utilizó la prueba ANOVA de una vía. Todos los datos fueron analizados con el programa estadístico SIGMAPLOT V12.0 software (Systat Software, Inc.). Para las comparaciones entre el número de células BrdU⁺ en dos periodos postrasplante consecutivos (2 hpt vs 24 hpt; 24 hpt vs 48 hpt), se utilizó la prueba de comparaciones multiples de Fisher LSD. Los valores de P para mostrar las diferencias estadisticamente significativas se indican de la siguiente manera: *p<0.05, **p<0.01.

Capítulo 4

Resultados

4.1 El trasplante de células de cuerpos embrioides estimula la neurogénesis en la sustancia nigra

4.1.1 Trasplante en ratas adultas

Para determinar el sitio de trasplante en cada uno de los sujetos se realizó un inmunomarcaje contra la enzima tirosina hidroxilasa (Th), la cual permitió identificar los somas de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc. En la Figura 17, se muestra una micrografía representativa del sitio de trasplante en la que las células $Egfp^+$ están inmersas en la SNpc.

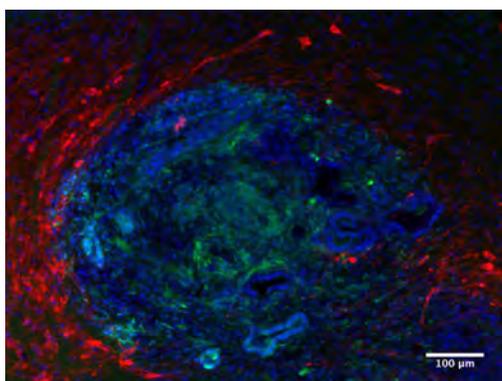


Figura 17. Análisis del sitio de trasplante de EBCs en la SNpc seis días después de realizarse. En rojo se muestran las células inmunoreactivas a Th, en verde las EBCs $Egfp^+$ y en azul los núcleos contrateñidos con DAPI.

La proliferación de NPCs ha sido asociada con un proceso neurogénico activo. En este sentido, se detectó la incorporación de BrdU, ligeramente por encima de los niveles basales, a las 2 horas de haber realizado el trasplante en la SN de ratas adultas (Figura 19A). Incrementándose con una aparente sincronía (tomado en cuenta un ciclo celular de 20 horas) de las 24 horas (Figura 18 y 19) hasta las 48 horas post-trasplante (hpt; Figura 19B y Tabla I de Anexos). Después de este punto, la tasa de incorporación disminuyó hacia las 72 hpt aunque un número significativo de células $BrdU^+$ continuaron siendo detectadas en los siguientes días. Sin embargo, sólo unas cuantas sobrevivieron hacia el día 30 (Figura 19B y Tabla I). Por otro lado, el análisis realizado en la SN contralateral mostró que muy pocas células incorporaron BrdU (Figura 19B y Tabla I).

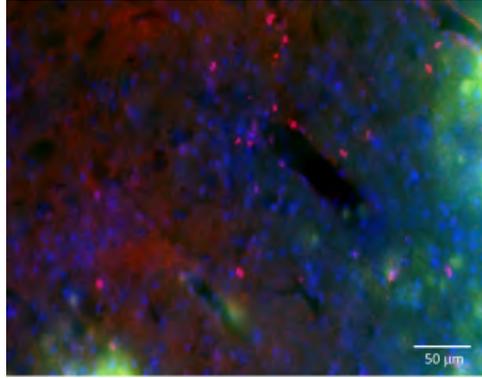


Figura 18. Micrografía capturada en el borde del trasplante de EBs (Egfp; verde) en un animal de 24hpt. La inmunofluorescencia contra BrdU (rojo) muestra varias células positivas. Contratación con DAPI.

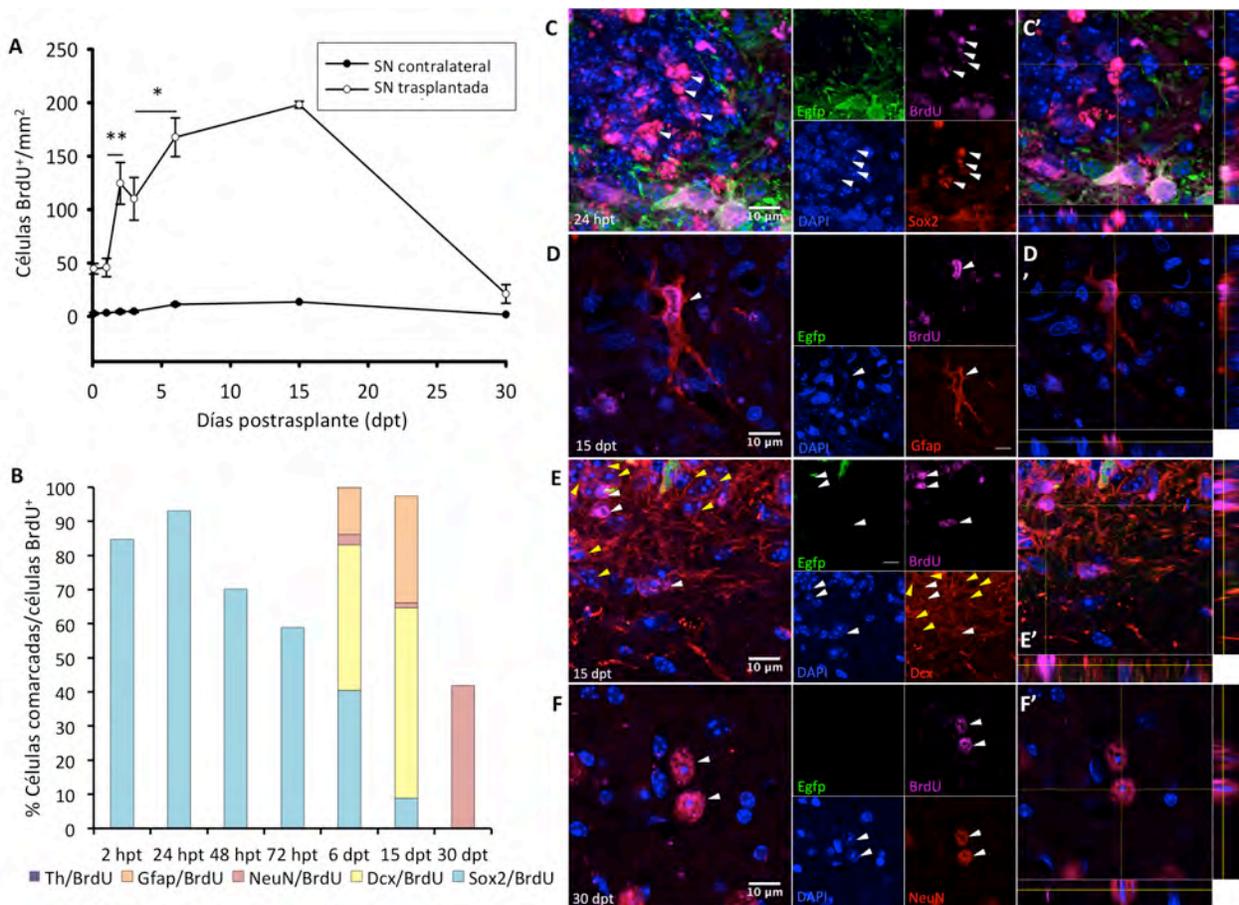


Figura 19. El trasplante de EBCs induce neurogénesis en la SN de la rata adulta. (A) Células BrdU⁺/mm² en la SN trasplantada de la rata adulta (círculos blancos) y en la SN contralateral (círculos negros). Las barras indican el EEM; *p<0.05 and **p<0.01. (B) Porcentaje de células BrdU comarcadas con: Sox2, Dcx, Gfap, NeuN y Th en la SN a diferentes periodos postrasplante. (C-F) Proyecciones confocales que muestran células BrdU⁺ comarcadas con Sox2 (24 hpt), Gfap (15 dpt), Dcx (15 dpt) y NeuN (30 dpt) en la SN trasplantada. La cabezas de flecha blancas indican células comarcadas con BrdU mientras que las cabezas de flecha amarillas en (E)

indican células marcadas solamente con Dcx. (C'-F') Vistas ortogonales. Barra de calibración de 10 μm .

Basándonos en estos resultados, procedimos a realizar una doble inmunofluorescencia contra Sox2/BrdU (Figura 19) para identificar progenitores neuronales. Nuestros resultados muestran una alta proporción de células doblemente marcadas (85-90%) en los periodos post-trasplante más tempranos (Figura 19B,C,C' y Tabla II) y dicho porcentaje disminuye conforme avanza el tiempo. La expresión de Sox2, así como de otros marcadores similares, no es exclusiva de NPCs. En particular, una proporción de astrocitos reactivos proliferan ante algún daño y expresan varios marcadores de NPCs (Gotz et al., 2015). De hecho, en nuestro estudio encontramos varias células gliales con características de astrocitos reactivos, como altos niveles de Gfap, hipertrofia y proliferación (Figura 19B,D,D' y Tabla II). Sin embargo, dado que este tipo de astrocitos no tienen potencial neurogénico *in vivo*, la identidad de NPCs de estas células Sox2⁺/BrdU⁺ puede ser confirmada mediante el rastreo de su descendencia neuronal (neuroblastos y neuronas marcadas con BrdU). En concordancia con esto, a los 6 y 15 dpt encontramos células BrdU⁺ inmunorreactivas al marcador de neuronas inmaduras (neuroblastos), Dcx (cabezas de flecha blancas en la Figura 19E, ver también Figura 19B y Tabla II). Sin embargo, también detectamos muchas células Dcx⁺ endógenas no marcadas con BrdU (cabezas de flecha amarillas en Figura 19E; ver también Tabla II). Este dato es de suma importancia, ya que resultados previos del grupo señalan la presencia de células Dcx⁺ que no colocalizan con la marca de Egfp, lo cual sugiere que células endógenas llevan a cabo neurogénesis. En coincidencia con la desaparición de las células trasplantadas (Egfp⁺), muy pocas células derivadas de las NPCs proliferantes sobrevivieron a largo plazo (30 dpt; Figura 19B). Ocasionalmente, algunas células BrdU⁺ inmunorreactivas al marcador de neuronas maduras, NeuN, fueron encontradas en este periodo (Figura 19B,F,F' y Tabla II). De manera similar al destino de las NPCs derivadas de las células trasplantadas (Maya-Espinosa et al., 2015), no encontramos ninguna célula Th⁺/BrdU⁺ a los 30 dpt.

4.1.2 Trasplante en ratones adultos

Como ya se mencionó en la sección de Materiales y Métodos, para los trasplantes de EBCs en la SN de ratones adultos se recorrió la administración de BrdU, de día 3 al día 15 postrasplante y se evaluaron tres grupos: 6, 15 y 30 dpt (Figura 9).

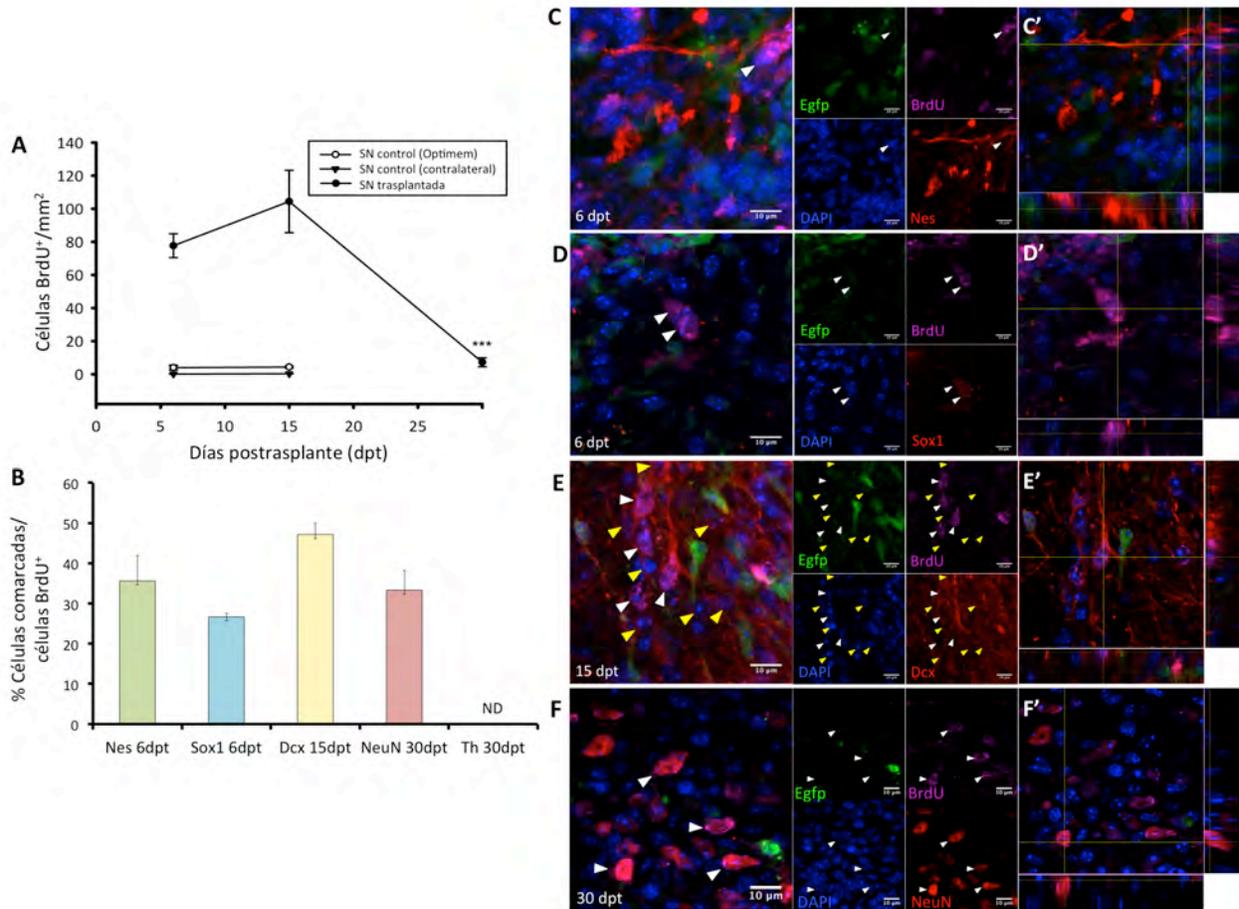


Figura 20. El trasplante de EBCs induce neurogénesis en la SN del ratón adulto. (A) Células BrdU⁺/mm² en la SN trasplantada (círculos negros), en la SN contralateral (triángulos negros) y en la SN inyectada con medio Optimem (círculos blancos). Las barras de error indican el EEM. (B) Porcentaje de células BrdU⁺ comarcadas con: Nes y Sox1 a los 6 dpt, Dcx a los 15 dpt y NeuN y Th a los 30 dpt; ND, no detectadas. (C-F) Proyecciones confocales mostrando células BrdU⁺ comarcadas con Sox1, Nes, Dcx y NeuN (ver también Figura S1) en la SN. La cabezas de flecha blancas indican células comarcadas con BrdU mientras que las cabezas de flecha amarillas en (E) indican células marcadas solamente con Dcx. (C'-F') Vistas ortogonales. Barra de calibración de 10 μm.

A este respecto, se obtuvieron resultados similares a lo encontrado en rata. Varias células BrdU⁺ fueron detectadas a los 6 dpt, éste número se incrementó hacia los 15 dpt pero muy pocas fueron detectadas a los 30 dpt (Figura 20 y Tabla III). Mientras que, en los grupos control inyectado con medio Optimem y la SN contralateral la cantidad de células BrdU⁺ fue prácticamente nula (Figura 20A y Tabla III). En los sujetos inyectados con medio Optimem se observó autofluorescencia a lo largo del trayecto de la aguja, tal y cómo lo observaron Worlitzer et al. (2013). Esto sugiere que

la proliferación endógena no se debe a un daño tisular o a componentes del medio en el que se disuelven las células, sino a las células trasplantadas per se.

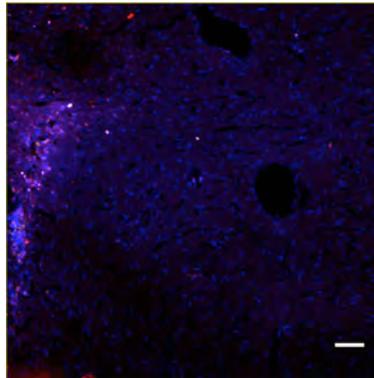


Figura 21. Inmunofluorescencia contra BrdU en la SNpc (rojo) seis días después de la inyección de medio Optimem. Se observa autofluorescencia en el trayecto de la aguja.

A los 6 dpt, varias NPCs fueron detectadas por la presencia de células BrdU⁺ comarcadas con Sox1 y Nestina (Nes; Figura 20B-D, Figura S1-A,B y Tabla IV), ambos marcadores son más específicos de NPCs activadas con respecto a Sox2 (Codega et al., 2014; Venere et al., 2012). Validando la identidad de NPCs de estas células proliferantes, cerca de la mitad de las células BrdU⁺ detectadas a los 15 dpt expresaban Dcx (Figura 20B,E,E'; Figura S1-C y Tabla IV). Sin embargo, muchas células Dcx⁺ endógenas no colocalizaban con BrdU (cabezas de flecha amarillas en Figura 20E y Figura S1-C). Dado que la administración de BrdU se mantuvo del día 3 al 15 postrasplante, hasta dos horas antes del sacrificio, es poco probable que los neuroblastos negativos para BrdU sean resultado de la dilución de BrdU debido a una alta tasa de proliferación celular. A los 30 dpt, algunas células BrdU⁺ expresaban NeuN (Figura 20B, Figura S1-E y Tabla IV), sin embargo no se encontraron células BrdU⁺ marcadas con Th (Figura 20B y Figura S1-D). Es importante mencionar que en ratón, a diferencia de las observaciones realizadas en rata, las células trasplantadas continuaron proliferando formando grandes teratomas a los 30 dpt. Esta situación hizo complicado el conteo celular y muy posiblemente la incorporación de nuevas neuronas a circuitos preexistentes.

Maya-Espinosa et al. (2015) mostraron que las EBCs trasplantadas en la SN diferencian eficientemente a neuroblastos Dcx⁺. Para descartar la posibilidad de que estas células Dcx⁺ hayan apagado la expresión de la proteína verde fluorescente (Egfp) o que ésta se encuentre por debajo del umbral de detección (Toth et al., 2007), así como un proceso de fusión celular. Se realizó el

trasplante de células de EBs de la línea silvestre R1 en la SN de ratones $Egfp^+$ (Figura 22A) y células de EBs R1B5 en la SN de ratones $tdTomato^+$ (Figura 22B). Confirmando su origen endógeno se encontró una gran cantidad de células $Dcx^+/Egfp^+$ (315.6 ± 26.7 células/ mm^2) y $Dcx^+/tdTomato^+$ (358.24 ± 42.18 células/ mm^2) a los 15 dpt.

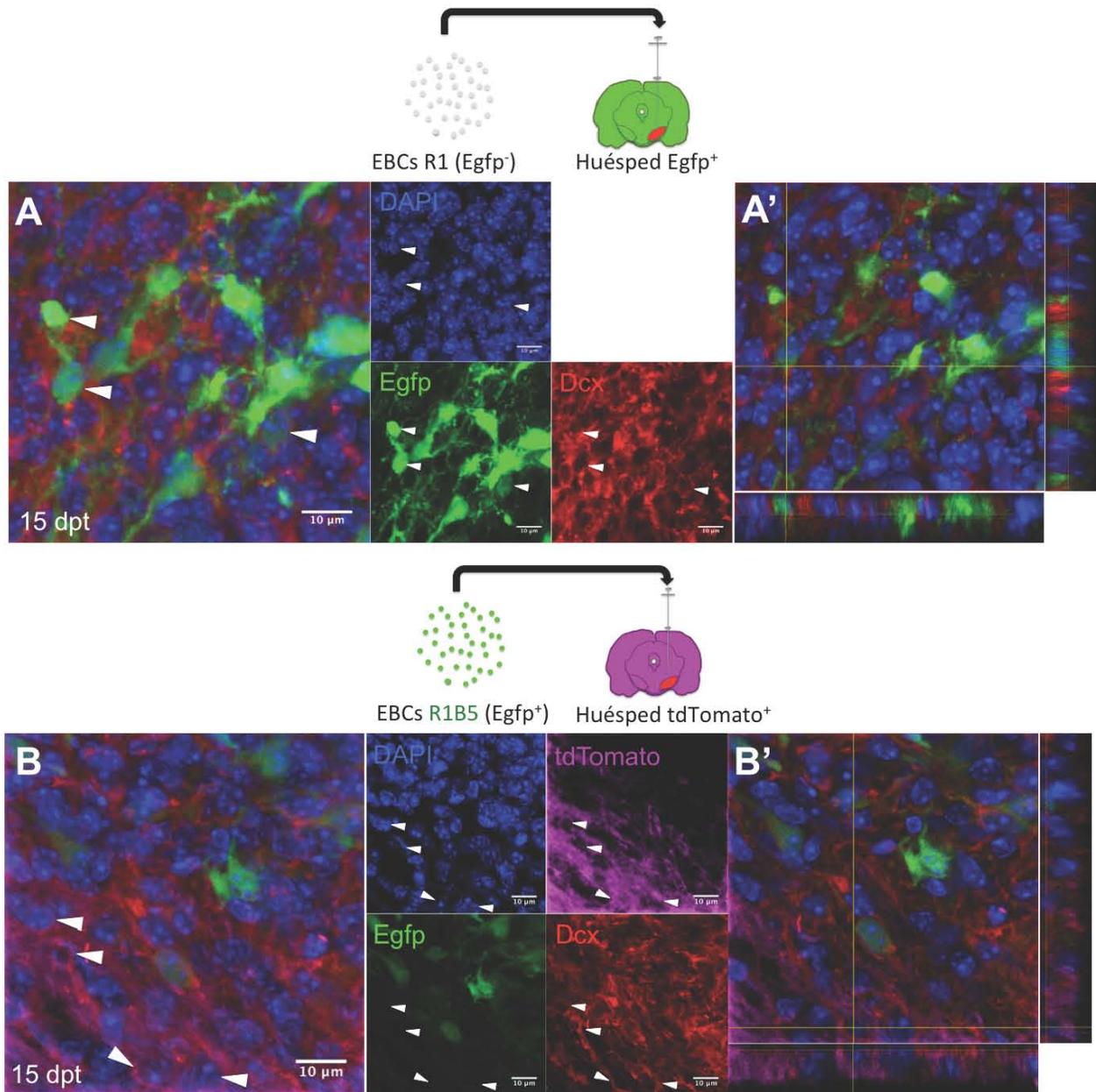


Figura 22. Células endógenas Dcx^+ identificadas en la zona del trasplante de EBCs en la SN. Proyecciones confocales de células endógenas (A) $Egfp^+/Dcx^+$ (cabezas de flecha blancas) detectadas 15 días después del trasplante de EBCs R1 (no fluorescentes) a ratones $Egfp^+$ (A', vista ortogonal); (B) células $tdTomato^+/Dcx$ (cabezas de flecha blancas) detectadas 15 días después del trasplante de EBCs R1B5 ($Egfp^+$) a ratones $tdTomato^+$ (B', vista ortogonal).

Por otro lado, con los resultados del trasplante de células alimentadoras y células HeLa en la SN se confirmó que sólo las EBCs son portadoras del factor inductivo de la neurogénesis, ya que dichos trasplantes no generaron células Dcx^+ . En un esfuerzo por identificar dicho factor, se realizó la inyección de medio de EBs condicionado concentrado y medio M15 en la SN pero tampoco se observaron células endógenas Dcx^+ (Figura 23). Finalmente, el trasplante con ESCs sin haber pasado por el protocolo de formación de CEs sí indujo la aparición de células Dcx^+ endógenas alrededor de la zona trasplantada, aunque su número fue escaso.

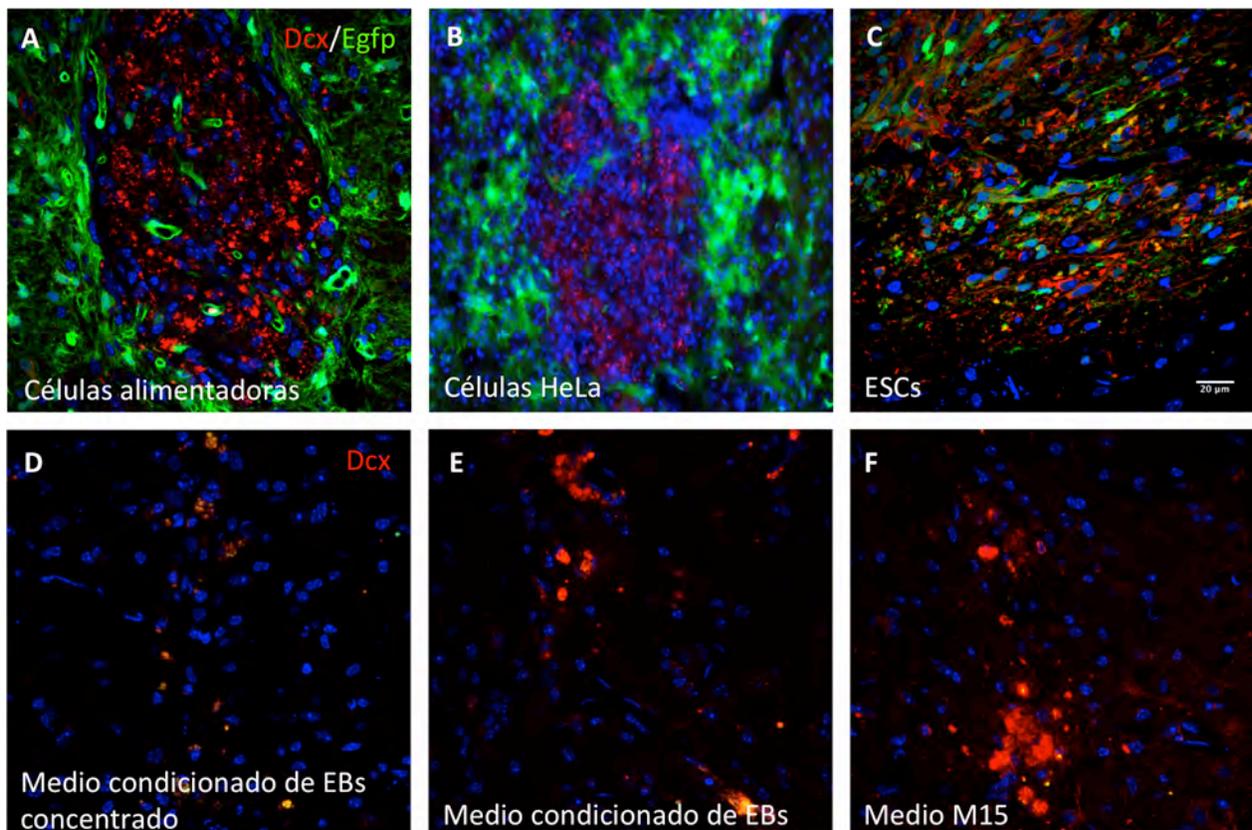


Figura 23. Sólo las EBCs son portadoras del factor inductor de la neurogénesis. Marcaje contra Dcx 15 días después del trasplante de (A) células alimentadoras y (B) células HeLa en la SN de ratones $Egfp^+$, así como de (C) ESCs R1B5 ($Egfp^+$) en la SN de ratones silvestres. No se encontraron células Dcx^+ en la SN inyectada con (D) medio condicionado de EBs concentrado, (E) medio condicionado de EBs o (F) medio M15.

4.2 Evaluación del potencial neurogénico de la sustancia nigra *in vitro*

4.2.1 Formación de neuroesferas de la sustancia nigra trasplantada de ratones adultos

Primeramente, se realizó la estandarización del protocolo mediante la generación de neuroesferas de la ZSV del cerebro de ratones adultos, las NSCs residentes de este nicho forman neuroesferas a partir de los cinco días de cultivo en presencia de los factores Egf y Fgf-2. A los siete días de iniciado el cultivo se cuantificaron el número de neuroesferas obtenidas a partir de un cultivo inicial de 1.8×10^5 células viables obteniendo en promedio 200 neuroesferas. En la Figura 24 se muestran micrografías representativas del cultivo primario (A) y del primer pasaje (B).

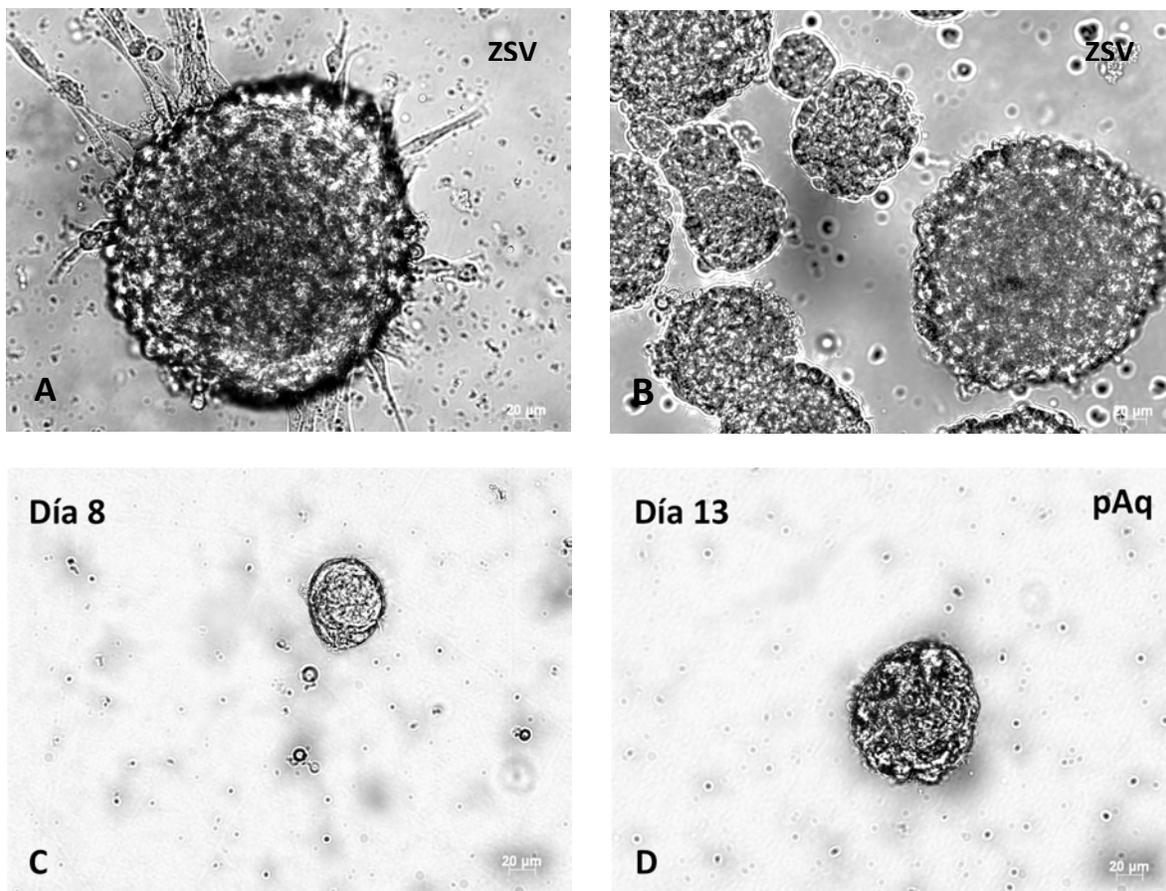


Figura 24. Generación de neuroesferas. En el panel (A) se muestra una neuroesfera de la ZSV generada a los 7 días de cultivo con los factores Egf y Fgf-2 (20 ng/mL). En el panel (B) se muestran varias neuroesferas secundarias generadas a los seis días de cultivo después de un primer pasaje. En los paneles inferiores se muestran neuroesferas de la zona pAq a los (C) 8 y (D) 13 días en cultivo. Barra de calibración 20 µm.

El primer cultivo de la SN trasplantada fue analizado a los siete días de haber comenzado y en concordancia con las células inmunorreactivas a marcadores de NPC encontradas en la SN 6 dpt,

se observaron cuatro estructuras similares a neuroesferas no fluorescentes (Figura 25). Dichas estructuras fueron disgregadas hasta llevarlas a una suspensión de célula única para hacer un primer pasaje pero no se volvieron a observar estas estructuras tipo neuroesfera.

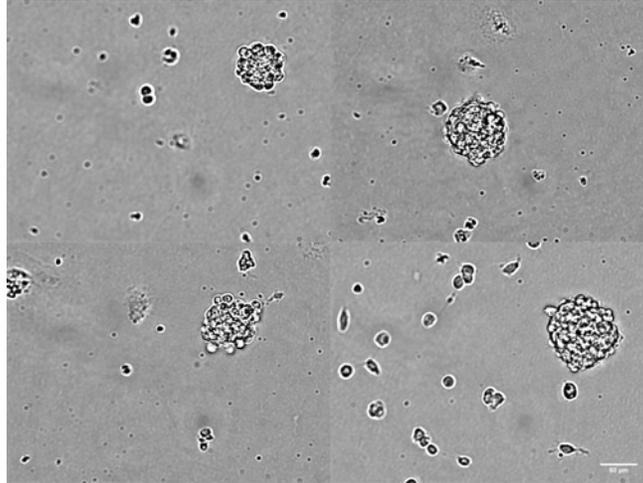


Figura 25. Estructuras tipo neuroesfera provenientes del cultivo de la SN trasplantada formadas a los siete días de inicio del cultivo. Barra de calibración 50 μm .

En base a éste resultado, se hizo un segundo ensayo pero en esta ocasión se dejó el cultivo proceder hasta por 18 días, tomando en cuenta que un cultivo de la zona subgranular del hipocampo (ZSG) genera neuroesferas a los 15 días (Guo et al., 2012) y de la zona periacueductal (pAq) entre los 10 a 20 días (Figura 24C,D). Al final de éste periodo se llegaron a contar hasta 79 estructuras tipo neuroesfera en un cultivo que partió de 1.8×10^5 células totales. En cuanto a las SN contralaterales sin trasplante, no se encontraron estructuras de este tipo y prácticamente ya no había células al término del cultivo. En total se realizaron nueve cultivos independientes para generar neuroesferas a partir de la ZSV, la zona pAq, la SN trasplantada después de 6 días y la SN contralateral (Figura 26A y B). En promedio las células de la SN trasplantada generaron 51.0 ± 10.8 neuroesferas partiendo de 1.8×10^5 células. Además de requerir más tiempo para su generación en comparación con las neuroesferas de la ZSV (15 vs. 7 días), las neuroesferas de la SN trasplantada también eran más pequeñas (80 vs. 250 μm de diámetro); y evidentemente, diferentes a las colonias planas formadas por las células derivadas de los EB (Egfp⁺; Figura 26A, panel inferior). En el caso de la pAq se obtuvieron 58.25 ± 19.4 neuroesferas.

Una vez que se formaron las neuroesferas en el cultivo primario de la SN trasplantada, se procedió a hacer subcultivos para evaluar su capacidad de autorenovación. A partir de las neuroesferas provenientes del primer pasaje se realizó la extracción de ADN y ARN para

descartar que se trataran de células provenientes del trasplante ($Egfp^+$) y evaluar su perfil de expresión de varios marcadores de multipotencia neural. De varios PCR punto final a partir de cDNA, se identificó la expresión de marcadores de NPC como nestina, Gfap, Tubb3 y Sox2. Mientras que no se encontró expresión de Oct4, un marcador de pluripotencia; ni de Lmx1a, un marcador de progenitor dopaminérgico. Mientras que a partir de la muestra de ADN se realizó un PCR contra el transgen de la $Egfp$, obteniendo un resultado negativo. Con este dato y la ausencia de fluorescencia en las neuroesferas identificadas en el cultivo de la SN trasplantada concluimos que estas provienen de células endógenas del ratón silvestre.

Asimismo, sobre las neuroesferas derivadas de un segundo pasaje (Figura 26C) se identificaron células Gfap y Nes, igual que en neuroesferas secundarias de la ZSV (Figura 26D).

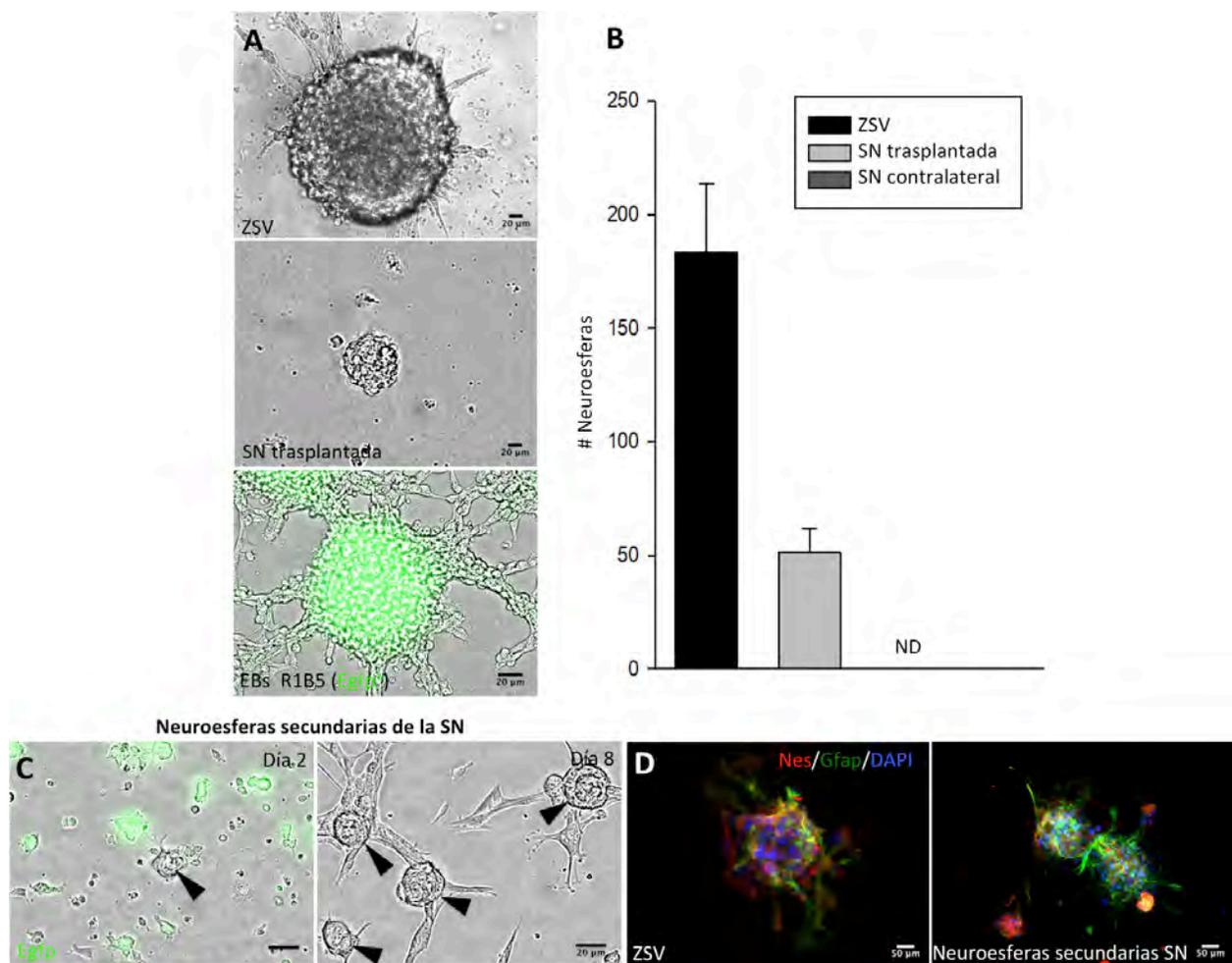


Figura 26. Células de la SN trasplantada de ratón generan neuroesferas. (A) Neuroesferas representativas de la ZSV (panel superior) y de la SN trasplantada (panel medio). Las células derivadas de EBs ($Egfp^+$) forman colonias planas (panel inferior). Barra de calibración de 20 μm . (B) Número de neuroesferas de la ZSV después de 7 días *in vitro* (control positivo) y después de 15 días *in vitro* para células de la SN trasplantada y contralateral (ND, no detectadas). Las barras de error indican el EEM. (C) Neuroesferas secundarias (cabezas de flecha negras) de 2 y 8 días *in vitro* formadas a partir de células de la SN trasplantada. (D) Las neuroesferas secundarias de la SN trasplantada expresan Gfap y Nes, igual que las neuroesferas típicas de la ZSV. Barra de calibración de 50 μm .

4.2.2 Generación de células Dcx^+ en el cocultivo de células de la sustancia nigra intacta con células de cuerpos embrioide

Después de 7-8 días de cocultivo de las células de la SN, pAq y ZSV con EBs se observaron células $Dcx^+/Egfp^-$. Asimismo, se observaron abundantes células $Dcx^+/Egfp^+$ provenientes de células de EBs. Por otro lado, en el caso de la ZSV también se detectaron varios grupos de células con morfología de precursores neurales (Nes^+), lo cual era de esperarse dada la población de NSCs que reside en este nicho neurogénico.

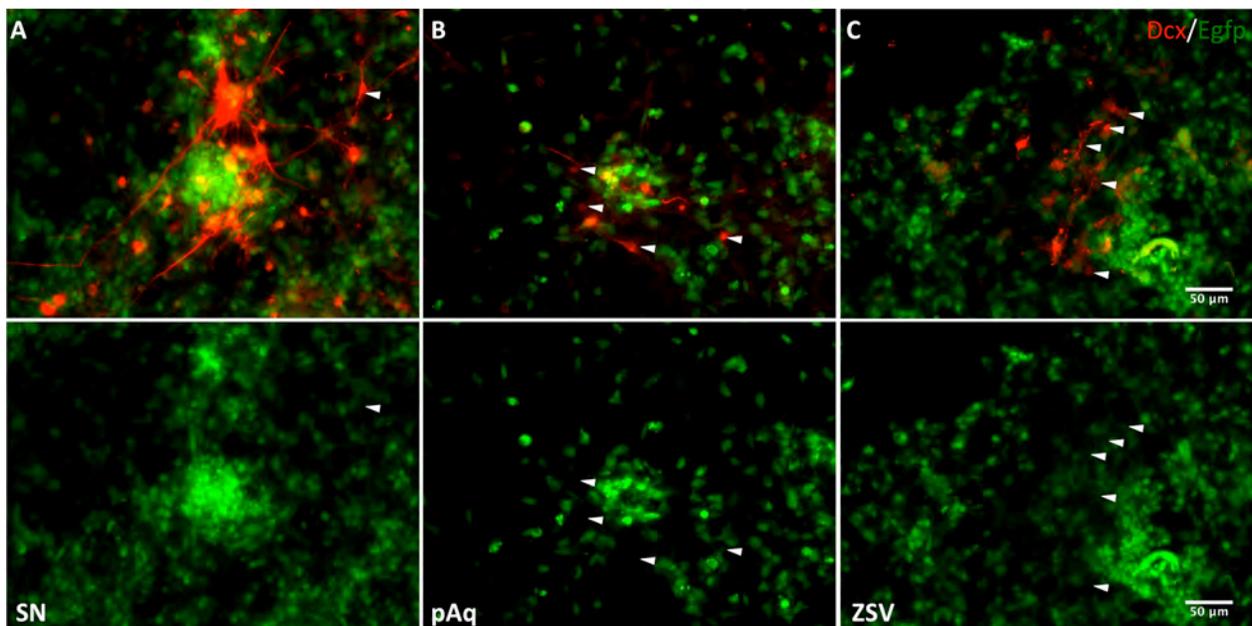


Figura 27. Presencia de células Dcx^+ en cocultivos de la (A) SN, (B) región pAq y (C) ZSV con CEs ($Egfp^+$). Las células $Dcx^+/Egfp^-$ provenientes del cerebro adulto se señalan con cabezas de flecha blancas. Barra de calibración de 50 μm .

Estos resultados sugieren que en la SN residen células que ante la presencia de EBs entran en un programa neurogénico, aunque es posible que no principalmente de NSCs como ocurre en la ZSV y el pAq.

4.2.3 Cultivo de células de la sustancia nigra en presencia de desferroxiamina (DFX)

Cómo ya se menciona en la sección de Materiales y Métodos, se evaluó el efecto de un ambiente hipóxico sobre la generación de neuroesferas de la SN y la ZSV (control) en ausencia de EBCs. Los resultados se muestran en las tablas V y VI (ver Anexos) y las Figuras 28 y 29.

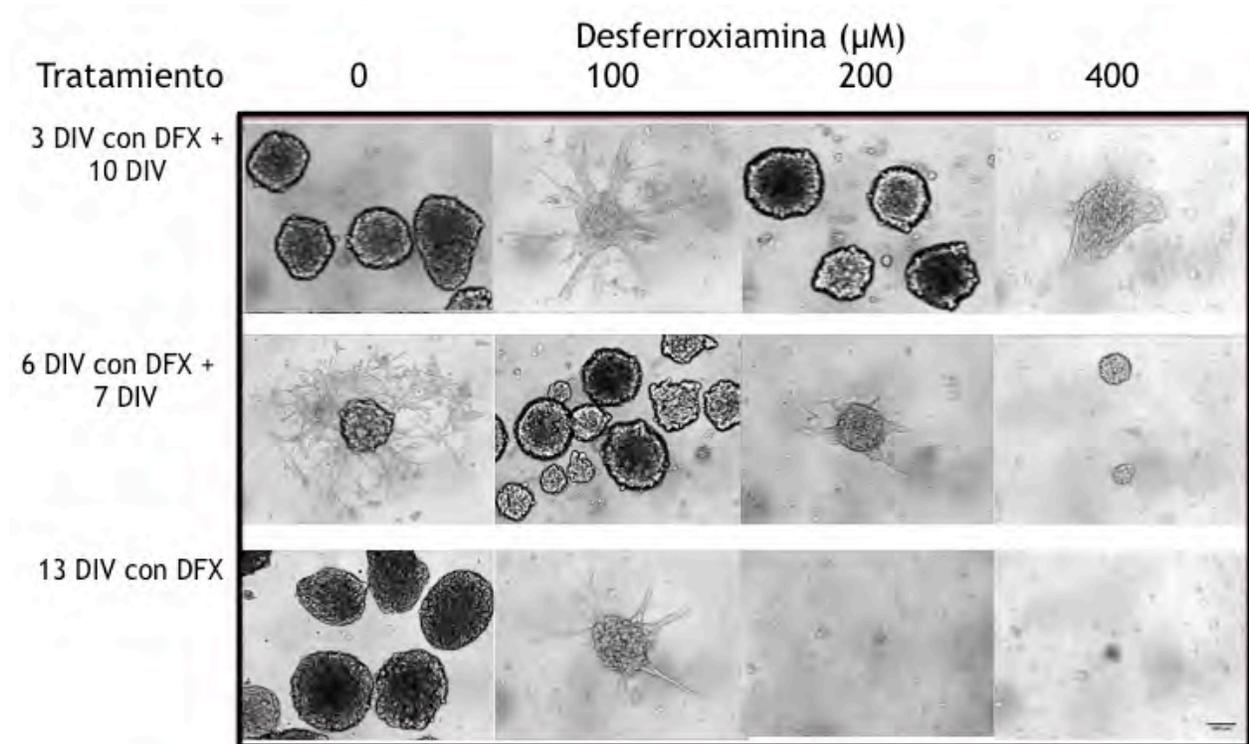


Figura 28. Neuroesferas generadas por el cultivo primario de la ZSV a los 13 DIV con tratamiento de 3, 6 o 13 DIV con DFX. Barra de calibración de 100 μM .

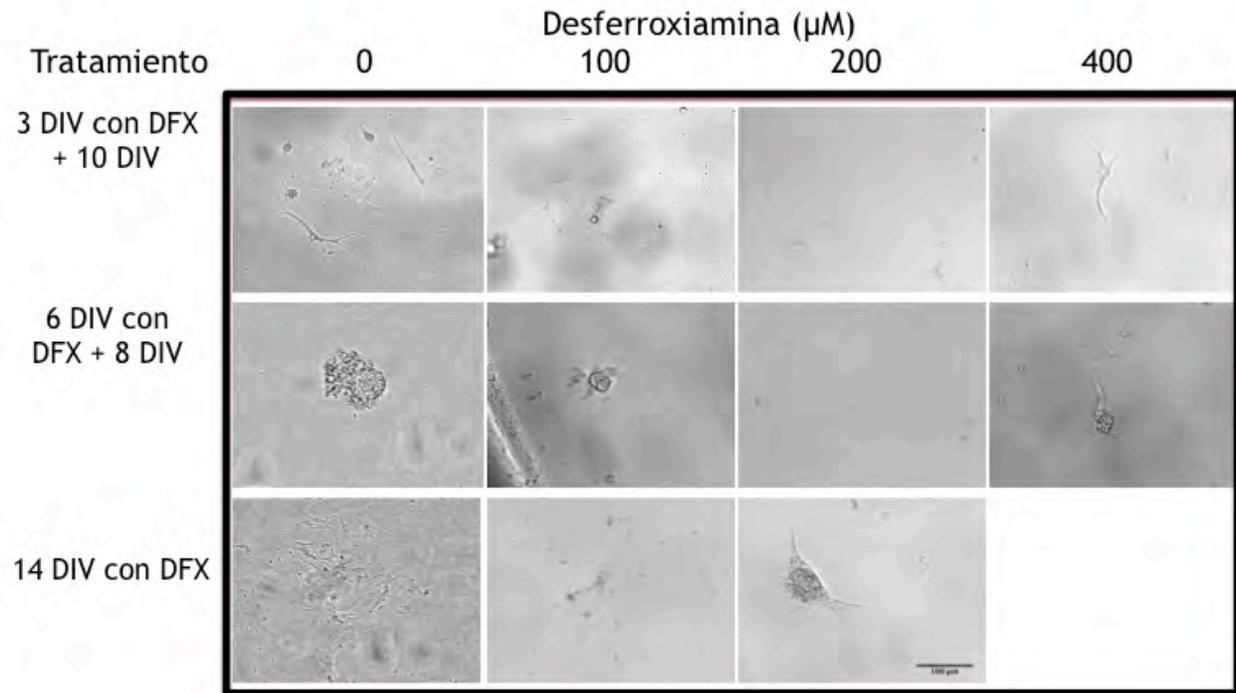


Figura 29. Neuroesferas y células identificadas en el cultivo primario de la SN a los 14 DIV con tratamiento de 3, 6 o 14 DIV con DFX. Barra de calibración de 100 μM .

En general, la DFX en una concentración mayor a 100 μM tuvo un efecto tóxico sobre las células y no promovió la generación de neuroesferas. Sin embargo, se observaron varios grupos de células con morfología alargada y bipolar tipo precursor en el cultivo de la SN. Para identificar a estas células se realizó una doble inmunocitofluorescencia contra Nes y Gfap. Como era de esperarse en células de la ZSV (Figura 30A) se observaron células inmunoreactivas a ambos marcadores, mientras que los grupos de células observados en los pozos de la SN fueron Nes⁺/Gfap⁻ (Figura 30B y C). Esta característica la comparten las células tipo C de la ZSV conocidas como progenitores de amplificación transitoria.

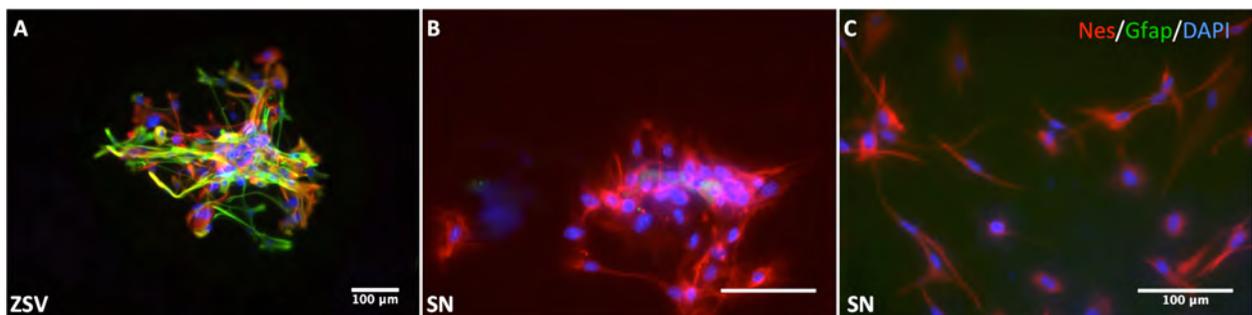


Figura 30. Inmunofluorescencias contra Gfap (verde) y nestina (rojo). Las células de la ZSV expresan ambos marcadores (A), mientras que las células de la SN (B,C) sólo expresan nestina (rojo).

4.2.4 Cultivo de células de la sustancia nigra en presencia de GDNF, BDNF, Fgf-2 y ácido valproico

En las células de la SN expuestas a GDNF, BDNF, Fgf-2 y ácido valproico (Figura 31B) o a GDNF, BDNF y ácido valproico (Figura 31C) se observó una evidente reducción en el número de células al cabo de los cinco días de tratamiento y un cambio considerable en la morfología celular de aquellas que persistieron en el cultivo. Siendo más acentuado en la primera condición, lo cual se acompañó de una aparente mayor presencia de células Tubb3⁺, un marcador neuronal. Mientras que en la condición control de suero al 20% (Figura 31A) no se observaron cambios ni se encontraron células Tubb3⁺. Esto sugiere que en la SN existen células con la capacidad de generar neuronas bajo el estímulo exógeno adecuado.

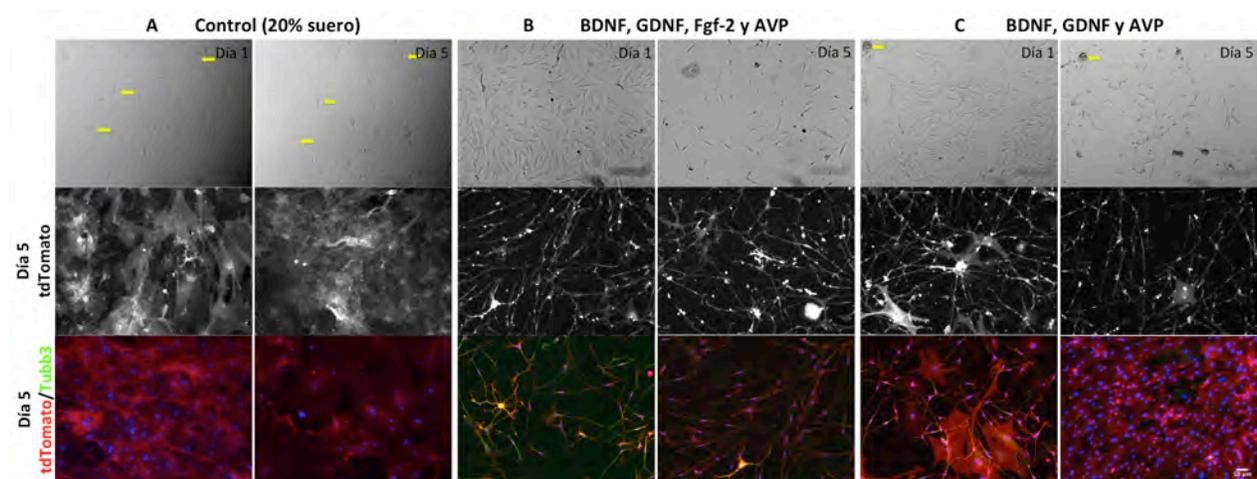


Figura 31. Cultivos de la SN expuestos a (A) 20% de suero, (B) GDNF, BDNF, Fgf-2 y ácido valproico o (C) GDNF, BDNF y ácido valproico. En el panel superior se muestran microfotografías en campo claro, las flechas amarillas indican las mismas células en las tomas realizadas al Día 1 y al Día 5 de tratamiento. En el panel central se muestra la morfología de las células cultivadas por la fluorescencia endógena tdTomato (rojo). Finalmente en el panel inferior se muestra la inmunofluorescencia contra Tubb3 (verde) en las tres condiciones.

4.3 Astrocitos parenquimales de la sustancia nigra como fuente de neuronas nuevas

4.3.1 Astrocitos residentes de la sustancia nigra expresan marcadores de precursores neurales y de neuroblastos después del trasplante de células de cuerpos embrioides

El número total de células Dcx^+ detectadas en la SN trasplantada de rata se incrementó alrededor de 1.5 veces del día 6 al 15 postrasplante (Anexos Tabla II). Sin embargo, al administrar BrdU durante los primeros 6 dpt, solamente una fracción de estas células Dcx^+ lo incorporaron (aproximadamente 30% a los 15 dpt). Se podría deducir que el nacimiento de estas células Dcx^+ ocurrió después de los 6 dpt y por ende escaparon al marcaje con BrdU. Sin embargo, en los experimentos realizados en ratón, el BrdU fue inyectado entre el día 3 y 15 postrasplante tomando en cuenta la limitada cantidad de células $BrdU^+$ detectadas hasta las 72 hpt en rata (Figura 19). Con este esquema también se obtuvo un bajo porcentaje de células $Dcx^+/BrdU^+$ a los 15 dpt (alrededor del 20%). La posibilidad de que nuevamente se estuviera omitiendo el periodo de división de las NPC queda descartado con el experimento realizado en trasplantes de 6 días, ya que en sujetos que recibieron BrdU del día 0 al 6 postrasplante se encontraron 65.6 ± 14.88 células BrdU positivas por corte. Este número no cambia mucho con respecto a lo obtenido en sujetos que recibieron una inyección intraperitoneal diaria de BrdU de los días 3 al 6 postrasplante (67.81 ± 7.32 células BrdU positivas por corte). Esto indica que, de manera similar a lo encontrado en los trasplantes hechos en rata, no hay abundante proliferación celular antes del día 3 postrasplante y que el 80% de las células Dcx^+ se originan a partir de células progenitoras que no parecen atravesar por un proceso de división celular. De acuerdo con esto, varias células $Sox1^+/Sox2^+$ negativas para BrdU fueron detectadas a los 6 dpt (Anexos Tablas II y IV). Estas observaciones abrieron la posibilidad de considerar la participación de un tipo celular diferenciado como una población precursora. A este respecto, evidencia reciente de Magnusson et al. (2014) muestra que astrocitos del parénquima tienen la capacidad de generar neuronas nuevas en condiciones de isquemia, lo cual depende de la inhibición de la vía de Notch. En el cerebro adulto, las células $Gfap^+$ corresponden a astrocitos parenquimales o NSC en las regiones neurogénicas. En la SN intacta, las células $Gfap^+$ se detectan principalmente en la SN pars reticulata y en la capa circundante al cerebro conocida como glia limitans. En la SN trasplantada encontramos abundantes células $Gfap^+$ rodeando a las células trasplantadas con una aparente reducción en el número de células presentes en la glia limitans (Figura 32).

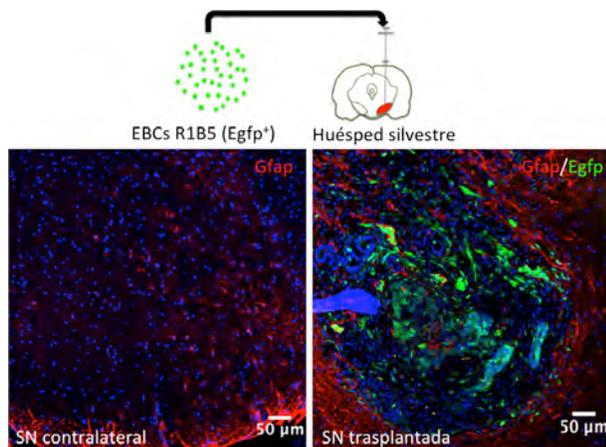


Figura 32. Varias células Gfap⁺ fueron detectadas en la SN trasplantada de ratones silvestres 15 días después del trasplante de EBCs R1B5 (Egfp⁺) en comparación con la SN contralateral.

Tomando esto en cuenta se hicieron varios dobles marcajes para evaluar la colocalización de marcadores gliales con marcadores de neuroblastos (Psa-Ncam/S100b, Dcx/ S100b y Dcx/Gfap) y con marcadores de NPC (Sox2/Gfap y Nes/Gfap) en las células endógenas que aparecen rodeando el trasplante de EBCs (hasta 600 μ m en la periferia del trasplante). A los 6 dpt, encontramos que el $4.15 \pm 0.97\%$ del total de células Gfap⁺ colocalizaba con Dcx (n=3; Figura 33A y D), incrementándose hacia los 15 dpt a $25.46 \pm 2.37\%$ (n=7; Figuras 33E y 34A,B). Resultados similares fueron obtenidos en los comarcajes con S100b a los 15 dpt, $29.42 \pm 4.4\%$ S100b⁺/Dcx⁺ (n=7; Figuras 33E y 34C,D) y $41.72 \pm 9.67\%$ S100b⁺/Psa-Ncam⁺ (n=3, Figuras 33E y 34G,H), un marcador que se encuentra en astrocitos maduros (Raponi et al., 2007) y no es expresado por las NSC de la ZSV (Codega et al., 2014). En todos los casos se observó que en la células doblemente marcadas, los marcadores gliales tenían niveles de expresión aparentemente más bajos.

El hecho de que mientras el número de células Dcx⁺ se incrementó y la proporción de células Dcx⁺/Gfap⁺ permaneció constante ($17.51 \pm 3.38\%$ a los 6 dpt y $18.15 \pm 2.29\%$ a los 15 dpt), sugiere que la coexpresión de los marcadores astrocíticos y neurales es un evento transitorio. Por otro lado, la proporción de células Psa-Ncam⁺/Sox2⁺ fue muy escasa ($0.75 \pm 0.29\%$ del total de células Psa-Ncam⁺, n=4; Figuras 33E y 34I), pero una proporción significativa de células Sox2⁺/Gfap⁺, ($39.85 \pm 4.02\%$ a los 6 dpt y $32.16 \pm 1.09\%$ a los 15 dpt, n=3; Figuras 33B, D y E, 34E) y células Nes⁺/Gfap⁺ ($38.83 \pm 4.36\%$ a los 6 dpt y $57.02 \pm 3.05\%$ a los 15 dpt, n=3; Figuras 33C, D y E, 34F) fueron detectadas. Esto sugiere que las células gliales se comportan como NPC tras el trasplante de EBCs. Cabe mencionar que en general se observa un aumento en la inmunorreactividad a Gfap en el hemisferio trasplantado, sin embargo, la inmunorreactividad a Nes solo se encuentra

en la zona aledaña al trasplante. De acuerdo a la literatura, muchas de estas células pueden considerarse astrocitos reactivos pero también queda la posibilidad de que sean células transitando un proceso neurogénico. Como ya se mencionó anteriormente, de acuerdo a lo reportado por Magnusson et al. (2014), astrocitos maduros del parénquima pueden generar neuronas nuevas, en nuestro caso, a través de un proceso de transdiferenciación directa que no requiere división celular.

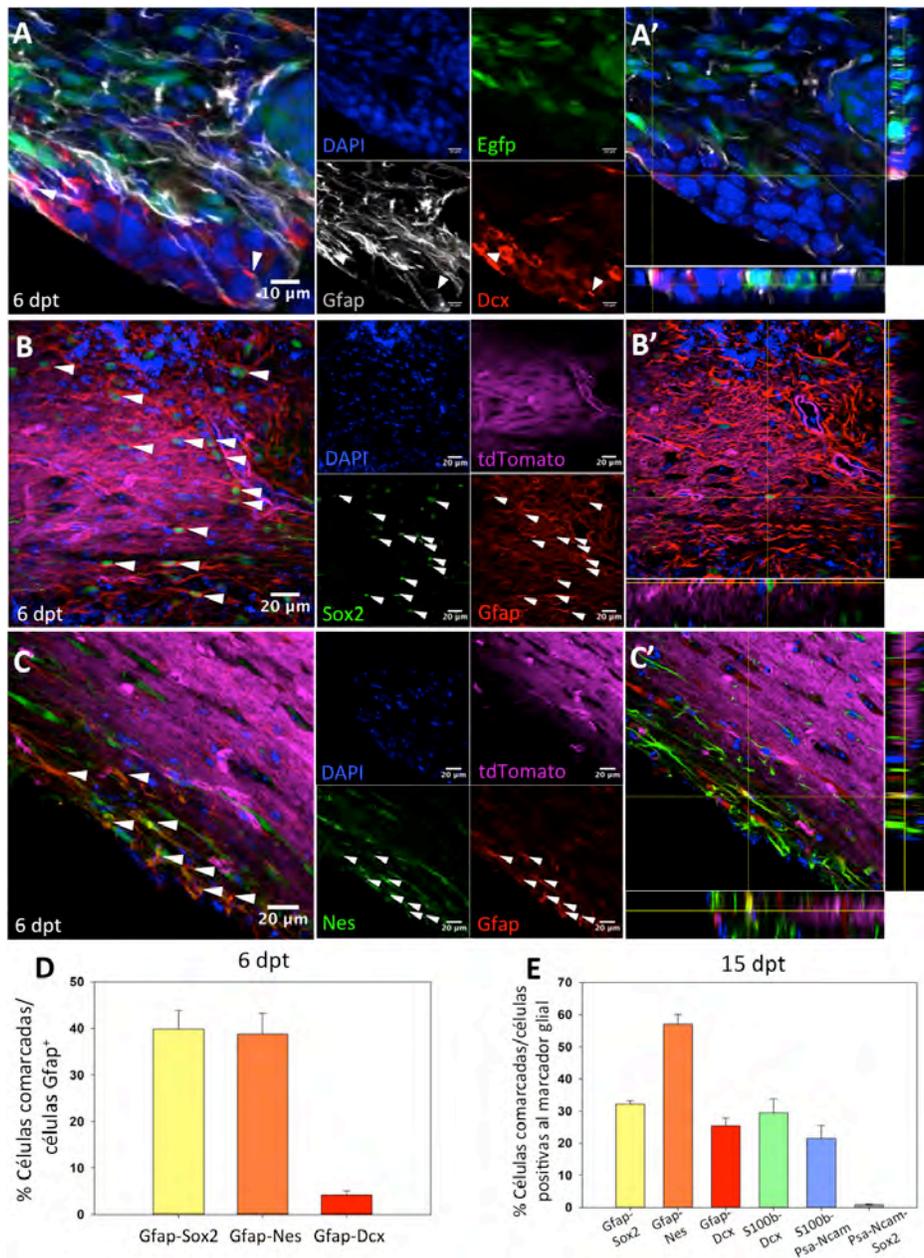


Figura 33. Astrocitos de la SN expresan marcadores de neuroblastos y NPC después de 6 días del trasplante de EBCs. EBCs de la línea celular R1B5 fueron trasplantados en la SN de ratones silvestres (A) y EBCs de la línea celular R1 (sin marcador fluorescente) fueron trasplantadas a la SN de ratones tdTomato (B y C). Proyecciones confocales mostrando células Gfap⁺ endógenas (A) silvestres colocalizando con el marcador Dcx; y células Gfap⁺ endógenas tdTomato⁺ colocalizando con (B) Sox2 y (C) Nes. (A'-C') Vistas ortogonales. Las cabezas de flecha blancas muestran células doblemente marcadas. (D) Porcentaje de colocalización Gfap⁺/Sox2⁺(n=3), Gfap⁺/Nes⁺ (n=3) and Gfap⁺/Dcx⁺ (n=3) con respecto al total de células Gfap⁺ a los 6 dpt. (E) Porcentaje de colocalización Gfap⁺/Sox2⁺(n=3), Gfap⁺/Nes⁺ (n=3) and Gfap⁺/Dcx⁺ (n=7) con respecto a las células Gfap⁺ totales a los 15 dpt. Asimismo, se muestra el porcentaje de células S100b⁺/Dcx⁺ (n=7) y S100b⁺/Psa-Ncam⁺ (n=3) con respecto al total de células S100b⁺ y el porcentaje de células Psa-Ncam⁺/Sox2⁺ (n=4) con respecto a las células Psa-Ncam⁺ a los 15 dpt.

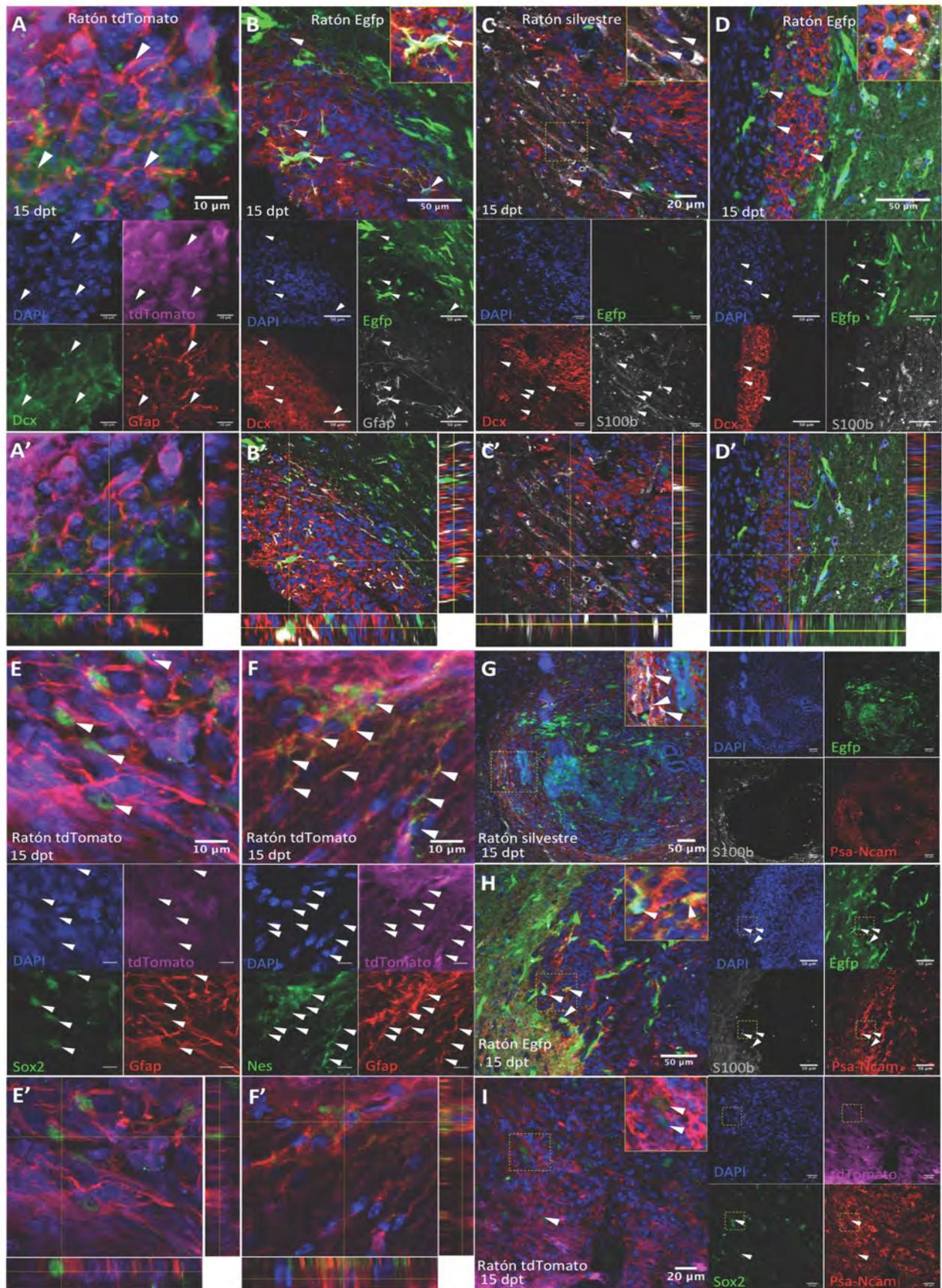


Figura 34. Astrocitos de la SN expresan marcadores de neuroblastos y NPC después de 15 días del trasplante de EBCs. EBCs de la línea celular R1 (sin marcador fluorescente) fueron trasplantadas a la SN de ratones tdTomato (A, E, F, I) o ratones Egfp (B,D,H) y EBCs de la línea celular R1B5 a la SN de ratones silvestres (C y G). Proyecciones confocales mostrando células Gfap⁺ endógenas (A) tdTomato⁺ o (B) Egfp⁺ colocalizando con Dcx; células S100b⁺ endógenas (C) silvestres o (D) Egfp⁺ colocalizando con Dcx; células Gfap⁺ endógenas tdTomato⁺ colocalizando con (E) Sox2 y (F) Nes; y, células S100b⁺ endógenas (G) silvestres o (H) Egfp⁺ colocalizando con Psa-Ncam. Además se muestran células Sox2 endógenas tdTomato⁺ colocalizando con Psa-Ncam. (A'-F') Vistas ortogonales.

4.3.2 Células Gfap⁺ endógenas generan neuronas nuevas en la sustancia nigra trasplantada

Para confirmar los resultados obtenidos en las colocalizaciones de marcadores gliales con marcadores neurales en la SN trasplantada, se realizó entre la cruce entre las líneas B6.CG-TG(Gfap-CRE/ERT2)505FMV/J y B6.129(CG)-GT(ROSA)26SORTM4(ACTB-tdTOMATO,-Egfp)LUO/J de The Jackson Lab para obtener ratones doble transgénicos en los cuales se pudieran rastrear las células Gfap⁺. Células de EBCs de la línea celular R1 fueron trasplantadas a la SN de ratones doble transgénicos Gfap-Cre/ERT2;*Gt(ROSA)26Sor^{tm4(ACTB-tdTomato,-EGFP)}*. Antes del trasplante, los ratones fueron administrados con tamoxifen para inducir la expresión de la proteína Egfp en células Gfap⁺ (Figura 35A). Usando este protocolo, la eficiencia de recombinación obtenida fue de alrededor del 30% de todas las células Gfap⁺ detectadas en la SN (Figura 36A), ya que una recombinación del 100% es prácticamente imposible de alcanzar debido a la expresión variable de la Gfap entre la población de astrocitos (Ganat et al., 2006); pero es importante mencionar que >85% de la células Egfp⁺ coexpresaban Gfap en la SN contralateral. Además, no detectamos ninguna célula Egfp⁺/NG2⁺ (Figura 36B) o Egfp⁺/O4⁺ (Figura 36C), mientras que sí encontramos algunas células Egfp⁺/Nes⁺ (Figura 36D) y muchas células Egfp⁺/Dcx⁺ (Figura 35C,C',E y 36E) después del trasplante. A los 15 dpt, 70.48±2.79% (n=3) de las células Egfp⁺ fueron positivas para Gfap (Figura 35B,E) y un 29.35±3.29% (n=3) a los 30 dpt (Figura 35E). Asimismo, del total de células Egfp⁺, 53.49±8.07% y 24.46±4.82% a los 15 dpt (n=4), así como 23.98±1.90% y 27.27±2.97% a los 30 dpt (n=4) colocalizaban con Dcx⁺ o Tubb3⁺, respectivamente (Figura 35C-E). De manera coincidente con las colocalizaciones entre marcadores gliales y neuronales mostrados en la sección anterior (Figuras 33 y 34), el porcentaje de células con marcadores neuronales (Dcx y Tubb3) más el porcentaje de células Gfap positivas determinados a los 15 dpt sobrepasa el 100%, lo cual es indicativo de la expresión simultánea de ambos tipos de marcadores en las células Egfp⁺. Estos resultados confirman que un alto

porcentaje de los neuroblastos endógenos encontrados alrededor del trasplante de EBCs en la SN, derivan de células $Gfap^+$ (astrocitos) y que estas pueden generar nuevas neuronas. Así, en concordancia a la detección de células $Egfp^+$ colocalizando con marcadores neuronales, se pudo identificar una morfología neuronal en algunas de ellas a los 30 dpt (Figura 35F).

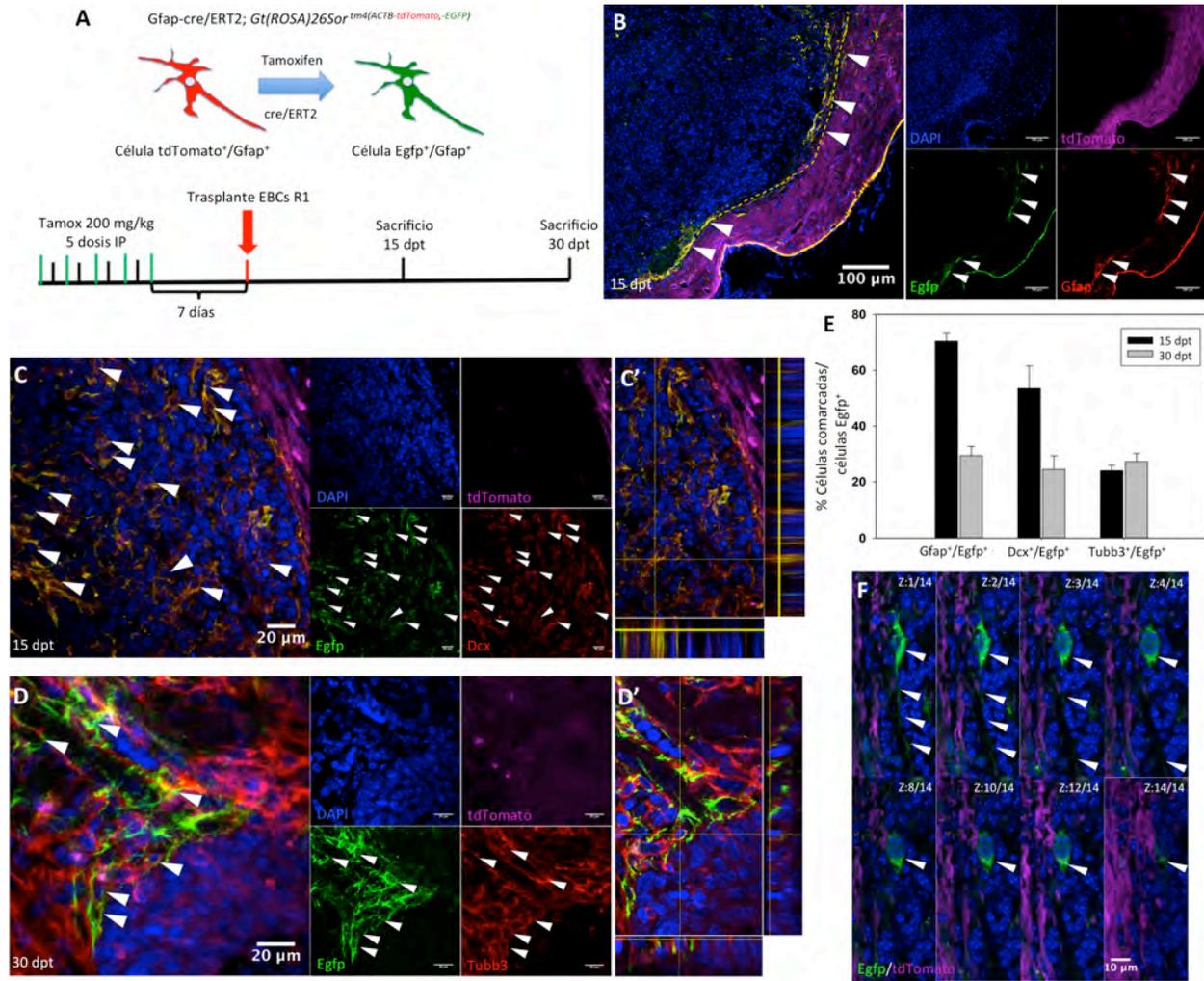


Figura 35. Astrocitos endógenos ($Gfap^+$) originan nuevas neuronas después del trasplante de EBCs en la SN. (A) Esquema de la estrategia experimental. EBCs de la línea celular R1 (sin marcador fluorescente) fueron trasplantados en la SN de ratones doble transgénicos $Gfap-cre/ERT2;Gt(ROSA)26Sor^{tm4}(ACTB-tdTomato,-EGFP)$ una semana después de ser tratados con tamoxifen. Los marcadores neuronales fueron determinados a los 15 y 30 dpt. (B) Proyecciones confocales que muestran las células recombinadas $Egfp^+/Gfap^+$ (puntas de flecha blancas) alrededor del sitio de trasplante (línea amarilla punteada) a los 15 dpt. (C) Células Dcx^+ derivadas de astrocitos ($Egfp^+$; puntas de flecha blancas) a los 15 dpt (C', vista ortogonal). (D) Células $Tubb3^+$ derivadas de astrocitos ($Egfp^+$; cabezas de flecha blancas) a los 30 dpt (D', vista ortogonal). (E) Porcentaje de células $Gfap^+/Egfp^+$, $Dcx^+/Egfp^+$ y $Tubb3^+/Egfp^+$ con respecto al total de células $Egfp^+$ a los 15 y 30 dpt (n=3-4). Las barras indican el EEM. (F) Trayectoria en el

plano Z de una célula $Egfp^+$ representativa encontrada alrededor del sitio de trasplante (30 dpt); nótese la proyección que emerge del soma (cabezas de flecha blancas).

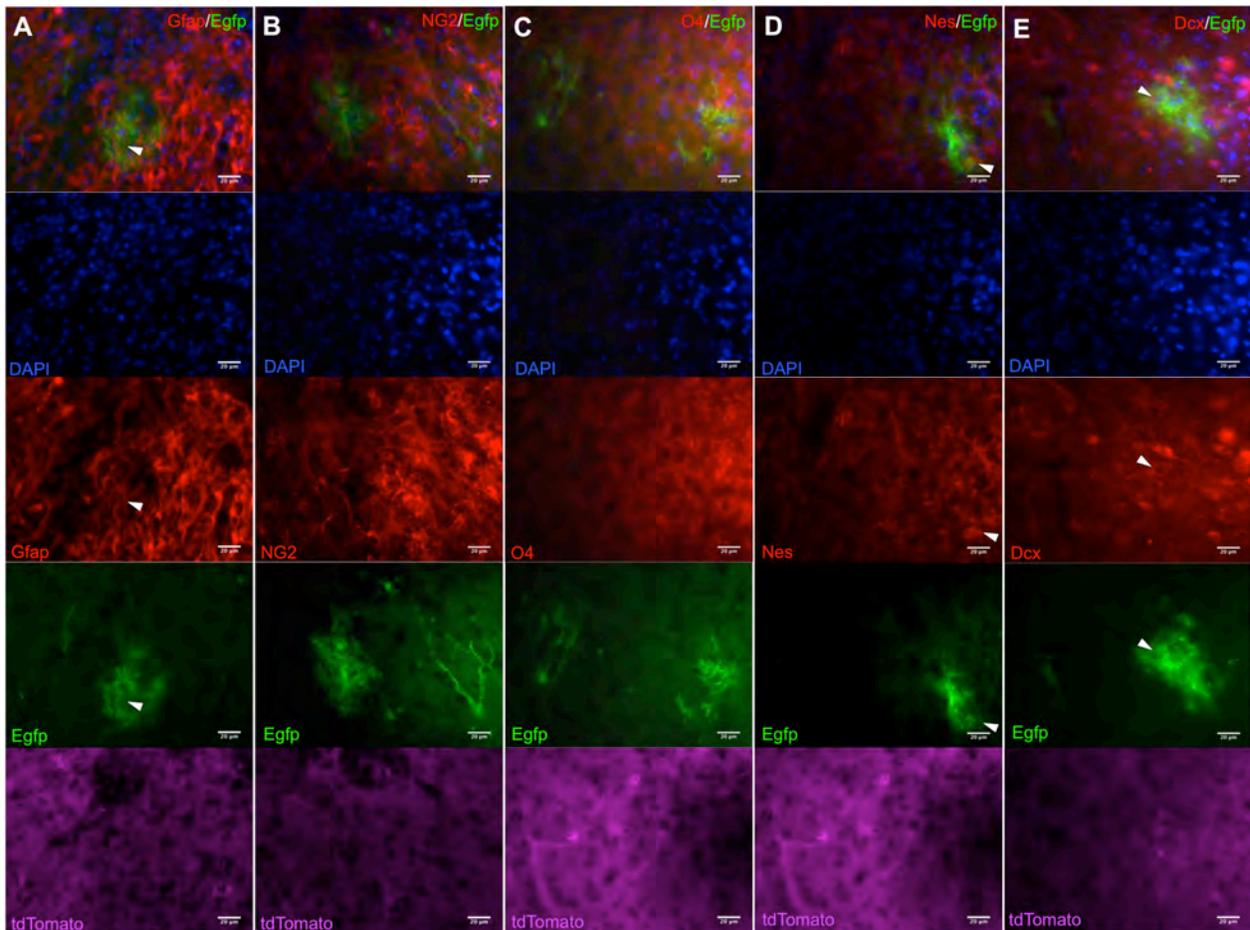


Figura 36. Identidad de las células derivadas de astrocitos ($Egfp^+$) en la SN trasplantada. EBCs de la línea celular R1 (sin marcador fluorescente) fueron trasplantadas a la SN de ratones $Gfap\text{-}cre/ERT2;Gt(ROSA)26Sor^{tm4(ACTB\text{-}tdTomato,\text{-}EGFP)}$ una semana después del tratamiento con tamoxifen. Las micrografías muestran células $Egfp^+$ representativas encontradas en la SN 15 dpt. (A) Células $Egfp^+/Gfap^+$, (B) $Egfp^+/NG2^-$, (C) $Egfp^+/O4^-$, (D) $Egfp^+/Nes^+$ y (E) $Egfp^+/Dcx^+$. Las puntas de flecha blancas indican células comarcadas. Barra de calibración de 20 μm .

4.4 Factores angiogénicos secretados por cuerpos embrioides estimulan el potencial neurogénico de la sustancia nigra

4.4.1 El bloqueo de la angiogénesis mediada por Vegf afecta la neurogénesis en la sustancia nigra trasplantada

Debido a que el factor de crecimiento del endotelio vascular (Vegf) es uno de los factores que secretan los EBs (Ngangan et al., 2014); y se ha demostrado que además de sus funciones

clásicas de inducir vasculogénesis y angiogénesis, regula la proliferación celular y mantiene a la población precursora en la ZSG (Kirby et al., 2015), y en conjunto con Fgf-2 activa la neurogénesis a partir de células CD133+ que residen en la pared del cuarto ventrículo (Luo et al., 2015a). Nos preguntamos si el trasplante de EBCs modifica la vasculatura de esta región. Encontrando que efectivamente, los vasos sanguíneos marcados con CD31+ se muestran más dilatados y en mayor abundancia con respecto a la SN sin trasplante (Figura 37).

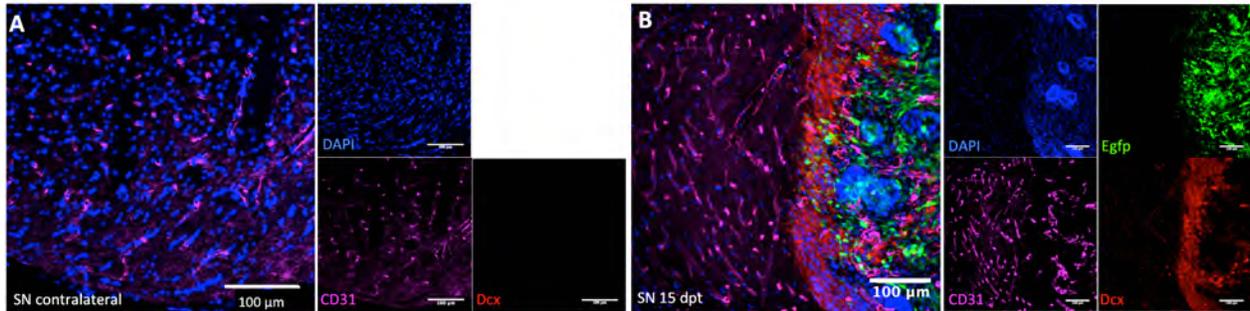


Figura 37. Vasos sanguíneos en la SN del ratón adulto después de la neurogénesis inducida por el trasplante de EBCs. EBCs de la línea R1B5 fueron trasplantados a la SN de ratones silvestres. (A) No se encontraron células Dcx^+ en la SN contralateral y la inmunorreactividad a CD31 (magenta) parecía ser menos evidente en comparación con (B) el número significativo de células Dcx^+ (rojo) y los vasos sanguíneos (magenta) en la SN trasplantada. Barra de calibración de 100 μm .

Para identificar el rol de los vasos sanguíneos en el proceso neurogénico inducido por el trasplante de EBCs. Ratones tdTomato fueron tratados con CypA, un inhibidor de la enzima calcineurina que reduce la angiogénesis mediada por Vegf (Hernandez et al., 2001; Rafiee et al., 2004), después de ser trasplantados en la SN con EBCs R1B5. En comparación con los controles (Figura 38A,A'), los ratones tratados con CypA (Figura 38B,B') mostraron una marcada reducción en el tamaño del trasplante a los 15 días (Figura 38C; $252.48 \pm 15.14 \mu\text{m}$ vs. $432.26 \pm 89.0 \mu\text{m}$, $n=3$) en asociación con una disminución significativa en el número de vasos sanguíneos CD31⁺ (Figura 38D; 256.23 ± 11.11 vasos sanguíneos/ mm^2 vs. 212.51 ± 0.786 vasos sanguíneos/ mm^2 , $P < 0.01$). Asimismo, estos efectos se acompañaron de una reducción significativa en el número de neuronas inmaduras Dcx^+ (Figura 38E; 101.05 ± 8.59 células/ mm^2 vs. 358.24 ± 42.18 células/ mm^2 , $P < 0.01$).

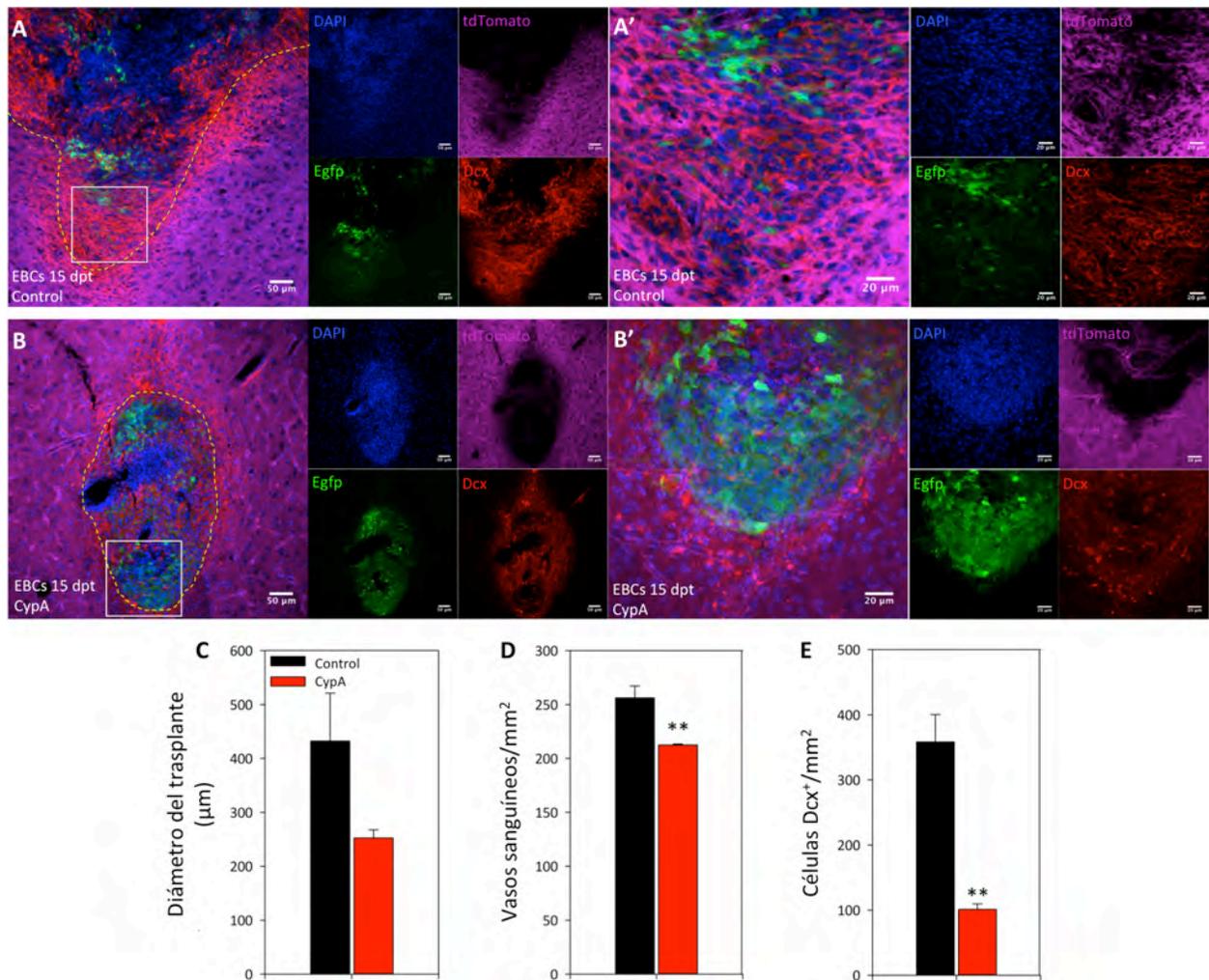


Figura 38. La inhibición de la angiogénesis reduce el crecimiento del trasplante y la neurogénesis inducida en la SN trasplantada. Ratones tdTomato previamente trasplantados con EBCs R1B5 (Egfp⁺) fueron tratados con CypA o inyectados con el vehículo (Control), y a los 15 dpt se determinó el número de células Dcx⁺. (A) Imágenes confocales que muestran neuroblastos endógenos (Dcx⁺/tdTomato⁺) rodeando el trasplante de EBCs R1B5 (Egfp⁺) en la SN tdTomato (magenta) a los 15 dpt (Control). (B) Imágenes equivalentes de ratones tratados con CypA. Las células Dcx⁺ se muestran en rojo y el borde del trasplante delimitado por la línea amarilla punteada. Los recuadros en (A) y (B) se muestran en (A') y (B'), respectivamente. En las gráficas se muestran las determinaciones hechas en ratones control y tratados con CypA: (C) diámetro del trasplante, (D) número de vasos sanguíneos por mm^2 y (E) células Dcx⁺ por mm^2 . Las barras de error indican el EEM; ** $p < 0.01$. Barra de calibración A y B, 50 μm ; A' y B', 20 μm .

Algunas de estas células Dcx⁺ se encontraron estrechamente asociadas a vasos sanguíneos (cabezas de flecha blancas en Figura 39A',B'), sugiriendo que ocurre una interacción con la vasculatura de manera similar a los neuroblastos migrantes de la ZSV al bulbo olfatorio (Bovetti

et al., 2007; Whitman et al., 2009). De acuerdo con estas observaciones, también encontramos una reducción en los vasos sanguíneos, los cuales se pueden observar en el ratón tdTomato sin utilizar ninguna tinción, (control 366.15 ± 18.31 vasos sanguíneos/ mm^2 vs. CypA 323.24 ± 7.72 vasos sanguíneos/ mm^2 ; $n=3$) y en el número de células Dcx^+ (control 43.39 ± 2.06 células por campo vs CypA 36.46 ± 6.58 células por campo; $n=3$) en la zona neurogénica del giro dentado de ratones tratados con CypA (Figura 39C,D).

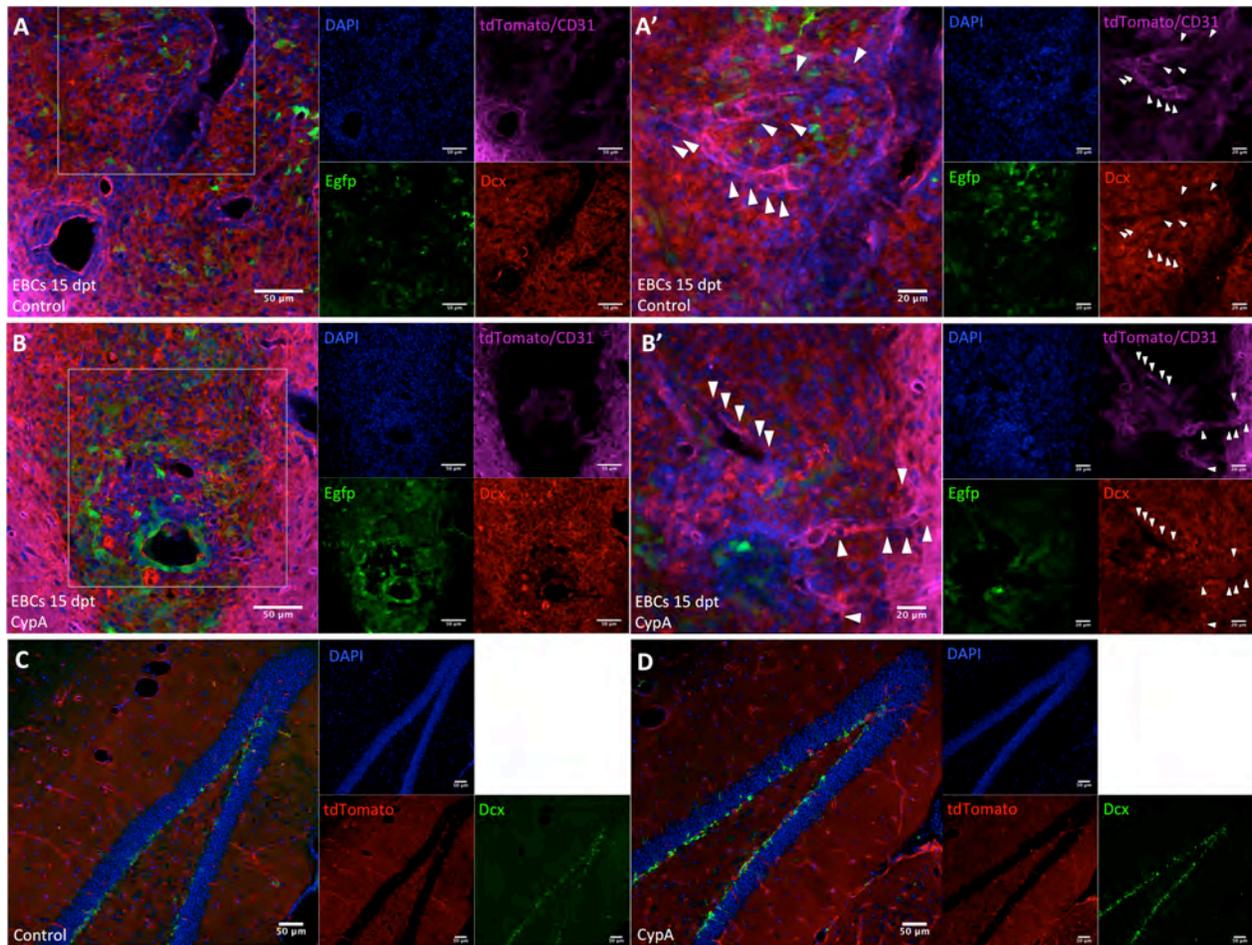


Figura 39. Asociación estrecha entre células Dcx^+ y vasos sanguíneos en la SN trasplantada. EBCs R1B5 (Egfp^+) fueron trasplantadas a ratones tdTomato. En la SN del grupo control (A) y el grupo tratado con CypA (B) se encontraron células Dcx^+ (rojo) estrechamente asociadas con vasos sanguíneos CD31^+ (magenta; cabezas de flecha blancas en A' y B'). (C, D) El tratamiento con CypA tuvo un efecto atenuante en el número de células Dcx^+ (verde) y de vasos sanguíneos (evidentes en rojo) en la zona neurogénica del hipocampo.

4.4.2 Cultivo de células de la sustancia nigra en presencia de factores solubles secretados por células de cuerpos embrioides

Las EBCs secretan varios factores solubles en cultivo entre los que se encuentran: varios Fgf's, BMP4, Shh, Igf-1/2 y Vegf (Fathi et al., 2009; Mfopou et al., 2007; Ngangan et al., 2014). Algunos de ellos como Vegf y Fgf-2 tienen propiedades angiogénicas (Cuevas et al., 1993; Seo et al., 2013) y neurogénicas (Kim et al., 2006; Luo et al., 2015b; Shen et al., 2016). En experimentos anteriores hemos encontrado que las células de la SN parecen activar un programa neurogénico en presencia de EBCs, tanto *in vitro* como *in vivo*. Con el objetivo de identificar el factor o combinación de factores involucrados en este proceso evaluamos la formación de neuroesferas en un cultivo de células de la SN en presencia de uno o varios factores solubles secretados por células de EBs embebidos en una matriz de hidrogel.

Al cabo de 13 días en cultivo observamos la formación de neuroesferas en presencia de Vegf y Fgf-2, similares a las que se observan cuando se cultiva la SN con EBCs. En un ensayo realizado por duplicado, las combinaciones de factores que dieron lugar a un mayor número de neuroesferas de la SN fueron las siguientes: Vegf-Fgf-2, 18 neuroesferas; BMP4-Vegf, 13 neuroesferas; y Vegf, 12 neuroesferas. Mientras que ninguna neuroesfera fue detectada en presencia del hidrogel solo (control; Figura 40).

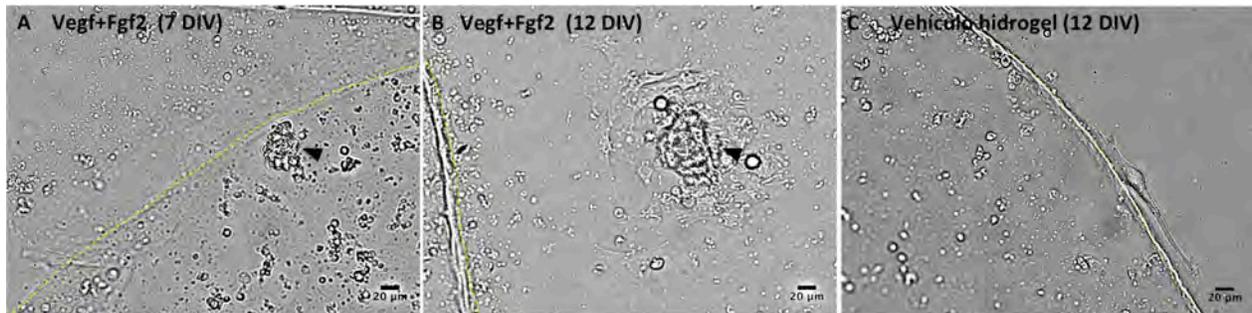


Figura 40. Neuroesferas de la SN generadas en contacto con Vegf/Fgf-2 embebidos en una matriz de hidrogel a los (A) 7 días *in vitro* (DIV) y (B) 12 DIV. En la condición control con el vehículo no se detectaron neuroesferas. Barra de calibración de 20 µm.

Cabe mencionar que también se observaron varios grupos de células con morfología alargada y bipolar tipo precursor. Para identificar a estas células se realizó una doble inmunofluorescencia contra Nes y Gfap. Los grupos de células observados en los pozos de la SN fueron Nes⁺/Gfap⁻ de manera similar a los detectados en cultivos anteriores (Figura 30B y C). Esto sugiere la presencia

de NPCs en la SN, con una baja capacidad de autorenovación, lo cual podría explicar el bajo número de neuroesferas obtenidas y su tamaño pequeño.

4.4.3 Fgf-2 y Vegf inducen neurogénesis en la sustancia nigra en ausencia del trasplante de células de cuerpos embrioides

En nuestro modelo *in vitro* evaluamos la capacidad de las células de la SN para generar neuroesferas en ausencia de EBCs. A este respecto, identificamos a Vegf y Fgf-2 como inductores de la formación de estos agregados.

Basándonos en este resultado, realizamos la administración de 10 ng de dichos factores embebidos en hidrogel, en la SN de ratones tdTomato⁺ para evaluar si podíamos reproducir el fenómeno neurogénico en ausencia de células trasplantadas a los quince días.

En contraste con la SN inyectada con el vehículo (hidrogel + PBS; Figura 41A), en la SN 15 días post-inyección (dpi) se encontraron células Dcx⁺ (Figura 41B), aunque en menor cantidad si se compara con la SN 15 dpt (185.15±5.39 células/mm², n=4 vs. 358.24±42.18 células/mm², n=4). Sin embargo, sí detectamos una asociación similar entre estas células Dcx⁺ y vasos sanguíneos (Figura 42A,A'). A los 30 dpi, el número de células Dcx⁺ disminuyó (92.17±3.77 células/mm², n=3; Figura 41C,C',F) mientras que, células Tubb3⁺ (146.51±6.8 células/mm², n=3; Figura 41D,F) y NeuN⁺ (82.52±20.29 células/mm², n=5; Figuras 41E-F y 42C) fueron encontradas alrededor del hidrogel, sugiriendo el desarrollo de un proceso neurogénico.

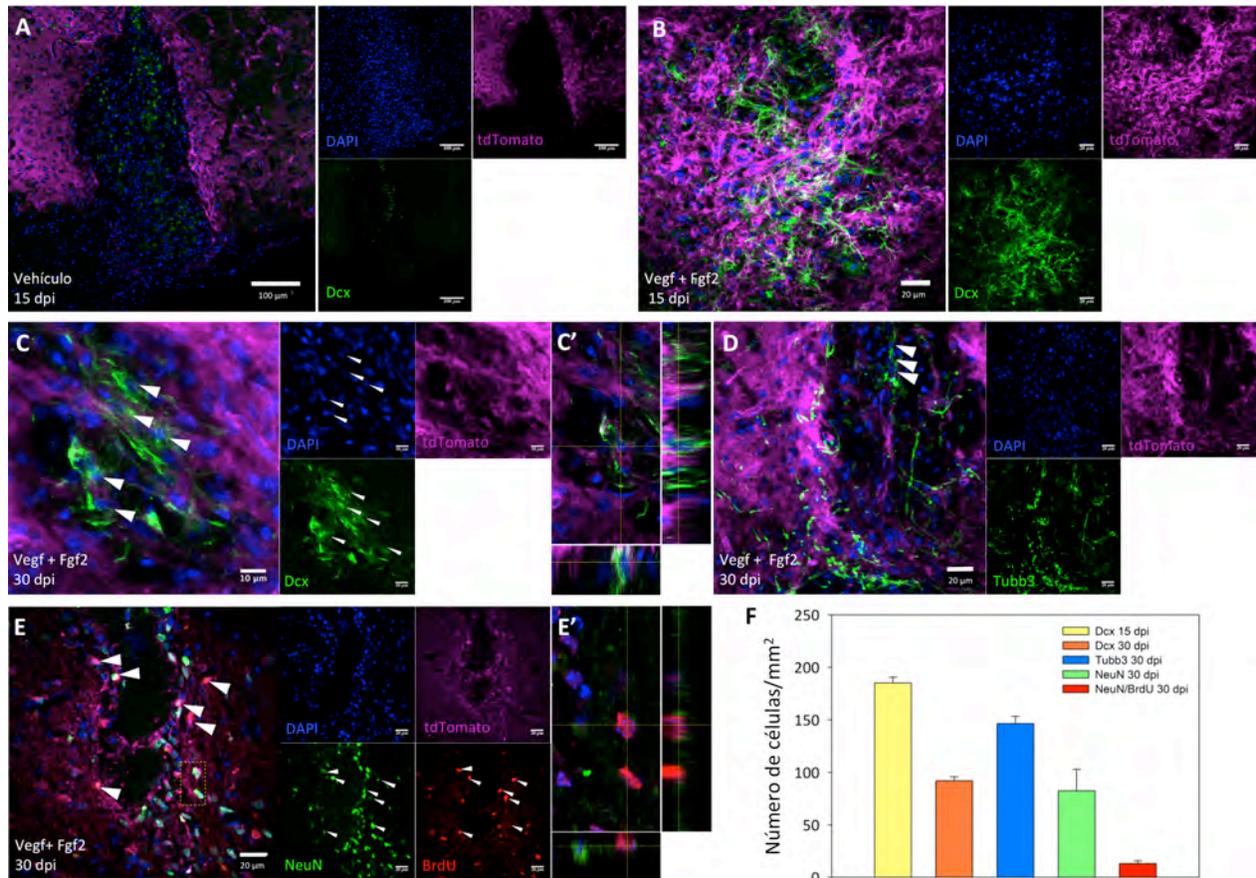


Figura 41. Factores angiogénicos promueven neurogénesis en la SN. Vegf y Fgf-2 fueron embebidos en hidrogel Puramatrix e inyectados en la SN de ratones tdTomato; los marcadores neuronales fueron determinados a los 15 y 30 dpi. (A, B) Proyecciones confocales que muestran la ausencia de células Dcx^+ en la SN inyectada con hidrogel sin factores (Vehículo) y la presencia de células Dcx^+ alrededor del sitio de inyección del hidrogel con Fgf-2+Vegf a los 15 dpi. (C-E) Proyecciones confocales de neuroblastos Dcx^+ (cabezas de flecha blancas; C', vista ortogonal), neuronas $Tubb3^+$ (cabezas de flecha blancas), y neuronas $NeuN^+$ (E', vista ortogonal del recuadro en E) alrededor del sitio de inyección de Vegf+Fgf-2 en la SN de ratones tdTomato (n=3-5); en E la cabezas de flecha amarillas señalan neuronas $NeuN^+$ marcadas con BrdU. (F) Cuantificación de las células positivas para los marcadores neuronales localizadas alrededor del sitio de inyección a los 15 y 30 dpi (n=3). Barras de error indican el EEM.

Cabe mencionar que, en ratones tratados con BrdU durante los 15 días posteriores a la inyección de factores, solo el 16% de todas las células $NeuN^+$ detectadas alrededor del hidrogel colocalizaron con BrdU (13.18 ± 2.62 $NeuN^+/BrdU^+$ células/mm², n=3; Figura 41E-F), lo cual puede ser un indicador de la baja tasa de sobrevivencia de estas neuronas nuevas.

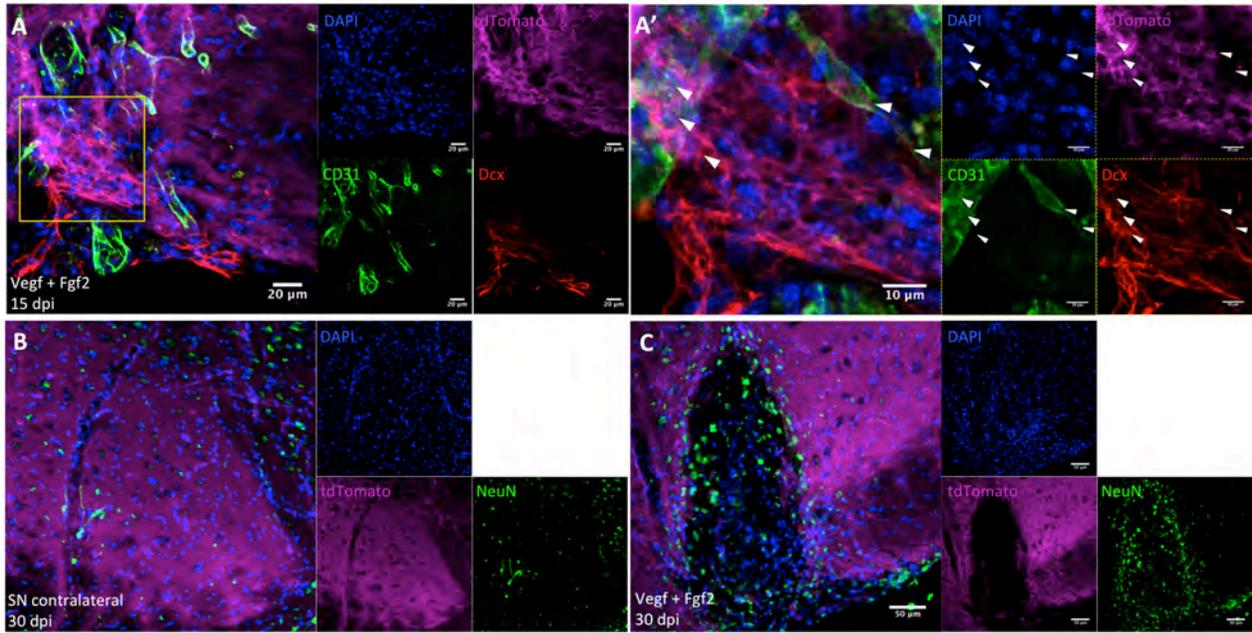


Figura 42. Cambios en la vasculatura e inducción neurogénica en la SN después de inyectar Vegf+Fgf-2. (A) Células Dcx^+ (rojo) asociadas a vasos sanguíneos ($CD31^+$; verde) en la SN inyectada con Vegf+Fgf-2 a los 15 dpi (cabezas de flecha blancas en A'). (B, C) Incremento en la cantidad de células $NeuN^+$ en la SN 30 días después de la inyección de Vegf+Fgf-2 en comparación con la SN contralateral.

En un esfuerzo por tratar de identificar el origen de las nuevas neuronas inducidas por la inyección de Vegf+Fgf-2, se realizó la inyección de ambos factores en ratones doble transgénicos $Gfap-Cre/ERT2;Gt(ROSA)26Sor^{tm4(ACTB-tdTomato,-EGFP)}$ previamente tratados con tamoxifen. A este respecto, pudimos identificar algunas células $Dcx^+/Egfp^+$ a los 15 dpi (Figura 43A,A') y $Tubb3^+/Egfp^+$ a los 30 dpi (Figura 43B,B'), así como células $Egfp^+$ con morfología neuronal (Figura 43C). Con estos resultados podemos inferir que la combinación de Vegf+Fgf-2 es capaz de inducir la transdiferenciación de astrocitos en nuevas neuronas aunque con una eficiencia menor a lo que se obtiene con el trasplante de EBCs. De acuerdo con esto, se detectaron muy pocas células $Gfap^+/Psa-Ncam^+$ ($4.56 \pm 1.94\%$, $n=3$; Figura 43D) en comparación con la alta frecuencia de colocalización entre los marcadores de neuroblastos Psa-Ncam y Dcx ($97.59 \pm 2.58\%$, $n=3$; Figura 43E). Esto sugiere que a diferencia del trasplante de EBCs, Vegf+Fgf-2 promueven un proceso neurogénico a partir de NSCs.

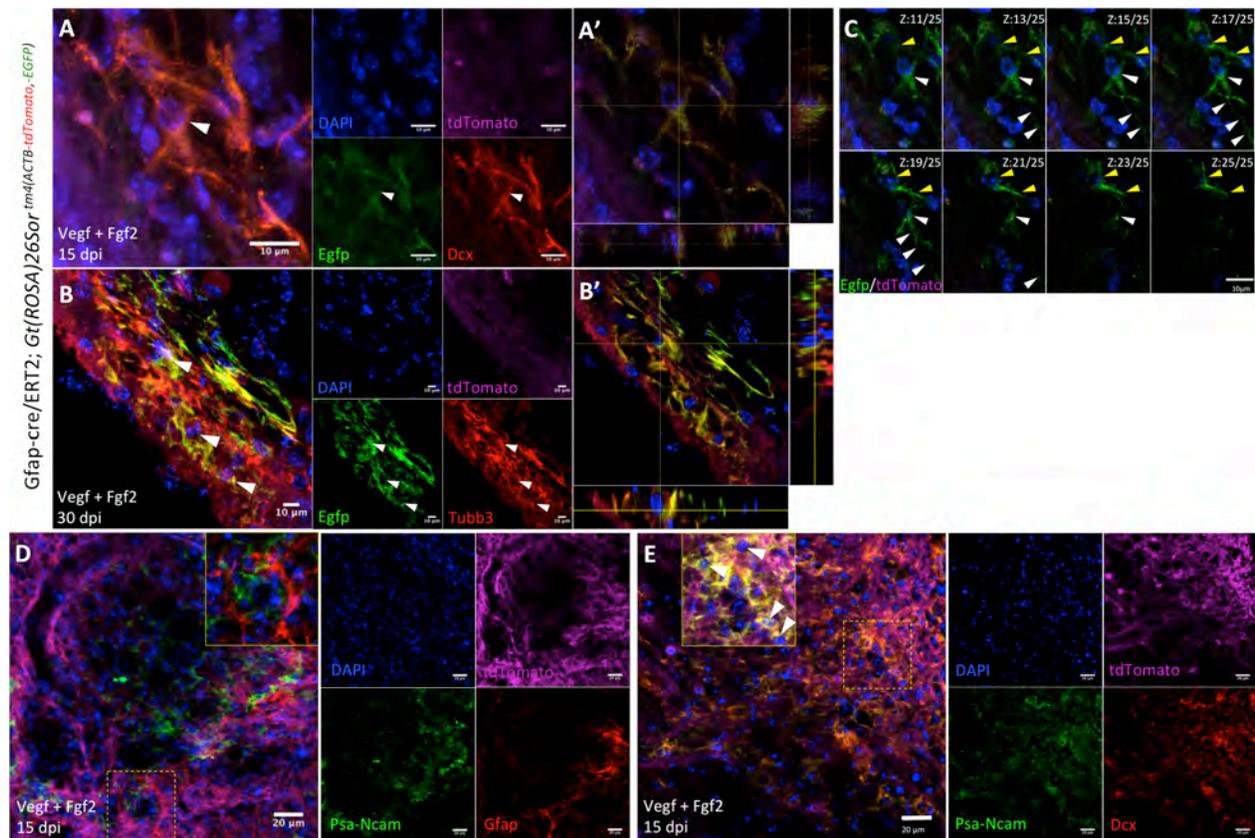


Figura 43. Una baja proporción de astrocitos de la SN derivan en nuevas neuronas en respuesta a factores angiogénicos. Vegf+Fgf-2 fueron embebidos en una matriz de hidrogel e inyectados a la SN de ratones $Gfap\text{-}cre/ERT2;Gt(ROSA)26Sor^{tm4(ACTB\text{-}tdTomato,\text{-}EGFP)}$, una semana después de ser tratados con tamoxifen; los marcadores neuronales fueron determinados a los 15 y 30 dpi. (A) Célula $Dcx^+/Egfp^+$ (cabeza de flecha blanca; A', vista ortogonal) detectada a los 15 dpi. (B) Células $Tubb3^+/Egfp^+$ (cabezas de flecha blancas; B', vista ortogonal) identificadas a los 30 dpi. (C) Trayectorias en el plano Z de dos células $Egfp^+$ (cabezas de flecha blancas y amarillas) encontradas alrededor del sitio de inyección (15 dpi); nótese las proyecciones que emergen del soma de ambas células. (D) Evaluación de la colocalización entre Psa-Ncam y Gfap en los neuroblastos detectados alrededor del sitio de inyección en ratones tdTomato; se encontró un $4.56 \pm 1.94\%$ de células $Psa\text{-}Ncam^+/Gfap^+$ del total de células $Psa\text{-}Ncam^+$ (n=3). (E) Evaluación de la colocalización entre Psa-Ncam y Dcx en los neuroblastos detectados alrededor del sitio de inyección; la cual fue observada en la mayoría de ellos (cabezas de flecha blancas; $97.59 \pm 2.58\%$; n=3).

4.5 Creación del vector policistrónico Lmx1a-Foxa2

Cómo se planteó en secciones anteriores, cabía la posibilidad de que las neuronas nuevas inducidas por el trasplante de EBCs no fueran dopaminérgicas, vertiente que finalmente resultó ser cierta. Para evaluar la plasticidad y compromiso de las células que daban origen a estas neuronas nuevas nos planteamos la estrategia de inducir su diferenciación dopaminérgica

mediante la expresión forzada de *Lmx1a* y *Foxa2*, tentativamente en la ventana de expresión de Nestina que pudimos detectar a los 6 dpt. Por esta razón, a partir del vector TtRMPVIR se obtuvieron los vectores de expresión para ambos factores de transcripción mostrados en la Figura 44.

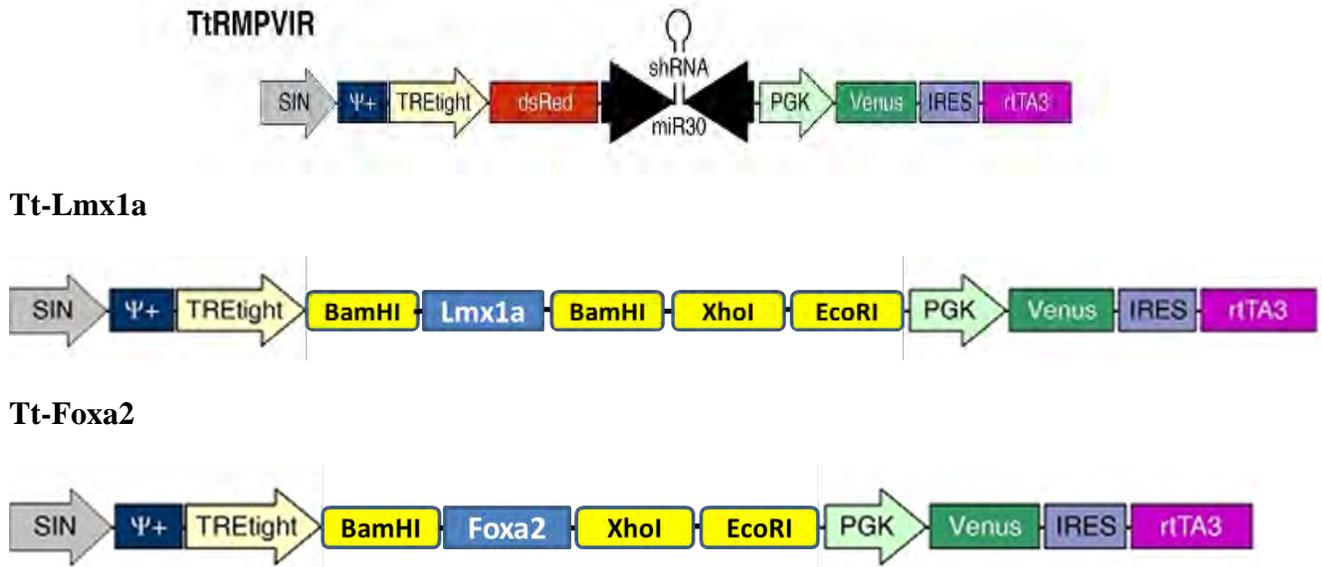


Figura 44. Esquema del vector TtRMPVIR y los dos vectores construidos, Tt-Lmx1a y Tt-Foxa2.

Se realizó la transfección del vector Tt-Lmx1a en células de la línea AD293T mediante polietilenimina (PEI) y se indujo la expresión de *Lmx1a* mediante la administración de doxiciclina (DOX), 48 horas después de la transfección. En la Figura 45, se muestra una micrografía de las células que fueron tratadas con diferentes dosis de DOX. En verde se muestra la expresión de la proteína reportera Venus y en rojo la expresión inducida de *Lmx1a*.

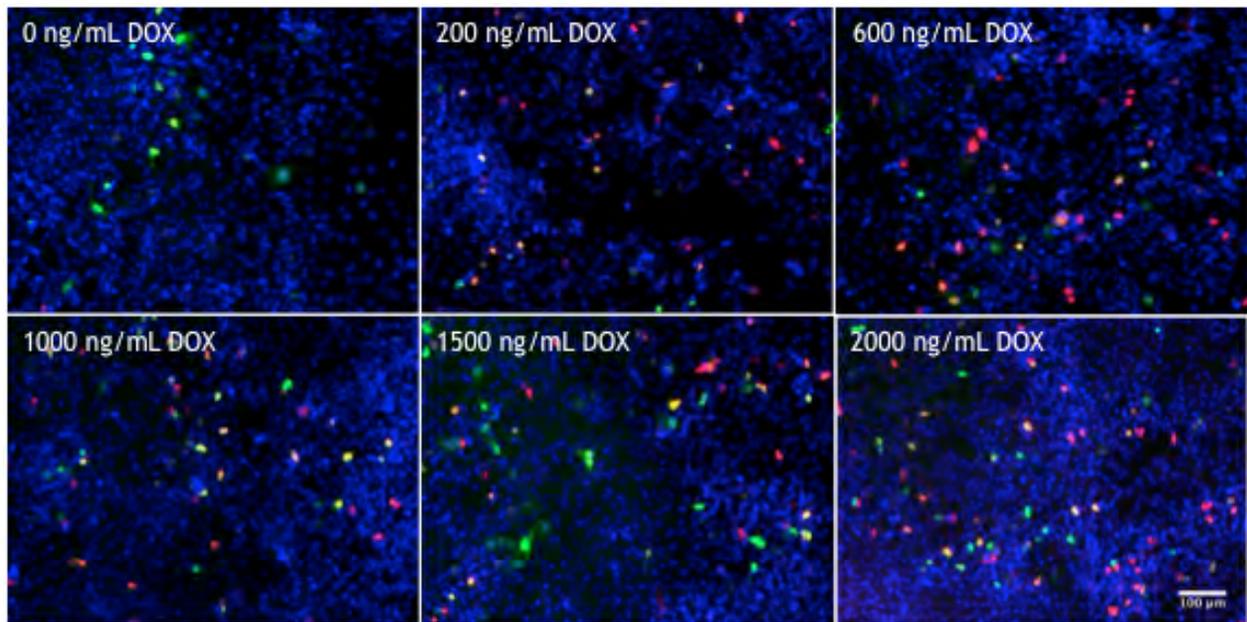


Figura 45. Inmunocitoquímica en células 293T transfectadas (proteína reportera Venus, verde) e inducidas con 0 a 2000 ng/mL de doxiciclina para expresar Lmx1a (rojo). Barra de calibración de 100 µm.

Asimismo, se planteó el objetivo de crear un vector de expresión policistrónico Lmx1a-Foxa2-Cherry usando un par de péptidos autocatalíticos (T2A y P2A; Figura 46). Sin embargo, por complicaciones técnicas se optó por generar dos transposones, uno para cada factor de transcripción, de los cuales se concretó el PB-Tt-Lmx1a. Por otro lado, con ayuda de la estudiante de Licenciatura en Ciencias Genómicas, Alejandra Guzmán Herrera, se trabajó en la construcción del transposón PB-Tt-Sox2-T2A-eBFP (Figura 47), ya que está reportado en la literatura que astrocitos en los cuales se sobreexpresa Sox2 generan nuevos neuroblastos Dcx^+ (Niu et al., 2015).

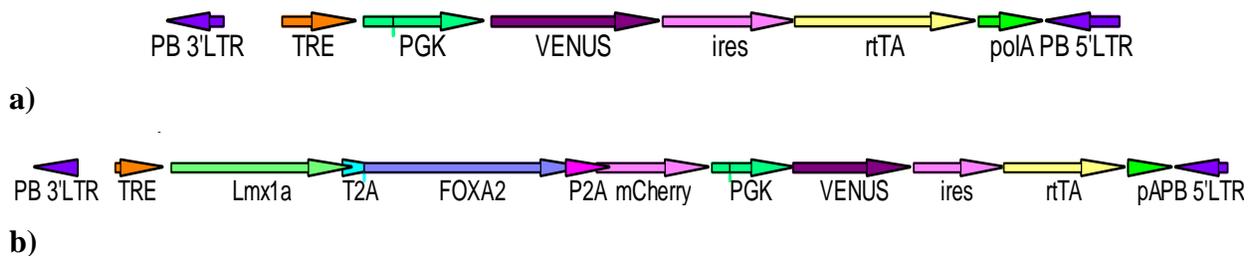


Figura 46. a) Mapa del sistema de transposición de expresión inducible (PB-Tt). b) Vector policistrónico para la sobreexpresión de Lmx1a y Foxa2.

PB-Tt-Lmx1a



PB-Tt-Sox2-T2A-eBFP



Figura 47. Esquema de los vectores construidos PB-Tt-Lmx1a y PB-Tt-Sox2-T2A-eBFP (transposones).

Con ambas construcciones se realizó la transfección de células de la línea COS7 mediante PEI y se evaluó la expresión de la proteína reportera Venus y la proteína azul fluorescente (eBFP), respectivamente. Sin embargo, no se concretaron los experimentos de sobreexpresión de estos factores *in vivo*.

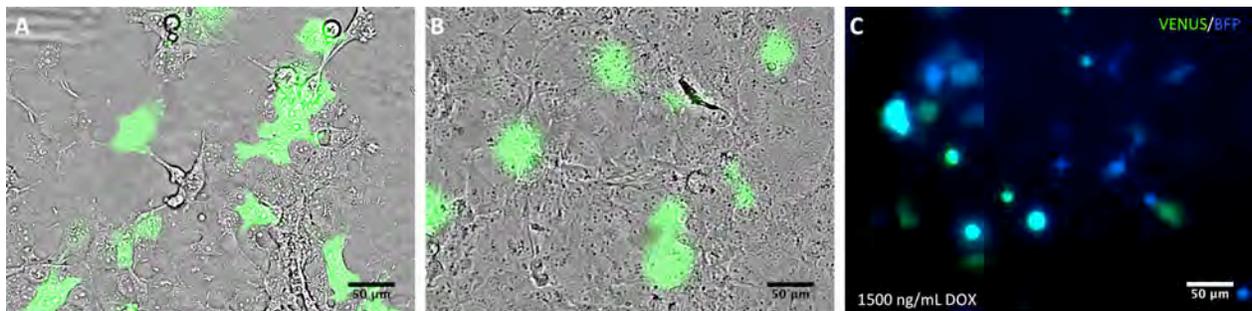


Figura 48. Células COS7 transfectadas con el transposón (A) PB-Tt-Lmx1a y el transposón (B) PB-Tt-Sox2-T2A-eBFP, en verde se observa la fluorescencia de la proteína reportera Venus. En (C) se muestran varias células expresando la eBFP (azul) como resultado de la inducción con 1500 ng/mL de DOX. Barra de calibración de 50 μ m.

5.1 Discusión

Basándose en evidencia experimental, se ha propuesto que varias áreas del cerebro adulto poseen capacidad neurogénica o albergan poblaciones de NSCs que se activan bajo ciertos estímulos (Albright et al., 2016; Gould, 2007; Lie et al., 2002; Morrison, 2016; Zhao et al., 2003). El presente trabajo se centró en evaluar la capacidad neurogénica de la SN de roedores adultos usando como herramienta a las EBCs, las cuales sensan ambientes neurogénicos tanto en el embrión (Baizabal y Covarrubias, 2009) como en el cerebro adulto (Maya-Espinosa et al., 2015). Nuestros resultados revelan la presencia de NSCs quiescentes y la inducción de un proceso de transdiferenciación de astrocitos parenquimales maduros en neuronas nuevas en la SN del roedor adulto.

5.1.1 Activación de células troncales quiescentes

La activación de NSCs quiescentes (Codega et al., 2014) en los nichos neurogénicos del cerebro adulto es un proceso constante que puede ser modulado por señales específicas del microambiente (Alvarez-Buylla y Lim, 2004; Conover y Notti, 2008). Se ha reportado que los vasos sanguíneos se encuentran estrechamente relacionados con los nichos neurogénicos y, a su vez, la activación de NSCs con procesos angiogénicos (Licht y Keshet, 2015; Palmer et al., 2000). Puede que estas asociaciones estén presentes en otras áreas cerebrales en las cuales la neurogénesis no es un proceso evidentemente activo, y que parece ocurrir solo bajo ciertas condiciones fisiológicas, como en respuesta a algún daño.

Los resultados obtenidos en el análisis de la proliferación celular en la SN de ratas adultas tras el trasplante de EBCs sugieren que efectivamente dicha manipulación promueve la proliferación endógena. Dicho efecto, no parece tener origen en el daño tisular causado por el trasplante o por algún(os) componente(s) del medio en el que se resuspenden las células. Además que parece ser local y no sistémico, porque la SN del hemisferio contralateral alberga escasas células BrdU⁺.

Asimismo, se observó que en etapas tempranas posteriores al trasplante (2- 72 hpt), alrededor del 80% de las células BrdU⁺ colocalizan con el marcador de NSCs, Sox2. Además, el análisis de los grupos 6 y 15 dpt mostró que alrededor del 43% y 56% de las células BrdU⁺ colocalizan con el marcador Dcx, lo cual sugiere que parte de estas células prosiguen una diferenciación neuronal. Mientras que, un 30% adquiere fenotipo glial. Sin embargo, parece ser que dichas células nuevas

no se mantienen, porque a los 30 dpt prácticamente todas las células BrdU⁺ han desaparecido, con baja generación de neuronas nuevas y cero neuronas dopaminérgicas nuevas.

En el caso de los trasplantes en ratón, los resultados coinciden bastante con lo observado en rata, debido a que a los 6 dpt se observaron células inmunorreactivas a marcadores propios de NSCs, como Sox1 y Nes. La migración de estas células desde un nicho neurogénico cercano como la región pAq no parece probable, ya que la distribución de las células Sox1/Sox2/Nes es homogénea alrededor del trasplante y se observa desde los periodos post-trasplante más tempranos. Se ha reportado que la región pAq anida una población de NPCs aparentemente capaces de generar neuronas dopaminérgicas nuevas, sin embargo, esto ocurre a los 45-65 días después de inducir daño con MPTP (L'Episcopo et al., 2014). En cuanto al número de células endógenas Dcx⁺ a los 15 dpt, se encontraron varios grupos distribuidos principalmente alrededor del trasplante. Cabe mencionar que sólo un porcentaje de estas células colocalizaba con la marca de BrdU, lo cual sugería que posiblemente estas células nacieron antes de los 3 dpt o no hayan transitado por un fenómeno de expansión. Este último argumento cobra fuerza debido a que en la rata también se observan células Dcx⁺ que no contienen BrdU, aún y cuando dicho marcador mitótico fue administrado desde el día que se realizó el trasplante. De manera similar a las regiones neurogénicas típicas, la sobrevivencia de neuronas maduras fue baja. Cabe mencionar que en el caso de los trasplantes hechos en ratón, el crecimiento del trasplante hizo difícil determinar la capacidad de integración de estas neuronas nuevas en circuitos neuronales preexistentes.

Otra estrategia que se siguió para confirmar la existencia de NPCs en la SN fue la formación de neuroesferas a partir de la SN trasplantada de seis días. Nuestros hallazgos sugieren que existen células endógenas (Egfp⁻, confirmado por PCR) que tienen la capacidad de formar neuroesferas, las cuales expresan marcadores de una neuroesfera típica, como Gfap, Nes, Tubb3 y Sox2 (corroborado mediante PCR punto final e inmunocitofluorescencia). Cabe mencionar que haciendo una comparación entre las neuroesferas típicas descritas en cultivos de ZSV de roedor adulto y las esferas generadas a partir de la SN trasplantada podemos resaltar varias características que las hacen diferentes. Entre ellas, el tiempo de generación que es de 5 a 7 días en las neuroesferas de la ZSV y de 12 a 15 días en la SN trasplantada; el tamaño que alcanzan en tres días a partir de su generación, que en el caso de las neuroesferas de la ZSV es de 200 a 250 μm mientras que las de la SN son hasta 5 veces más pequeñas; y, su morfología, ya que las

esferas de la SN son más compactas y de superficie lisa comparadas con una superficie granular de las neuroesferas de la ZSV. Algunas de las características antes mencionadas son compartidas con las neuroesferas generadas por células del giro dentado (Guo et al., 2012) y en nuestras manos, por células de la zona pAq. Esto sugiere que estas zonas anidan NPCs similares.

Asimismo, se detectó la presencia de células $Dcx^+/Egfp^-$ en un cocultivo de células de la SN con EBCs. Al tener las células de la SN aisladas de cualquier otra región cerebral nos confirma que son estas las que generan los neuroblastos y que no migran de otra zona. En conjunto, estos resultados indicarían que en la SN existe un pequeño número de NPCs que son activadas por el trasplante de células de EBs.

A este respecto, es importante tomar en cuenta a la población de células $Nes^+/Gfap^-$ que se detectaron en varios cultivos. A pesar de que la carencia de marcadores inmunofenotípicos específicos dificulta la caracterización adecuada de esta población se debe resaltar que las células tipo C o progenitores de amplificación transitoria de la ZSV también son $Nes^+/Gfap^-$. Y que las células aisladas de la SN al ser tratadas con GDNF, BDNF, Fgf-2 y ácido valproico generaron células $Tubb3^+$, lo cual no se observó en la condición control.

En nuestro modelo de formación de neuroesferas evaluamos la capacidad de células de la SN, en ausencia de EBs, de generar dichos agregados clonales. Probamos Fgf-2, Vegf y BMP4 solos o en combinación. Nuestros resultados mostraron que, Vegf y Fgf-2, ambos factores angiogénicos, inducen la formación de estos agregados. Por lo que procedimos a realizar la administración de dichos factores directamente en la SN de ratones adultos obteniendo células inmunorreactivas a Dcx/Psa-Ncam a los 15 dpi.

Estos datos, junto con la reducción del número de neuroblastos Dcx^+ al administrar un inhibidor angiogénico, sugieren que la neurogénesis inducida por las EBCs parece involucrar la participación de los vasos sanguíneos. Es relevante mencionar que se ha descrito una fuerte asociación entre las NSCs y los vasos sanguíneos en la ZSG (Palmer et al., 2000) y en la ZSV (Shen et al., 2008). En concordancia con estos datos, la infusión intracerebroventricular de Vegf estimula la neurogénesis en ambas regiones neurogénicas (Jin et al., 2002) y la expresión ectópica de Vegf incrementa la neurogénesis y el número de vasos sanguíneos en la ZSG (Licht et al., 2016). Además, de la misma manera que parece ocurrir en la SN, la administración simultánea de Vegf y Fgf-2 en el cuarto ventrículo activa una población quiescente de NSCs (Luo

et al., 2015b). En nuestros experimentos, la capacidad de Vegf y Fgf-2 de estimular la generación de nuevas neuronas fue más baja que la obtenida con el trasplante de EBCs; de igual manera que la transdiferenciación de astrocitos a neuronas. Con esto podemos concluir que otros factores generados por los EBs están involucrados en la estimulación de la capacidad neurogénica de la SN.

5.1.2 Células gliales como fuente de neuronas nuevas

La proliferación de NPCs es una característica de un proceso neurogénico activo, de tal manera que los neuroblastos y neuronas nuevas pueden ser identificadas por la incorporación de análogos de nucleótidos, como el BrdU, IdU, EdU, etc. Por esta razón fue sorprendente encontrar que sólo el 20-30% de las células Dcx⁺ estuvieran marcadas con BrdU, aun y cuando fue constantemente aplicado durante la mayor parte del proceso neurogénico. Esto sugería que estos neuroblastos no provenían de NPCs en proliferación activa. Debido a este resultado se decidió evaluar la colocalización de marcadores gliales (S100b y Gfap) con marcadores de neuroblasto (Dcx, Psa-Ncam) en las células endógenas a los 15 dpt. Nuestros resultados mostraron que efectivamente, algunas de las células Psa-Ncam⁺ y Dcx⁺ también tienen niveles bajos de S100b y Gfap, lo cual sugiere que estos neuroblastos no provienen de un proceso neurogénico clásico, y por lo tanto, no incorporan BrdU. En particular, la presencia de S100b es más representativa de astrocitos “maduros”, ya que es expresado en células Gfap⁺ con propiedades de NSC reducidas, además de que parece estar reprimido en las NSCs de la ZSV (Raponi et al., 2007). Cabe mencionar que los niveles de Dcx detectados en la SN fueron similares a los de la vía migratoria rostral y el giro dentado (Figura S2); lo cual hace difícil creer que estas células Dcx⁺ corresponden a las reportadas por Worlitzer et al. (2013). Estos resultados abrieron la posibilidad de que astrocitos parenquimales estuvieran transdiferenciando a neuronas. En un proceso de transdiferenciación una célula diferenciada (astrocito) se convierte en otro tipo celular (neurona) sin pasar por una etapa de expansión. Dicho fenómeno se ha descrito en otros órganos y también se le ha llamado reprogramación adaptativa (Jessen et al., 2015).

En varios trabajos se ha reportado la generación de neuronas nuevas a partir de astrocitos en el cerebro adulto mediante la expresión forzada de factores proneurales como neurogenina-2 y Ascl1 (Mash1) *in vitro* (Berninger et al., 2007) e *in vivo* usando factores de especificación dopaminérgica como Lmx1a (Rivetti di Val Cervo et al., 2017). Sin embargo, el verdadero

potencial intrínseco de los astrocitos para convertirse en neuronas nuevas ha sido demostrado en el estriado y la corteza en respuesta a daño (Magnusson et al., 2014; Nato et al., 2015). En particular, Magnusson et al. (2014) mostraron que la conversión inicia con una baja actividad de la vía de señalización de Notch1 y activación de la expresión de *Ascl1*, seguido por la coexpresión de marcadores astrocíticos (*Gfap*, *S100b*) y el marcador de neuroblastos, *Dcx*. Este fenómeno es similar a lo que nosotros encontramos, sin embargo, parece ser que en este caso si existen pasos de división celular antes de que ocurra la conversión neuronal (Figura 49).

Cabe mencionar que, a los 6 dpt, también detectamos células *Gfap*⁺/*Sox2*⁺ cuya dinámica se observó de manera contraria a las células *Gfap*⁺/*Dcx*⁺, es decir, el porcentaje de células *Gfap*⁺/*Sox2*⁺ disminuyó mientras que el de las células *Gfap*⁺/*Dcx*⁺ aumentó hacia los 15 dpt. Esto contrasta con el incremento en las células *Gfap*⁺/*Nes*⁺ que parecen representar astrocitos reactivos. En este sentido, es posible que las células negativas para BrdU y positivas para marcadores de NPCs (p.ej. *Sox2*⁺/*BrdU*) emergieran antes de convertirse en neuroblastos *Dcx*⁺/*Psa-Ncam*⁺, y que por otra parte, los astrocitos sean también la fuente de las NPCs que incorporaron BrdU. Para consolidar esta conclusión el trazado de linaje realizado en ratones doble transgénicos *Gfap-cre/ERT2;Gt(ROSA)26Sor^{tm4}(ACTB-tdTomato,-EGFP)* confirmó que la mayoría de las células *Dcx*⁺ y *Tubb3*⁺ endógenas inducidas por el trasplante de EBCs derivan de astrocitos maduros *Gfap*⁺. Debido a que muchos marcadores fenotípicos se comparten entre los astrocitos parenquimales diferenciados y las NSCs, se requieren realizar más estudios para poder identificar la fuente celular de los neuroblastos/neuronas nuevos.

Por otro lado, a pesar de que tras la inyección de Vegf y Fgf-2 se obtuvieron células *Dcx*⁺. Este proceso no fue tan eficiente como el trasplante de EBCs para inducir la transdiferenciación de células *Gfap*⁺ en neuroblastos, ya que una baja proporción de estas células mostraron colocalización entre marcadores neuronales y gliales. Y, en el ratón doble transgénico se detectaron escasas células *Dcx*⁺/*Egfp*⁺ y *Tubb3*⁺/*Egfp*⁺. Asimismo, la cantidad de neuroblastos/neuronas nuevos obtenidos a partir de NPCs activas, detectados por la incorporación de BrdU, también fue muy baja. Sin embargo, no podemos descartar que estos astrocitos parenquimales sean equivalentes a las NSCs quiescentes *Gfap*⁺/*S100b*⁺/*Nes*⁺/*Sox2*⁺ encontradas en el telencéfalo del pez cebra adulto; las cuales se convierten directamente en neuronas nuevas sin atravesar por una fase de división celular (Barbosa et al., 2015). Esto también es apoyado por la población *Nes*⁺/*Gfap*⁻ aislada en cultivo en condiciones de alto suero, la cual de manera pasiva

genera astrocitos (Mondragón-Figueroa, 2017). Sin embargo, al ser expuesta a GDNF, BDNF, Fgf-2 y ácido valproico generan células Tubb3⁺. De esta manera podríamos encontrarnos ante una población precursora gliogénica y/o astrocitos parenquimales que ante ciertos estímulos transdiferencian a neuronas.

En resumen, nuestros resultados apoyan la participación de dos procesos diferentes en la generación de neuroblastos endógenos en la SN tras el trasplante de EBCs (Figura 49). El primero involucra un proceso neurogénico clásico en el cual, el nacimiento de neuronas nuevas se origina a partir de NPCs que se expanden (incorporan BrdU, generan neuroesferas) y producen neuroblastos que diferencian a neuronas maduras. Este proceso parece estar limitado, ya que al cabo de 30 días de la inducción se observan escasas células NeuN⁺/BrdU⁺. Por otro lado, encontramos muchas células Dcx⁺/Psa-Ncam⁺ que no incorporan BrdU y coexpresan marcadores gliales. Este argumento explicaría porque se observan tantas células Dcx⁺ que no incorporan BrdU, aun cuando dicho marcador se administra desde el día del trasplante. Esto último también las hace difíciles de identificar una vez que se convierten en neuronas, si es que lo hacen. Sabiendo esto, se realizó el trasplante de EBCs en ratones doble transgénicos para confirmar el origen glial de estos neuroblastos/neuronas nuevos.

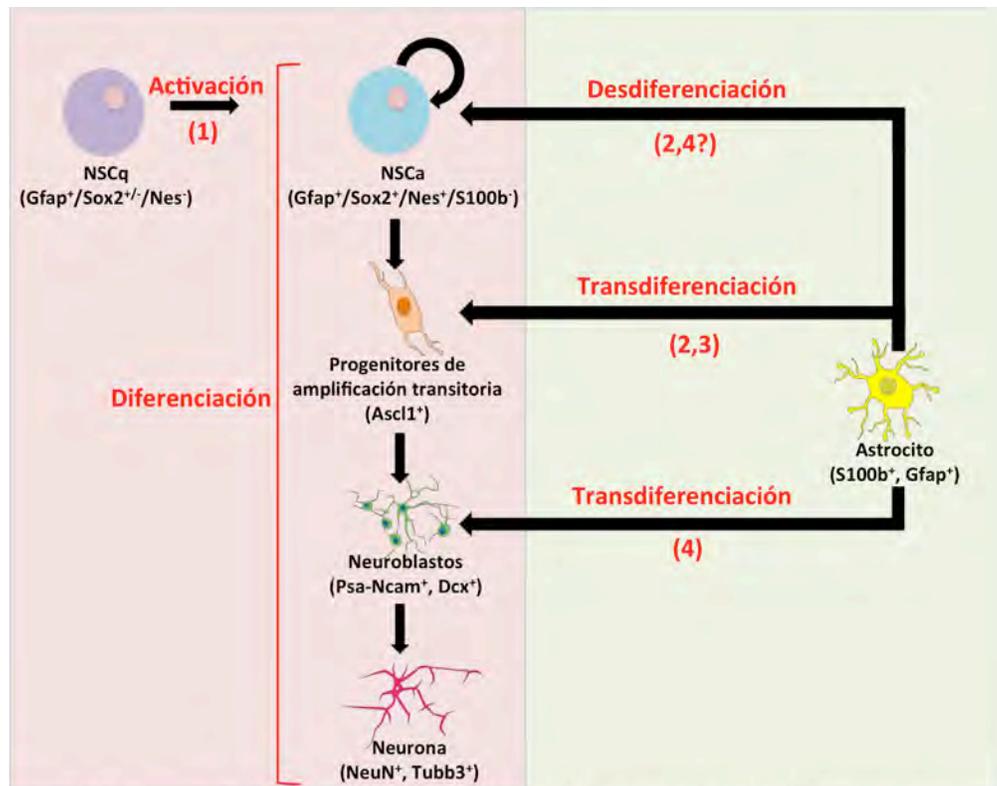
5.1.3 Neurogénesis dopaminérgica en la sustancia nigra del adulto

Diversos trabajos han propuesto que las neuronas dopaminérgicas se renuevan a lo largo de la vida a una tasa baja y que este fenómeno es acelerado por un proceso neurodegenerativo inducido (p.ej. asociado a alguna enfermedad o provocado por un compuesto tóxico). Sin embargo, aún no es claro el origen de estas neuronas nuevas. La incorporación de BrdU se ha detectado durante la generación de neuronas dopaminérgicas nuevas en la SN (Zhao et al., 2003). Sin considerar que dicha incorporación se deba a procesos de reparación celular, esto se ha interpretado como un indicador de la presencia de NPCs en la SN.

En un estudio reciente, usando ratones Nes-CreER o Sox2-CreER a los cuales se les eliminaron los alelos “floreados” *Th* mediante la expresión de la proteína CreER bajo el promotor de Nes o de Sox2. Los autores han propuesto que la fuente de neuronas dopaminérgicas nuevas son células Nes⁺/Sox2⁻ (Albright et al., 2016). A este respecto, nosotros no detectamos células Nes⁺ en la SN intacta, lo cual sugiere que los precursores anteriormente mencionados puedan ser reclutados de algún sitio, como la zona periacueductal (L'Episcopo et al., 2014). Alternativamente, algunos

“precursores” activos pudieron expresar *Nes* de manera transitoria durante el tratamiento con tamoxifen, como ocurre en algunos astrocitos estriatales (Nato et al., 2015).

En nuestros resultados mostramos que un número escaso de células en división o células con marcadores de NPC se encuentran en la SN intacta pero tras el trasplante de EBCs o la inyección de Vegf+Fgf-2 rápidamente emergen células con marcadores de NPC o de neuroblasto. Sin embargo, a pesar de mostrar capacidad neurogénica en ningún caso observamos la expresión del marcador dopaminérgico Th. Esto se puede deber a un efecto inhibitorio de los factores secretados por las EBCs o la falta de algún (os) factor (es) requerido (s) para una correcta especificación. A este respecto, sería interesante determinar si es posible activar los factores faltantes mediante la inducción de la neurodegeneración dopaminérgica. Aunque no se puede descartar que el destino neuronal de las NPCs activadas en la SN esté restringido a fenotipos no dopaminérgicos. Otra estrategia sería forzar a estas NPCs a generar neuronas dopaminérgicas mediante la sobreexpresión de factores transcripcionales involucrados en la especificación dopaminérgica. Ante el panorama inicial, nos planteamos el objetivo de utilizar un sistema retroviral para la sobreexpresión de *Lmx1a* y *Foxa2*. Sin embargo, la tasa de proliferación endógena generada por el trasplante de EBCs no hizo factible esta estrategia, por lo que se propuso el uso de un sistema de transposición inducible. Con esto en mente se generaron los transposones PB-Tt-*Lmx1a* y PB-Tt-*Sox2-T2A-eBFP*, los cuales fueron probados *in vitro* con el uso de doxiciclina. Dado que el proyecto se enfocó en identificar el origen de los neuroblastos no marcados con BrdU y el posible mecanismo de transdiferenciación involucrado. La inducción forzada de neuronas dopaminérgicas usando estos vectores es una estrategia potencial en la generación de neuronas nuevas tipo-específicas a partir de una fuente celular endógena que requiere ser evaluada.



¹Codega et al., 2014; ²Magnusson et al., 2014; ³Nato et al., 2015; ⁴El presente trabajo

Figura 49. Neurogénesis típica y atípica en el cerebro adulto. Un proceso neurogénico típico involucra la participación de NSCs activas (NSCa) con capacidad de autorrenovación, las cuales dan origen a progenitores de amplificación transitoria ($Ascl1^+$) que a su vez generan neuroblastos ($Psa-Ncam^+/Dcx^+$), los cuales maduran en nuevas neuronas totalmente diferenciadas ($Tubb3^+/NeuN^+$). Las regiones con una alta tasa neurogénica parecen anidar NSC quiescentes (NSCq) que se activan bajo estímulos específicos. En contraste con este proceso neurogénico típico, en la SN, así como en el estriado y la corteza medial, astrocitos post-mitóticos maduros ($S100b^+/Gfap^+$) transdiferencian o desdiferencian en células con capacidad neurogénica. Estos procesos neurogénicos atípicos inician con la adquisición de propiedad de NPC con o sin atravesar por una o varias etapas de división celular.

5.2 Conclusiones

La renovación homeostática neuronal ha sido propuesta para muchas áreas cerebrales, incluida la SN y el estriado. Sin embargo, no se ha encontrado un nicho neurogénico evidente en estas regiones. Nuestros resultados sugieren que pueden originarse neuronas nuevas en la SN a partir de NSCs quiescentes o astrocitos parenquimales que a través de un proceso de transdiferenciación se convierten en NPCs o directamente en neuroblastos. El primero involucra un proceso neurogénico clásico en el cual, el nacimiento de neuronas nuevas se origina a partir de NPCs que se expanden (incorporan BrdU, generan neuroesferas) y producen neuroblastos que diferencian a neuronas maduras. Por otro lado, en el proceso de transdiferenciación una célula diferenciada (astrocito) o un precursor de otro linaje se convierte en otro tipo celular (neurona) sin pasar por una etapa de expansión. Para ambas posibilidades es importante evaluar la capacidad de estas células para generar diferente tipos neuronales mediante la sobreexpresión de factores de transcripción específicos.

5.3 Perspectivas

En otras especies se ha reportado la existencia de células gliales derivadas directamente de la glía radial que residen en el parénquima. Estas células tienen alto potencial neurogénico, lo cual está relacionado con una alta capacidad regenerativa, por lo que sería importante determinar si en el cerebro de los mamíferos existe una población análoga que en condiciones normales se encuentra en estado quiescente.

Es de especial interés la población $Nes^+/Gfap^-$ aislada en cultivo que normalmente genera astrocitos pero al ser expuesta a ciertos factores como GDNF, BDNF, Fgf-2 y ácido valproico parece generar células $Tubb3^+$, lo cual también apoya la existencia de fenómenos de transdiferenciación en el cerebro de mamíferos a partir de una población precursora gliogénica y/o astrocitos parenquimales. A este respecto, el grupo de investigación está realizando esfuerzos por expandir esta población y realizar su caracterización. Desde el punto de vista clínico sería importante determinar si procesos cancerígenos en el cerebro humano están asociados a la ocurrencia de este tipo de fenómenos.

Finalmente, es de suma importancia determinar si las células gliales que residen en la SN y dan origen a neuronas nuevas tienen el potencial de generar nuevas neuronas dopaminérgicas, ya sea

al inducir una lesión o al sobreexpresar factores de transcripción clave en la diferenciación dopaminérgica.

Bibliografía

Aguirre, A.A., Chittajallu, R., Belachew, S., Gallo, V., 2004. NG2-expressing cells in the subventricular zone are type C-like cells and contribute to interneuron generation in the postnatal hippocampus. *J Cell Biol* 165, 575-589.

Aimone, J.B., Li, Y., Lee, S.W., Clemenson, G.D., Deng, W., Gage, F.H., 2014. Regulation and function of adult neurogenesis: from genes to cognition. *Physiol Rev* 94, 991-1026.

Albright, J.E., Stojkowska, I., Rahman, A.A., Brown, C.J., Morrison, B.E., 2016. Nestin-positive/SOX2-negative cells mediate adult neurogenesis of nigral dopaminergic neurons in mice. *Neurosci Lett* 615, 50-54.

Alvarez-Buylla, A., Garcia-Verdugo, J.M., 2002. Neurogenesis in adult subventricular zone. *J Neurosci* 22, 629-634.

Alvarez-Buylla, A., Lim, D.A., 2004. For the long run: maintaining germinal niches in the adult brain. *Neuron* 41, 683-686.

Alvarez-Buylla, A., Lois, C., 1995. Neuronal stem cells in the brain of adult vertebrates. *Stem Cells* 13, 263-272.

Amamoto, R., Huerta, V.G., Takahashi, E., Dai, G., Grant, A.K., Fu, Z., Arlotta, P., 2016. Adult axolotls can regenerate original neuronal diversity in response to brain injury. *Elife* 5.

Andersson, E., Tryggvason, U., Deng, Q., Friling, S., Alekseenko, Z., Robert, B., Perlmann, T., Ericson, J., 2006. Identification of intrinsic determinants of midbrain dopamine neurons. *Cell* 124, 393-405.

Arvidsson, A., Collin, T., Kirik, D., Kokaia, Z., Lindvall, O., 2002. Neuronal replacement from endogenous precursors in the adult brain after stroke. *Nat Med* 8, 963-970.

Arzate, D.M., Portillo, W., Corona, R., Paredes, R.G., 2013. Repeated paced mating promotes the arrival of more newborn neurons in the main and accessory olfactory bulbs of adult female rats. *Neuroscience* 232, 151-160.

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.

Barbosa, J.S., Sanchez-Gonzalez, R., Di Giaimo, R., Baumgart, E.V., Theis, F.J., Gotz, M., Ninkovic, J., 2015. Neurodevelopment. Live imaging of adult neural stem cell behavior in the intact and injured zebrafish brain. *Science* 348, 789-793.

Bauer, S., Hay, M., Amilhon, B., Jean, A., Moysse, E., 2005. In vivo neurogenesis in the dorsal vagal complex of the adult rat brainstem. *Neuroscience* 130, 75-90.

Becker, C.G., Becker, T., 2008. Adult zebrafish as a model for successful central nervous system regeneration. *Restor Neurol Neurosci* 26, 71-80.

Bedard, A., Parent, A., 2004. Evidence of newly generated neurons in the human olfactory bulb. *Brain Res Dev Brain Res* 151, 159-168.

Belachew, S., Chittajallu, R., Aguirre, A.A., Yuan, X., Kirby, M., Anderson, S., Gallo, V., 2003. Postnatal NG2 proteoglycan-expressing progenitor cells are intrinsically multipotent and generate functional neurons. *J Cell Biol* 161, 169-186.

Benitez, J.A., Arregui, L., Cabrera, G., Segovia, J., 2008. Valproic acid induces polarization, neuronal-like differentiation of a subpopulation of C6 glioma cells and selectively regulates transgene expression. *Neuroscience* 156, 911-920.

Berg, D.A., Kirkham, M., Beljajeva, A., Knapp, D., Habermann, B., Ryge, J., Tanaka, E.M., Simon, A., 2010. Efficient regeneration by activation of neurogenesis in homeostatically quiescent regions of the adult vertebrate brain. *Development* 137, 4127-4134.

Bernier, P.J., Bedard, A., Vinet, J., Levesque, M., Parent, A., 2002. Newly generated neurons in the amygdala and adjoining cortex of adult primates. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 11464-11469.

Berninger, B., Costa, M.R., Koch, U., Schroeder, T., Sutor, B., Grothe, B., Gotz, M., 2007. Functional properties of neurons derived from in vitro reprogrammed postnatal astroglia. *J Neurosci* 27, 8654-8664.

Bovetti, S., Hsieh, Y.C., Bovolin, P., Perroteau, I., Kazunori, T., Puche, A.C., 2007. Blood vessels form a scaffold for neuroblast migration in the adult olfactory bulb. *J Neurosci* 27, 5976-5980.

Bramhall, N.F., Shi, F., Arnold, K., Hochedlinger, K., Edge, A.S., 2014. Lgr5-positive supporting cells generate new hair cells in the postnatal cochlea. *Stem Cell Reports* 2, 311-322.

Breton-Provencher, V., Lemasson, M., Peralta, M.R., 3rd, Saghatelian, A., 2009. Interneurons produced in adulthood are required for the normal functioning of the olfactory bulb network and for the execution of selected olfactory behaviors. *J Neurosci* 29, 15245-15257.

Caiazzo, M., Dell'Anno, M.T., Dvoretzkova, E., Lazarevic, D., Taverna, S., Leo, D., Sotnikova, T.D., Menegon, A., Roncaglia, P., Colciago, G., Russo, G., Carninci, P., Pezzoli, G.,

Gainetdinov, R.R., Gustincich, S., Dityatev, A., Broccoli, V., 2011. Direct generation of functional dopaminergic neurons from mouse and human fibroblasts. *Nature* 476, 224-227.

Cameron, H.A., Woolley, C.S., McEwen, B.S., Gould, E., 1993. Differentiation of newly born neurons and glia in the dentate gyrus of the adult rat. *Neuroscience* 56, 337-344.

Carey, B.W., Markoulaki, S., Hanna, J., Saha, K., Gao, Q., Mitalipova, M., Jaenisch, R., 2009. Reprogramming of murine and human somatic cells using a single polycistronic vector. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 157-162.

Chaker, Z., George, C., Petrovska, M., Caron, J.B., Lacube, P., Caille, I., Holzenberger, M., 2016. Hypothalamic neurogenesis persists in the aging brain and is controlled by energy-sensing IGF-I pathway. *Neurobiol Aging* 41, 64-72.

Chaudhry, N., Filbin, M.T., 2007. Myelin-associated inhibitory signaling and strategies to overcome inhibition. *J Cereb Blood Flow Metab* 27, 1096-1107.

Codega, P., Silva-Vargas, V., Paul, A., Maldonado-Soto, A.R., Deleo, A.M., Pastrana, E., Doetsch, F., 2014. Prospective identification and purification of quiescent adult neural stem cells from their in vivo niche. *Neuron* 82, 545-559.

Collin, T., Arvidsson, A., Kokaia, Z., Lindvall, O., 2005. Quantitative analysis of the generation of different striatal neuronal subtypes in the adult brain following excitotoxic injury. *Exp Neurol* 195, 71-80.

Conover, J.C., Notti, R.Q., 2008. The neural stem cell niche. *Cell Tissue Res* 331, 211-224.

Conway, A., Schaffer, D.V., 2014. Biomaterial microenvironments to support the generation of new neurons in the adult brain. *Stem Cells* 32, 1220-1229.

Corti, S., Nizzardo, M., Simone, C., Falcone, M., Donadoni, C., Salani, S., Rizzo, F., Nardini, M., Riboldi, G., Magri, F., Zanetta, C., Faravelli, I., Bresolin, N., Comi, G.P., 2012. Direct reprogramming of human astrocytes into neural stem cells and neurons. *Exp Cell Res* 318, 1528-1541.

Cuevas, P., Gimenez-Gallego, G., Carceller, F., Cuevas, B., Crespo, A., 1993. Single topical application of human recombinant basic fibroblast growth factor (rbFGF) promotes neovascularization in rat cerebral cortex. *Surg Neurol* 39, 380-384.

Dayer, A.G., Cleaver, K.M., Abouantoun, T., Cameron, H.A., 2005. New GABAergic interneurons in the adult neocortex and striatum are generated from different precursors. *J Cell Biol* 168, 415-427.

Ehninger, D., Kempermann, G., 2008. Neurogenesis in the adult hippocampus. *Cell Tissue Res* 331, 243-250.

Eriksson, P.S., Perfilieva, E., Bjork-Eriksson, T., Alborn, A.M., Nordborg, C., Peterson, D.A., Gage, F.H., 1998. Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med* 4, 1313-1317.

Ernst, A., Alkass, K., Bernard, S., Salehpour, M., Perl, S., Tisdale, J., Possnert, G., Druid, H., Frisen, J., 2014. Neurogenesis in the striatum of the adult human brain. *Cell* 156, 1072-1083.

Faiz, M., Sachewsky, N., Gascon, S., Bang, K.W., Morshead, C.M., Nagy, A., 2015. Adult Neural Stem Cells from the Subventricular Zone Give Rise to Reactive Astrocytes in the Cortex after Stroke. *Cell Stem Cell* 17, 624-634.

Fathi, A., Pakzad, M., Taei, A., Brink, T.C., Pirhaji, L., Ruiz, G., Sharif Tabe Bordbar, M., Gourabi, H., Adjaye, J., Baharvand, H., Salekdeh, G.H., 2009. Comparative proteome and transcriptome analyses of embryonic stem cells during embryoid body-based differentiation. *Proteomics* 9, 4859-4870.

Feierstein, C.E., Lazarini, F., Wagner, S., Gabellec, M.M., de Chaumont, F., Olivo-Marin, J.C., Boussin, F.D., Lledo, P.M., Gheusi, G., 2010. Disruption of Adult Neurogenesis in the Olfactory Bulb Affects Social Interaction but not Maternal Behavior. *Front Behav Neurosci* 4, 176.

Font, E., Desfilis, E., Perez-Canellas, M.M., Garcia-Verdugo, J.M., 2001. Neurogenesis and neuronal regeneration in the adult reptilian brain. *Brain Behav Evol* 58, 276-295.

Fowler, C.D., Liu, Y., Ouimet, C., Wang, Z., 2002. The effects of social environment on adult neurogenesis in the female prairie vole. *J Neurobiol* 51, 115-128.

Franklin, K.B.J., Paxinos, G., 2013. Paxinos and Franklin's The mouse brain in stereotaxic coordinates, Fourth edition. ed. Amsterdam: Academic Press, an imprint of Elsevier.

Frielingdorf, H., Schwarz, K., Brundin, P., Mohapel, P., 2004. No evidence for new dopaminergic neurons in the adult mammalian substantia nigra. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 10177-10182.

Friling, S., Andersson, E., Thompson, L.H., Jonsson, M.E., Hebsgaard, J.B., Nanou, E., Alekseenko, Z., Marklund, U., Kjellander, S., Volakakis, N., Hovatta, O., El Manira, A.,

Bjorklund, A., Perlmann, T., Ericson, J., 2009. Efficient production of mesencephalic dopamine neurons by *Lmx1a* expression in embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 7613-7618.

Ganat, Y.M., Silbereis, J., Cave, C., Ngu, H., Anderson, G.M., Ohkubo, Y., Ment, L.R., Vaccarino, F.M., 2006. Early postnatal astroglial cells produce multilineage precursors and neural stem cells in vivo. *J Neurosci* 26, 8609-8621.

Gao, S.Y., Jack, M.M., O'Neill, C., 2012. Towards optimising the production of and expression from polycistronic vectors in embryonic stem cells. *PLoS One* 7, e48668.

Gonzalez-Perez, O., Alvarez-Buylla, A., 2011. Oligodendrogenesis in the subventricular zone and the role of epidermal growth factor. *Brain Res Rev* 67, 147-156.

Gotz, M., Sirko, S., Beckers, J., Irmeler, M., 2015. Reactive astrocytes as neural stem or progenitor cells: In vivo lineage, In vitro potential, and Genome-wide expression analysis. *Glia* 63, 1452-1468.

Gould, E., 2007. How widespread is adult neurogenesis in mammals? *Nat Rev Neurosci* 8, 481-488.

Grealish, S., Diguets, E., Kirkeby, A., Mattsson, B., Heuer, A., Bramoulle, Y., Van Camp, N., Perrier, A.L., Hantraye, P., Bjorklund, A., Parmar, M., 2014. Human ESC-derived dopamine neurons show similar preclinical efficacy and potency to fetal neurons when grafted in a rat model of Parkinson's disease. *Cell Stem Cell* 15, 653-665.

Guerrero-Flores, G.C., L 2011. Dopaminergic Differentiation Potential of Neural Precursor Cells Derived from Embryonic Stem Cells, in: Atwood, C. (Ed.), *Embryonic Stem Cells: The Hormonal Regulation of Pluripotency and Embryogenesis*. InTech.

Guo, W., Patzlaff, N.E., Jobe, E.M., Zhao, X., 2012. Isolation of multipotent neural stem or progenitor cells from both the dentate gyrus and subventricular zone of a single adult mouse. *Nat Protoc* 7, 2005-2012.

Hermann, A., Maisel, M., Wegner, F., Liebau, S., Kim, D.W., Gerlach, M., Schwarz, J., Kim, K.S., Storch, A., 2006. Multipotent neural stem cells from the adult tegmentum with dopaminergic potential develop essential properties of functional neurons. *Stem Cells* 24, 949-964.

Hernandez, G.L., Volpert, O.V., Iniguez, M.A., Lorenzo, E., Martinez-Martinez, S., Grau, R., Fresno, M., Redondo, J.M., 2001. Selective inhibition of vascular endothelial growth factor-

mediated angiogenesis by cyclosporin A: roles of the nuclear factor of activated T cells and cyclooxygenase 2. *J Exp Med* 193, 607-620.

Imayoshi, I., Sakamoto, M., Ohtsuka, T., Takao, K., Miyakawa, T., Yamaguchi, M., Mori, K., Ikeda, T., Itohara, S., Kageyama, R., 2008. Roles of continuous neurogenesis in the structural and functional integrity of the adult forebrain. *Nat Neurosci* 11, 1153-1161.

Jessen, K.R., Mirsky, R., Arthur-Farraj, P., 2015. The Role of Cell Plasticity in Tissue Repair: Adaptive Cellular Reprogramming. *Dev Cell* 34, 613-620.

Jiang, H., Xu, Z., Zhong, P., Ren, Y., Liang, G., Schilling, H.A., Hu, Z., Zhang, Y., Wang, X., Chen, S., Yan, Z., Feng, J., 2015. Cell cycle and p53 gate the direct conversion of human fibroblasts to dopaminergic neurons. *Nat Commun* 6, 10100.

Jin, K., Zhu, Y., Sun, Y., Mao, X.O., Xie, L., Greenberg, D.A., 2002. Vascular endothelial growth factor (VEGF) stimulates neurogenesis in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 11946-11950.

Kaslin, J., Ganz, J., Brand, M., 2008. Proliferation, neurogenesis and regeneration in the non-mammalian vertebrate brain. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 363, 101-122.

Keller, M., Douhard, Q., Baum, M.J., Bakker, J., 2006. Destruction of the main olfactory epithelium reduces female sexual behavior and olfactory investigation in female mice. *Chem Senses* 31, 315-323.

Kempermann, G., 2006. Adult neurogenesis : stem cells and neuronal development in the adult brain. New York: Oxford University Press.

Kermen, F., Sultan, S., Sacquet, J., Mandairon, N., Didier, A., 2010. Consolidation of an olfactory memory trace in the olfactory bulb is required for learning-induced survival of adult-born neurons and long-term memory. *PLoS One* 5, e12118.

Kim, B.K., Kim, S.E., Shim, J.H., Woo, D.H., Gil, J.E., Kim, S.K., Kim, J.H., 2006. Neurogenic effect of vascular endothelial growth factor during germ layer formation of human embryonic stem cells. *FEBS Lett* 580, 5869-5874.

Kirby, E.D., Kuwahara, A.A., Messer, R.L., Wyss-Coray, T., 2015. Adult hippocampal neural stem and progenitor cells regulate the neurogenic niche by secreting VEGF. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112, 4128-4133.

Kizil, C., Kaslin, J., Kroehne, V., Brand, M., 2012. Adult neurogenesis and brain regeneration in zebrafish. *Dev Neurobiol* 72, 429-461.

Kokoeva, M.V., Yin, H., Flier, J.S., 2005. Neurogenesis in the hypothalamus of adult mice: potential role in energy balance. *Science* 310, 679-683.

Kriegstein, A., Alvarez-Buylla, A., 2009. The glial nature of embryonic and adult neural stem cells. *Annu Rev Neurosci* 32, 149-184.

L'Episcopo, F., Tirolo, C., Testa, N., Caniglia, S., Morale, M.C., Serapide, M.F., Pluchino, S., Marchetti, B., 2014. Wnt/beta-catenin signaling is required to rescue midbrain dopaminergic progenitors and promote neurorepair in ageing mouse model of Parkinson's disease. *Stem Cells* 32, 2147-2163.

Licht, T., Keshet, E., 2015. The vascular niche in adult neurogenesis. *Mech Dev* 138 Pt 1, 56-62.

Licht, T., Rothe, G., Kreisel, T., Wolf, B., Benny, O., Rooney, A.G., French-Constant, C., Enikolopov, G., Keshet, E., 2016. VEGF preconditioning leads to stem cell remodeling and attenuates age-related decay of adult hippocampal neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113, E7828-E7836.

Lie, D.C., Dzieczapolski, G., Willhoite, A.R., Kaspar, B.K., Shults, C.W., Gage, F.H., 2002. The adult substantia nigra contains progenitor cells with neurogenic potential. *J Neurosci* 22, 6639-6649.

Lim, M.S., Chang, M.Y., Kim, S.M., Yi, S.H., Suh-Kim, H., Jung, S.J., Kim, M.J., Kim, J.H., Lee, Y.S., Lee, S.Y., Kim, D.W., Lee, S.H., Park, C.H., 2015. Generation of Dopamine Neurons from Rodent Fibroblasts through the Expandable Neural Precursor Cell Stage. *J Biol Chem* 290, 17401-17414.

Lin, W., Metzakopian, E., Mavromatakis, Y.E., Gao, N., Balaskas, N., Sasaki, H., Briscoe, J., Whitsett, J.A., Goulding, M., Kaestner, K.H., Ang, S.L., 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.

Lois, C., Alvarez-Buylla, A., 1993. Proliferating subventricular zone cells in the adult mammalian forebrain can differentiate into neurons and glia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 2074-2077.

Luo, Y., Coskun, V., Liang, A., Yu, J., Cheng, L., Ge, W., Shi, Z., Zhang, K., Li, C., Cui, Y., Lin, H., Luo, D., Wang, J., Lin, C., Dai, Z., Zhu, H., Zhang, J., Liu, J., Liu, H., deVellis, J.,

Horvath, S., Sun, Y.E., Li, S., 2015a. Single-cell transcriptome analyses reveal signals to activate dormant neural stem cells. *Cell* 161, 1175-1186.

Luo, Y., Coskun, V., Liang, A., Yu, J., Cheng, L., Ge, W., Shi, Z., Zhang, K., Li, C., Cui, Y., Lin, H., Luo, D., Wang, J., Lin, C., Dai, Z., Zhu, H., Zhang, J., Liu, J., Liu, H., deVellis, J., Horvath, S., Sun, Y.E., Li, S., 2015b. Single-cell transcriptome analyses reveal signals to activate dormant neural stem cells. *Cell* 161, 1175-1186.

Luzzati, F., De Marchis, S., Fasolo, A., Peretto, P., 2006. Neurogenesis in the caudate nucleus of the adult rabbit. *J Neurosci* 26, 609-621.

Mackay-Sim, A., Rose, J.D., 1986. Removal of the vomeronasal organ impairs lordosis in female hamsters: effect is reversed by luteinising hormone-releasing hormone. *Neuroendocrinology* 42, 489-493.

Magavi, S.S., Leavitt, B.R., Macklis, J.D., 2000. Induction of neurogenesis in the neocortex of adult mice. *Nature* 405, 951-955.

Magnusson, J.P., Goritz, C., Tatarishvili, J., Dias, D.O., Smith, E.M., Lindvall, O., Kokaia, Z., Frisen, J., 2014. A latent neurogenic program in astrocytes regulated by Notch signaling in the mouse. *Science* 346, 237-241.

Mak, G.K., Enwere, E.K., Gregg, C., Pakarainen, T., Poutanen, M., Huhtaniemi, I., Weiss, S., 2007. Male pheromone-stimulated neurogenesis in the adult female brain: possible role in mating behavior. *Nat Neurosci* 10, 1003-1011.

Martinat, C., Bacci, J.J., Leete, T., Kim, J., Vanti, W.B., Newman, A.H., Cha, J.H., Gether, U., Wang, H., 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.

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.

Mfopou, J.K., De Groote, V., Xu, X., Heimberg, H., Bouwens, L., 2007. Sonic hedgehog and other soluble factors from differentiating embryoid bodies inhibit pancreas development. *Stem Cells* 25, 1156-1165.

Mole, D.R., Blancher, C., Copley, R.R., Pollard, P.J., Gleadle, J.M., Ragoussis, J., Ratcliffe, P.J., 2009. Genome-wide association of hypoxia-inducible factor (HIF)-1alpha and HIF-2alpha DNA binding with expression profiling of hypoxia-inducible transcripts. *J Biol Chem* 284, 16767-16775.

Mondragón-Figueroa, G., 2017. Papel de la vía de señalización de Notch en la neurogénesis de la sustancia nigra, Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Cuernavaca, Morelos, p. 55

Morrison, B.E., 2016. Discovery of nigral dopaminergic neurogenesis in adult mice. *Neural Regen Res* 11, 878-881.

Mueller, T., 2012. What is the Thalamus in Zebrafish? *Front Neurosci* 6, 64.

Muzumdar, M.D., Tasic, B., Miyamichi, K., Li, L., Luo, L., 2007. A global double-fluorescent Cre reporter mouse. *Genesis* 45, 593-605.

Nakatani, T., Kumai, M., Mizuhara, E., Minaki, Y., 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.

Nato, G., Caramello, A., Trova, S., Avataneo, V., Rolando, C., Taylor, V., Buffo, A., Peretto, P., Luzzati, F., 2015. Striatal astrocytes produce neuroblasts in an excitotoxic model of Huntington's disease. *Development* 142, 840-845.

Ngangan, A.V., Waring, J.C., Cooke, M.T., Mandrycky, C.J., McDevitt, T.C., 2014. Soluble factors secreted by differentiating embryonic stem cells stimulate exogenous cell proliferation and migration. *Stem Cell Res Ther* 5, 26.

Niu, W., Zang, T., Smith, D.K., Vue, T.Y., Zou, Y., Bachoo, R., Johnson, J.E., Zhang, C.L., 2015. SOX2 reprograms resident astrocytes into neural progenitors in the adult brain. *Stem Cell Reports* 4, 780-794.

Nottebohm, F., 1985. Neuronal replacement in adulthood. *Ann N Y Acad Sci* 457, 143-161.

Nottebohm, F., Liu, W.C., 2010. The origins of vocal learning: New sounds, new circuits, new cells. *Brain Lang* 115, 3-17.

Oboti, L., Schellino, R., Giachino, C., Chamero, P., Pyrski, M., Leinders-Zufall, T., Zufall, F., Fasolo, A., Peretto, P., 2011. Newborn interneurons in the accessory olfactory bulb promote mate recognition in female mice. *Front Neurosci* 5, 113.

Palmer, T.D., Willhoite, A.R., Gage, F.H., 2000. Vascular niche for adult hippocampal neurogenesis. *J Comp Neurol* 425, 479-494.

Paxinos, G., Watson, C., 2005. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, Fifth ed. Amsterdam: Elsevier Academic Press.

Petreau, L., Alvarez-Buylla, A., 2002. Maturation and death of adult-born olfactory bulb granule neurons: role of olfaction. *J Neurosci* 22, 6106-6113.

Pomerantz, J.H., Blau, H.M., 2013. Tumor suppressors: enhancers or suppressors of regeneration? *Development* 140, 2502-2512.

Rafiee, P., Heidemann, J., Ogawa, H., Johnson, N.A., Fisher, P.J., Li, M.S., Otterson, M.F., Johnson, C.P., Binion, D.G., 2004. Cyclosporin A differentially inhibits multiple steps in VEGF induced angiogenesis in human microvascular endothelial cells through altered intracellular signaling. *Cell Commun Signal* 2, 3.

Raponi, E., Agenes, F., Delphin, C., Assard, N., Baudier, J., Legraverend, C., Deloulme, J.C., 2007. S100B expression defines a state in which GFAP-expressing cells lose their neural stem cell potential and acquire a more mature developmental stage. *Glia* 55, 165-177.

Recabal, A., Caprile, T., Garcia-Robles, M.L.A., 2017. Hypothalamic Neurogenesis as an Adaptive Metabolic Mechanism. *Front Neurosci* 11, 190.

Rey, S., Semenza, G.L., 2010. Hypoxia-inducible factor-1-dependent mechanisms of vascularization and vascular remodelling. *Cardiovasc Res* 86, 236-242.

Reyes, J.H., O'Shea, K.S., Wys, N.L., Velkey, J.M., Prieskorn, D.M., Wesolowski, K., Miller, J.M., Altschuler, R.A., 2008. Glutamatergic neuronal differentiation of mouse embryonic stem cells after transient expression of neurogenin 1 and treatment with BDNF and GDNF: in vitro and in vivo studies. *J Neurosci* 28, 12622-12631.

Rivetti di Val Cervo, P., Romanov, R.A., Spigolon, G., Masini, D., Martin-Montanez, E., Toledo, E.M., La Manno, G., Feyder, M., Pifl, C., Ng, Y.H., Sanchez, S.P., Linnarsson, S., Wernig, M., Harkany, T., Fisone, G., Arenas, E., 2017. Induction of functional dopamine neurons from human astrocytes in vitro and mouse astrocytes in a Parkinson's disease model. *Nat Biotechnol* 35, 444-452.

Robel, S., Berninger, B., Gotz, M., 2011. The stem cell potential of glia: lessons from reactive gliosis. *Nat Rev Neurosci* 12, 88-104.

Sachewsky, N., Leeder, R., Xu, W., Rose, K.L., Yu, F., van der Kooy, D., Morshead, C.M., 2014. Primitive neural stem cells in the adult mammalian brain give rise to GFAP-expressing neural stem cells. *Stem Cell Reports* 2, 810-824.

Saito, T.R., Moltz, H., 1986. Sexual behavior in the female rat following removal of the vomeronasal organ. *Physiol Behav* 38, 81-87.

Sanai, N., Nguyen, T., Ihrie, R.A., Mirzadeh, Z., Tsai, H.H., Wong, M., Gupta, N., Berger, M.S., Huang, E., Garcia-Verdugo, J.M., Rowitch, D.H., Alvarez-Buylla, A., 2011. Corridors of migrating neurons in the human brain and their decline during infancy. *Nature* 478, 382-386.

Santilli, G., Lamorte, G., Carlessi, L., Ferrari, D., Rota Nodari, L., Binda, E., Delia, D., Vescovi, A.L., De Filippis, L., 2010. Mild hypoxia enhances proliferation and multipotency of human neural stem cells. *PLoS One* 5, e8575.

Saxe, M.D., Battaglia, F., Wang, J.W., Malleret, G., David, D.J., Monckton, J.E., Garcia, A.D., Sofroniew, M.V., Kandel, E.R., Santarelli, L., Hen, R., Drew, M.R., 2006. Ablation of hippocampal neurogenesis impairs contextual fear conditioning and synaptic plasticity in the dentate gyrus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 17501-17506.

Seo, J.H., Yu, J.H., Suh, H., Kim, M.S., Cho, S.R., 2013. Fibroblast growth factor-2 induced by enriched environment enhances angiogenesis and motor function in chronic hypoxic-ischemic brain injury. *PLoS One* 8, e74405.

Shan, X., Chi, L., Bishop, M., Luo, C., Lien, L., Zhang, Z., Liu, R., 2006. Enhanced de novo neurogenesis and dopaminergic neurogenesis in the substantia nigra of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced Parkinson's disease-like mice. *Stem Cells* 24, 1280-1287.

Shen, Q., Wang, Y., Kokovay, E., Lin, G., Chuang, S.M., Goderie, S.K., Roysam, B., Temple, S., 2008. Adult SVZ stem cells lie in a vascular niche: a quantitative analysis of niche cell-cell interactions. *Cell Stem Cell* 3, 289-300.

Shen, S.W., Duan, C.L., Chen, X.H., Wang, Y.Q., Sun, X., Zhang, Q.W., Cui, H.R., Sun, F.Y., 2016. Neurogenic effect of VEGF is related to increase of astrocytes transdifferentiation into new mature neurons in rat brains after stroke. *Neuropharmacology* 108, 451-461.

Shepherd, G.M., 1994. Discrimination of molecular signals by the olfactory receptor neuron. *Neuron* 13, 771-790.

Shingo, T., Gregg, C., Enwere, E., Fujikawa, H., Hassam, R., Geary, C., Cross, J.C., Weiss, S., 2003. Pregnancy-stimulated neurogenesis in the adult female forebrain mediated by prolactin. *Science* 299, 117-120.

Sorrells, S.F., Paredes, M.F., Cebrian-Silla, A., Sandoval, K., Qi, D., Kelley, K.W., James, D., Mayer, S., Chang, J., Auguste, K.I., Chang, E.F., Gutierrez, A.J., Kriegstein, A.R., Mathern, G.W., Oldham, M.C., Huang, E.J., Garcia-Verdugo, J.M., Yang, Z., Alvarez-Buylla, A., 2018. Human hippocampal neurogenesis drops sharply in children to undetectable levels in adults. *Nature* 555, 377-381.

Spanswick, S.C., Lehmann, H., Sutherland, R.J., 2011. A novel animal model of hippocampal cognitive deficits, slow neurodegeneration, and neuroregeneration. *J Biomed Biotechnol* 2011, 527201.

Steiner, B., Winter, C., Hosman, K., Siebert, E., Kempermann, G., Petrus, D.S., Kupsch, A., 2006. Enriched environment induces cellular plasticity in the adult substantia nigra and improves motor behavior function in the 6-OHDA rat model of Parkinson's disease. *Exp Neurol* 199, 291-300.

Szymczak-Workman, A.L., Vignali, K.M., Vignali, D.A., 2012. Design and construction of 2A peptide-linked multicistronic vectors. *Cold Spring Harb Protoc* 2012, 199-204.

Tanaka, E.M., Ferretti, P., 2009. Considering the evolution of regeneration in the central nervous system. *Nat Rev Neurosci* 10, 713-723.

Taupin, P., 2007. BrdU immunohistochemistry for studying adult neurogenesis: paradigms, pitfalls, limitations, and validation. *Brain Res Rev* 53, 198-214.

Toth, Z.E., Shahar, T., Leker, R., Szalayova, I., Bratincsak, A., Key, S., Lonyai, A., Nemeth, K., Mezey, E., 2007. Sensitive detection of GFP utilizing tyramide signal amplification to overcome gene silencing. *Exp Cell Res* 313, 1943-1950.

Trichas, G., Begbie, J., Srinivas, S., 2008. Use of the viral 2A peptide for bicistronic expression in transgenic mice. *BMC Biol* 6, 40.

Venere, M., Han, Y.G., Bell, R., Song, J.S., Alvarez-Buylla, A., Belloch, R., 2012. Sox1 marks an activated neural stem/progenitor cell in the hippocampus. *Development* 139, 3938-3949.

Wapinski, O.L., Vierbuchen, T., Qu, K., Lee, Q.Y., Chanda, S., Fuentes, D.R., Giresi, P.G., Ng, Y.H., Marro, S., Neff, N.F., Drechsel, D., Martynoga, B., Castro, D.S., Webb, A.E.,

Sudhof, T.C., Brunet, A., Guillemot, F., Chang, H.Y., Wernig, M., 2013. Hierarchical mechanisms for direct reprogramming of fibroblasts to neurons. *Cell* 155, 621-635.

Whitfield, J., Littlewood, T., Soucek, L., 2015. Tamoxifen administration to mice. *Cold Spring Harb Protoc* 2015, 269-271.

Whitman, M.C., Fan, W., Rela, L., Rodriguez-Gil, D.J., Greer, C.A., 2009. Blood vessels form a migratory scaffold in the rostral migratory stream. *J Comp Neurol* 516, 94-104.

Whitman, M.C., Greer, C.A., 2009. Adult neurogenesis and the olfactory system. *Prog Neurobiol* 89, 162-175.

Worlitzer, M.M., Viel, T., Jacobs, A.H., Schwamborn, J.C., 2013. The majority of newly generated cells in the adult mouse substantia nigra express low levels of Doublecortin, but their proliferation is unaffected by 6-OHDA-induced nigral lesion or Minocycline-mediated inhibition of neuroinflammation. *Eur J Neurosci* 38, 2684-2692.

Xu, Z., Chu, X., Jiang, H., Schilling, H., Chen, S., Feng, J., 2017. Induced dopaminergic neurons: A new promise for Parkinson's disease. *Redox Biol* 11, 606-612.

Yassa, M.A., Mattfeld, A.T., Stark, S.M., Stark, C.E., 2011. Age-related memory deficits linked to circuit-specific disruptions in the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 8873-8878.

Zhao, M., Momma, S., Delfani, K., Carlen, M., Cassidy, R.M., Johansson, C.B., Brismar, H., Shupliakov, O., Frisen, J., Janson, A.M., 2003. Evidence for neurogenesis in the adult mammalian substantia nigra. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 7925-7930.

Zupanc, G.K., Ott, R., 1999. Cell proliferation after lesions in the cerebellum of adult teleost fish: time course, origin, and type of new cells produced. *Exp Neurol* 160, 78-87.

ANEXOS

A. FIGURAS SUPLEMENTARIAS

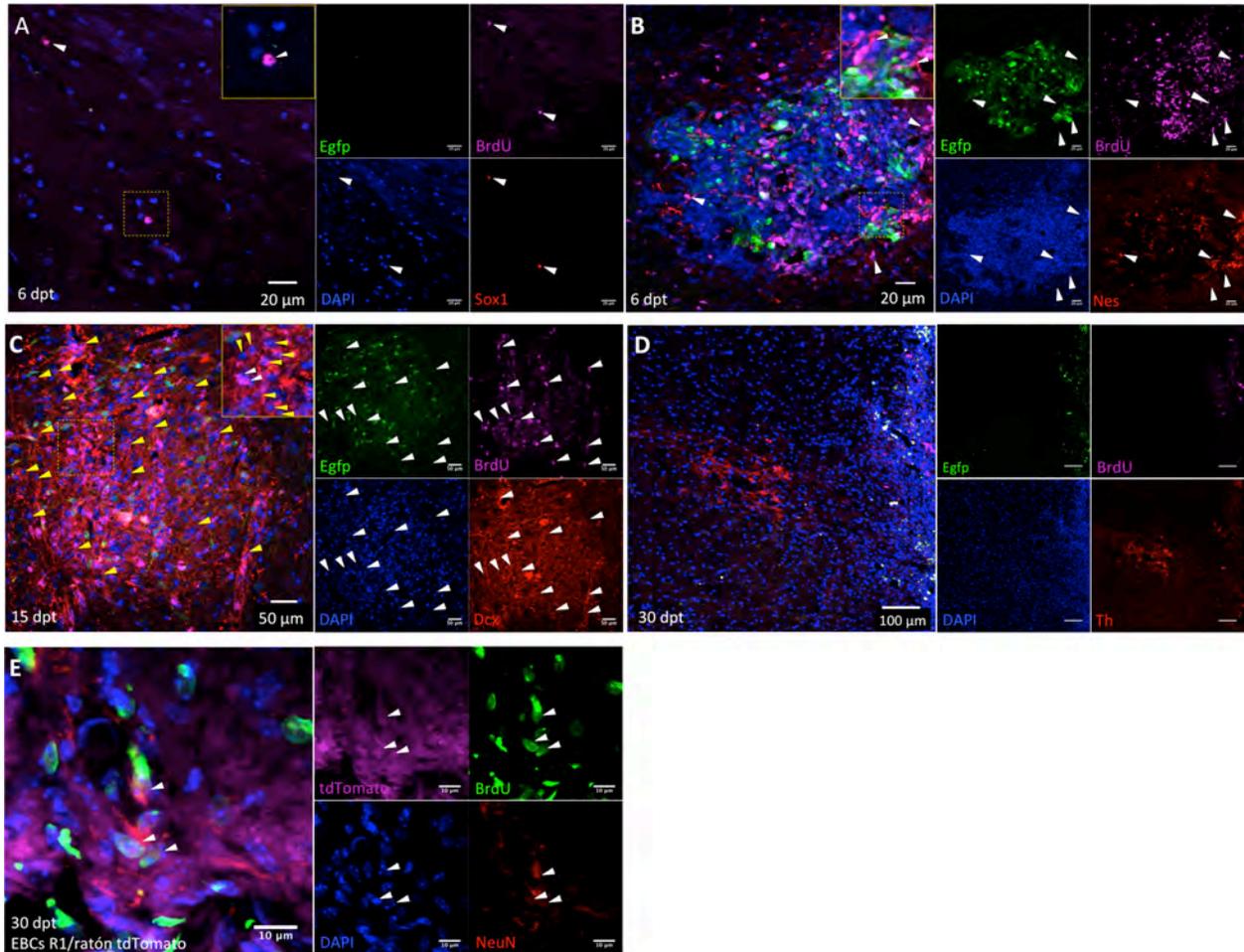


Figura S1. Neurogenesis en la SN del ratón adulto después del trasplante de EBCs. Los EBs fueron generados a partir de células R1B5 ($Egfp^{+}$) y trasplantadas a la SN de ratones silvestres CD1. Proyecciones panorámicas confocales que muestran células $BrdU^{+}$ (puntas de flecha blancas) comarcadas con: (A) Sox1, (B) Nes, (C) Dcx y (D) Th. En (C) las puntas de flecha blancas indican células $BrdU^{+}$ comarcadas con Dcx, mientras que las amarillas indican aquellas células solamente marcadas con Dcx. (E) Células $NeuN^{+}/BrdU^{+}/tdTomato^{+}$ (cabezas de flecha blancas) identificadas en la SN de ratones tdTomato, 30 días después del trasplante de EBCs R1.

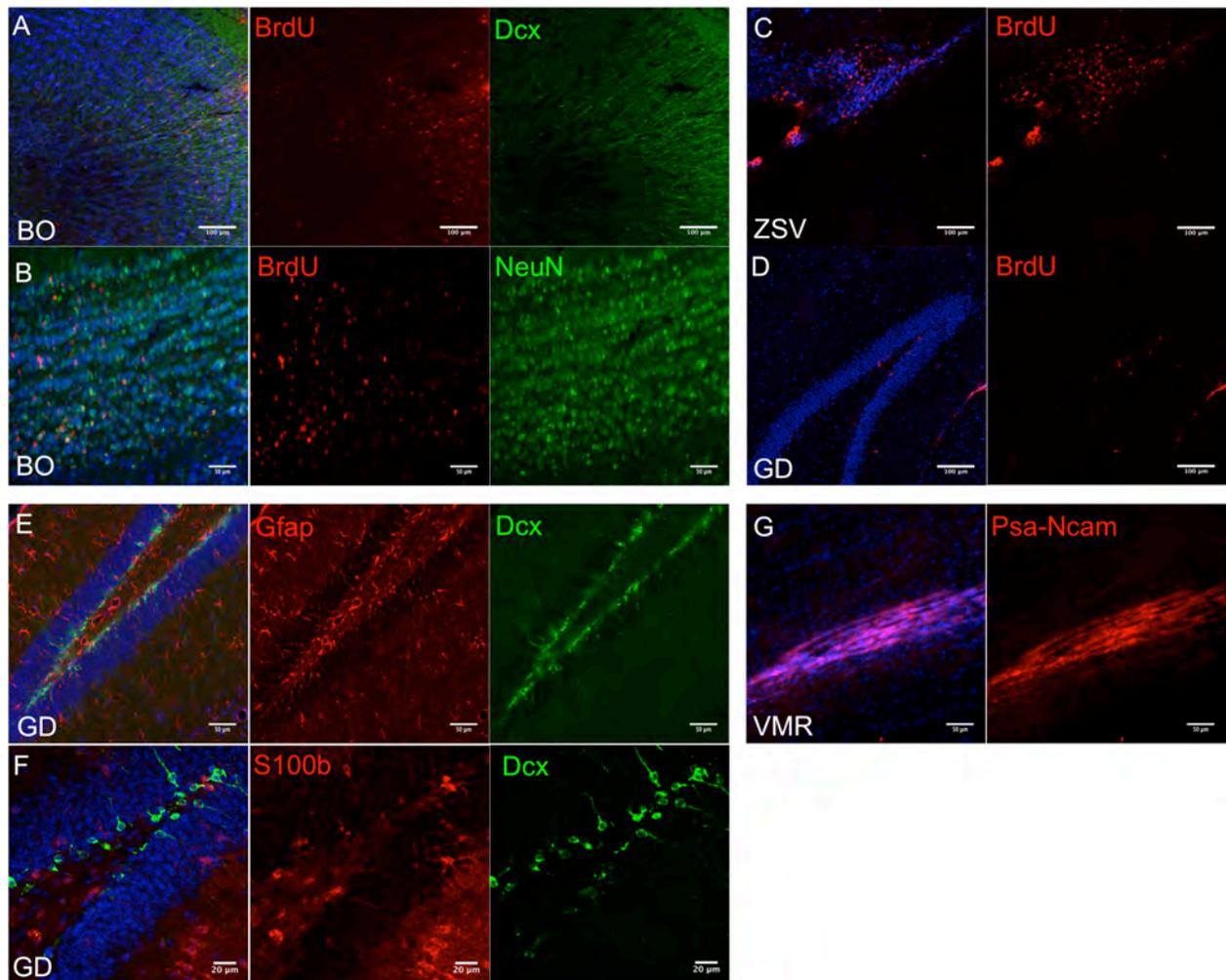


Figura S2. Inmunomarcaje contra BrdU, marcadores gliales (Gfap, S100b) y marcadores neuronales (Dcx, Psa-Ncam, NeuN) en las zonas neurogénicas típicas. (A,B) bulbo olfatorio (BO), (C) zona subventricular (ZSV), (D-F) giro dentado (GD) y vía migratoria rostral (VMR).

B. TABLAS

Tabla I. Células marcadas con BrdU por mm² (media±EEM) en la SN trasplantada de ratas adultas

Periodo Post-trasplante	Rata	
	SN contralateral	SN trasplantada
2 hpt (n=2)	1.23, 3.70	39.56, 49.45
24 hpt (n=3)	3.29±0.41	45.74±8.56
48 hpt (n=4)	4.32±1.28	124.56±19.58
72 hpt (n=4)	4.63±1.05	110.04±20.05
6 dpt (n=5)	11.20±1.21	167.68±18.12
15 dpt (n= 3)	13.51±2.55	198.20±3.17
30 dpt (n=2)	1.63, 1.63	12.36, 29.67

Las células marcadas con BrdU fueron contadas a diferentes periodos post-trasplante (ver Materiales y métodos). La SN contralateral fue usada como control para cada punto. El número de sujetos (n) por grupo esta especificado entre paréntesis.

Tabla II. Células BrdU positivas por mm² (media±EEM) comarcadas con marcadores neurales, neuronales y gliales en la SN trasplantada de ratas adultas.

Periodo Post-trasplante	Marcadores celulares	Número de células (% células BrdU ⁺)
2 hpt (n=2)	Sox2 ⁺ /BrdU ⁺	35.85 (84.72%)
	Sox2 ⁺ /BrdU ⁻	80.98
24 hpt (n=3)	Sox2 ⁺ /BrdU ⁺	41.62±6.3 (93.15±3.43%)
	Sox2 ⁺ /BrdU ⁻	91.08±20.81
48 hpt (n=4)	Sox2 ⁺ /BrdU ⁺	89.09±13.66 (70.12±7.17%)
	Sox2 ⁺ /BrdU ⁻	146.24±11.45
72 hpt (n=4)	Sox2 ⁺ /BrdU ⁺	61.2±6.26 (58.87±4.75%)
	Sox2 ⁺ /BrdU ⁻	130.44± 24.79
6 dpt (n=5)	Sox2 ⁺ /BrdU ⁺	68.85±14.18 (46.08±5.99%)
	Sox2 ⁺ /BrdU ⁻	233.2±46.27
15 dpt (n=3)	Sox2 ⁺ /BrdU ⁺	12.71±4.75 (8.87±4.87%)
	Sox2 ⁺ /BrdU ⁻	7.24±4.64
6 dpt (n=3)	Nes ⁺ /BrdU ⁺	30.91±6.18 (28.84±9.61%)
	Nes ⁺ /BrdU ⁻	90.25±8.65
6 dpt (n=4)	Dcx ⁺ /BrdU ⁺	68.92±6.02 (48.73±6.65%)
	Dcx ⁺ /BrdU ⁻	106.33±11.95
15 dpt (n=3)	Dcx ⁺ /BrdU ⁺	91.84±23.95 (55.83±4.64%)
	Dcx ⁺ /BrdU ⁻	175.21±44.06
6 dpt (n=3)	Gfap ⁺ /BrdU ⁺	39.56±2.47 (17.46±0.60%)
	Gfap ⁺ /BrdU ⁻	77.48±23.56
15 dpt (n=3)	Gfap ⁺ /BrdU ⁺	51.1±4.36 (30.11±3.66%)
	Gfap ⁺ /BrdU ⁻	97.26±27.98
6 dpt (n=4)	NeuN ⁺ /BrdU ⁺	4.94±0.8 (3.05±1.27%)
15 dpt (n=3)		2.47±0 (1.42±0.85%)
30 dpt (n=2)		8.65 (41.87%)
30 dpt (n=2)	Th ⁺ /BrdU ⁺	0%

1

Además de determinar las células BrdU⁺ comarcadas con alguno de los marcadores celulares indicados, en la tabla también se muestra el número de células positivas para cada marcador pero negativas a BrdU. El número de sujetos (n) por grupo y el porcentaje (media±EEM) de células comarcadas con respecto al total de BrdU⁺ se especifican entre paréntesis.

Tabla III. Células marcadas con BrdU por mm² (media±EEM) en la SN trasplantada de ratones adultos

Periodo Post-trasplante	Ratón		
	Vehículo	SN contralateral	SN trasplantada
6 dpt	3.98±1.43 (n=3)	0.09±0.03 (n=5)	77.67±7.2 (n=10)
15 dpt	4.32±0.61 (n=3)	0.29±0.02 (n=4)	104.4±18.85 (n=4)
30 dpt	ND	ND	7.21±2.71 (n=7)

Las células marcadas con BrdU fueron contadas a diferentes periodos post-trasplante (ver Materiales y métodos). La SN contralateral y la SN inyectada con medio Optimem (Vehículo) fueron usadas como controles. El número de sujetos (n) por grupo esta especificado entre paréntesis. ND, no determinado

Tabla IV. Número de células positivas para BrdU por mm² (media±EEM) comarcadas con marcadores neurales y neuronales en la SN trasplantada de la SN del ratón adulto

Periodo Post-trasplante	Marcadores celulares	Número de células (porcentaje de células BrdU⁺)
6 dpt (n=3)	Sox1 ⁺ /BrdU ⁺	20.71±5.18 (35.61±0.89%)
	Sox1 ⁺ /BrdU ⁻	36.47±11.17
6 dpt (n=4)	Nes ⁺ /BrdU ⁺	21.26±4.39 (26.66±6.31%)
	Nes ⁺ /BrdU ⁻	37.09±6.72
15 dpt (n=4)	Dcx ⁺ /BrdU ⁺	58.11±8.47 (47.13±2.87%)
	Dcx ⁺ /BrdU ⁻	274.48±25.77
30 dpt (n=3)	NeuN ⁺ /BrdU ⁺	2.47±0.9 (33.33±4.81%)
	Th ⁺ /BrdU ⁺	0%

Además de determinar las células BrdU⁺ comarcadas con alguno de los marcadores celulares indicados, en la tabla también se muestra el número de células positivas para cada marcador pero negativas a BrdU. El número de sujetos (n) por grupo y el porcentaje (media±EEM) de células comarcadas con respecto al total de BrdU⁺ se especifican entre paréntesis.

Tabla V. Cuantificación de las neuroesferas encontradas en el cultivo primario de la ZSV a los 13 DIV con tratamiento de 3, 6 o 13 DIV con DFX.

Número de neuroesferas de la ZSV (conteo realizado a los 13 DIV)				
Tratamiento	Desferroxiamina (μM)			
	0	100	200	400
3 DIV con DFX + 10 DIV	143	141	69	20
6 DIV con DFX + 7 DIV	176	158	89	8
13 DIV con DFX	171	96	2	0

Tabla VI. Cuantificación de los tipos celulares y agregados celulares encontrados en el cultivo primario de la SN a los 14 DIV con tratamiento de 3, 6 o 14 DIV con DFX.

Número de células y neuroesferas de la SN (conteo realizado a los 14 DIV)		
Tratamiento	Células individuales o en grupo	Neuroesferas
DFX 0 μM		
14 días	108	2
	134	4
	123	0
DFX 100 μM		
3 días	79	0
6 días	65	0
14 días	50	2
DFX 200 μM		
3 días	60	0
6 días	36	0
14 días	5	1
DFX 400 μM		
3 días	46	0
6 días	63	1
14 días	0	0

Tabla VII. Secuencias de los oligos diseñados para generar los vectores de expresión.

Uso de los oligos	Oligo izquierda (5'-3')	Oligo derecha (5'-3')
1. Síntesis de fragmento PGK y sitios de restricción	CGT GGA TCC TCG AGA ATT CTA CCG GGT AG	GCG CCT ACC GGT GGA TGT GGA ATG
2. Secuenciación de TtRMPVIR modificado	GGT CAA GCC CTT TGT ACA CCC TAA G	CGC GAA GGG GCC ACC AAA G
3. Síntesis de Lmx1a con sitios BamHI	CGA GGA TCC ACC ATG TTG GAC G	GCC GGA TCC TCA AGA GGT GAA ATA G
4. Síntesis de Foxa2 con sitios BamHI-XhoI	CTA GGA TCC ACC ATG CTG GGA GCC GTG AAG	CCG GGC TCG AGT TAG GAT GAG TTC ATA ATA GGC C
5. Síntesis de poli-A con sitios ClaI	GTT AAT CGA TGC TCG CTG ATC AGC CTC G	CGT AAT CGA TCC CCA GCT GGT TCT TTC C
6. Síntesis de Lmx1a con sitios BamHI-AccIII	CGA GGA TCC ACC ATG TTG GAC G	CTT TCC GGA GCC AGA GGT GAA ATA GG
7. Síntesis de Foxa2 con sitios	GTA CCT AGG ATG CTG GGA	GCC TCC GGA ACC GGA TGA

AvrII- AccIII	GCC GTG AAG	GTT CAT AAT AGG
8.Síntesis de Cherry con sitios AvrII-XhoI	CTA CCT AGG ATG GCC ACA ACC ATG GTG	GCC ACT CGA GTT ACT TGT ACA GCT CGT C
9.Adaptador EcoRI- BglIII	AAT TGG CGC GCC	GAT CGG CGC GCC
10. Adaptador AccIII-T2A-AvrII	CCG GAG AGG GCA GAG GAA GTC TGC TAA CAT GCG GTG ACG TCG AGG AGA ATC CTG GCC	CTA GGG CCA GGA TTC TCC TCG ACG TCA CCG CAT GTT AGC AGA CTT CCT CTG CCC TCT
11. Adaptador AccIII-P2A-AvrII	CCG GAG CCA CCA ACT TCA GCC TGC TGA AGC AGG CCG GCG ACG TCG AGG AAA ACC CCG GCC	CTA GGG CCG GGG TTT TCC TCG ACG TCG CCG GCC TGC TTC AGC AGG CTG AAG TTG GTG GCT
12.Secuenciación de PB-Tt-Lmx1a-pA	CCC TAG AAA GAT AGT CTG CGT AAA ATT GAC	
13.Secuenciación de policistrónico 1	GCC TAT ATA AGC AGA GCT CGT TTA G	

14.Secuenciación de policistrónico 2	CAA CTC TGA TCC CTT CCG ACA G	
15.Secuenciación de policistrónico 3	CTT CAA GTA GTC GGG GAT GTC G	

C. Medios y soluciones

- a) Medio STO (Medio DMEM suplementado con 7% de suero fetal bovino y glutamax 1X).
- b) Medio M15 (Medio DMEM suplementado con 15% de suero fetal bovino, piruvato de sodio 1 mM, glutamax 1X, aminoácidos no esenciales 0.1 mM, 2- mercaptoetanol 0.1 mM de Gibco).
- c) Medio para neuroesferas [DMEM/F12 suplementado con insulina 25 µg/mL (Gibco), glutamax 1X (ThermoFisher Scientific), transferrina 100 µg/mL, progesterona 20 nM, putrescina 60 µM, selenita de sodio 30 nM y heparina 2 µg/mL (SIGMA)] adicionado con Fgf-2 y Egf (20 ng/mL; Peprotech).
- d) Medio N2B27 (100 mL):
 - 1) DMEM/F12 + N2 (25mL): N2 (1 mL) y DMEM/F12 (99 mL)
 - 2) Medio neurobasal + B27 (25 mL): B27 (2 mL), L-glutamina (1 mL) y medio neurobasal (98 mL)
 - 3) β-mercaptoetanol (50 µL)
- e) Solución de digestión [NaCl 124 mM, KCl 5 mM, MgCl₂ 3.2 mM, CaCl₂ 0.1 mM, NaHCO₃ 26 mM, D-glucosa 10 mM, ácido kinurénico 0.2 mg/mL, hialuronidasa tipo IV 0.67 mg/mL (SIGMA) y tripsina 1.33 mg/mL (ThermoFisher Scientific)].
- f) Medio suplementado para células AD293T (Medio DMEM suplementado con 7% suero fetal bovino, 1% piruvato y 1% GPS)
- g) Medio de congelación 2X (Medio DMEM 60%, 20% suero fetal bovino y 20% DMSO)
- h) Medio de transfección (Medio DMEM 92%, 7% suero fetal bovino y 1% piruvato)
- i) PEI 10X. Se disuelve PEI lineal de 25kDa (#cat. 23966-2, Polysciences) a 10 mg/mL en agua Mill-Q a 80°C. Se almacena en alícuotas a -20°C.
- j) PEI 1X.
 - 1) Se incuba una alícuota de PEI 10X a 80 °C hasta disolver su contenido.
 - 2) La alícuota se diluye en agua Milli-Q en una proporción 1:9.
 - 3) Se ajusta el pH a 7.2.
 - 4) Se filtra mediante una membrana de 0.22 µm.
 - 5) Se almacena en alícuotas de 1 mL a -20°C. La alícuota a usar se guarda a 4°C.
- k) Tripsina 0.25%. En campana, se mezclan 1 mL de tripsina al 2.5% con 9 mL de Verseno.

- l) PB 0.2 M pH 7.2 (1L): fosfato dibásico de sodio anhidro 20.4 g y fosfato monobásico de sodio monohidratado 7.7 g
- m) PBS 0.1 M pH 7.2 (1L): fosfato dibásico de sodio anhidro 10.2 g, fosfato monobásico de sodio monohidratado 3.85 g y cloruro de sodio 9 g
- n) Paraformaldehído 4% (PFA 4%; 1L): 40 g de paraformaldehído, 500 mL de PB 0.2M y 500 mL de agua destilada. Calentar el agua destilada a 65°C y agregar el paraformaldehído con agitación constante. Agregar 3-5 gotas de NaOH 1N para disolver, dejar enfriar, filtrar y agregar el PB 0.2M.
- o) TBS 0.05M pH 7.6 (1L): Tris-HCl 6.06 g, Tris-base 1.39 g y cloruro de sodio 8.5 g
- p) Sacarosa 30% (50 mL): sacarosa 15 g y aforar con PBS 0.1M
- q) Anticongelante (100 mL): etilenglicol 25 mL, glicerina 25 mL y PBS o TBS 50 mL
- r) Solución de montaje para rebanas de cerebro (50 mL): glicerol 25 mL y NaHCO₃ 0.1M pH 9.0 25 mL
- s) Buffer de carga (5mL): 0.25% azul de bromofenol, 30% glicerol y agua

D. Protocolos

- **Formación de cuerpos embrioides (EBs)**

1. Preparación de la monocapa de células alimentadoras (feeders)

Antes de comenzar el cultivo se prepara una solución de gelatina de porcino al 0.1% y enseguida se agregan 4 mL a una caja de 10 cm de diámetro, y 2 mL a una caja de 6 cm de diámetro; las cajas se dejan dentro de la campana de seguridad a temperatura ambiente, por al menos 15 minutos antes de comenzar el cultivo. Posteriormente, se descongela una alícuota de 1×10^6 células alimentadoras (MEFs mitomizados) por cada caja de 6 cm de diámetro. Se coloca 1 mL de medio STO en un tubo Falcon (Corning) de 15 mL y enseguida se agregan las células de manera cuidadosa. Se centrifuga durante 4 minutos a 1000 rpm, se aspira el sobrenadante y se resuspenden las células en 1 mL de medio STO. Por último, se colocan las células en las cajas de 6 cm de diámetro y se adicionan 4 mL de medio STO, posteriormente se llevan a incubar a 37°C durante 24 hrs.

2. Cultivo de ESCs sobre la monocapa de células alimentadoras

Descongelar una alícuota de ESCs de la línea celular R1B5 (Egfp⁺) o R1 y sembrar 1×10^6 células por caja de 6 cm de diámetro en medio M15.

3. Cambio de medio a las ESCs sobre monocapa de células alimentadoras

Aspirar cuidadosamente por la orilla todo el medio con una pipeta Pasteur y adicionar 4 mL de medio M15 nuevo.

4. Subcultivo de ESCs a caja de 10 cm sin células alimentadoras

Aspirar cuidadosamente por la orilla todo el medio con una pipeta Pasteur y lavar 3 veces con PBS 1X. Para disgregar las células, adicionar 1 mL de tripsina al 0.25% e incubar durante 3-4 min a 37°C. Posteriormente, añadir 2 mL de medio M15 para inactivar la tripsina y pasar las células a un tubo de 15 mL para centrifugarlas durante 4 min a 1000 rpm. Finalmente, sembrar en una caja de 10 cm de diámetro con 10 mL de medio M15 y agregar 10 μ L (1000 U) del factor inhibidor de leucemia (LIF; Chemicon). Incubar a 37°C durante 24 hrs.

5. Cambio de medio a las ESCs con adición de LIF.

Aspirar cuidadosamente por la orilla todo el medio con una pipeta Pasteur y adicionar 10 mL de medio M15 fresco más 10 μ L de LIF.

6. Formación de Cuerpos Embrioides (EBs).

Aspirar cuidadosamente por la orilla todo el medio con una pipeta Pasteur y lavar tres veces con PBS 1X, adicionar 1 mL de tripsina al 0.25% e incubar durante 3-4 min a 37°C. Posteriormente, añadir 5 mL de medio M15 para inactivar la tripsina y pasar las células a un tubo de 15 mL para centrifugarlas durante 4 min a 1000 rpm. Para realizar el conteo de las células, tomar 10 μ L de la suspensión celular y 10 μ L de azul de tripano, mezclar en un tubo de 500 μ L y se tomar 10 μ L para contar en cámara de Neubauer. Después de centrifugar, aspirar el sobrenadante y agregar medio M15, la cantidad necesaria para ajustar la concentración de células deseada. Finalmente, sembrar 500 mil células por caja en cajas bacteriológicas de 10 cm de diámetro. Incubar a 37°C durante 24 hrs.

7. Cambio de medio a los EBs.

Cuidadosamente y sin hacer burbujas, transferir los EBs con una pipeta de 25 mL a un tubo de 50 mL y dejar asentar por alrededor de 5 minutos. Posteriormente, aspirar el medio sin llegar hasta el fondo del tubo y se agregar 5 mL de medio M15 fresco. Agitar suavemente el tubo y regresar los EBs a la caja por decantación.

8. Trasplante de EBs de cuatro días. En esta etapa del cultivo las células de EBs están listas para utilizarse en experimentación.

- **Cultivo primario de cerebro de ratón adulto (SN, ZSV y pAq)**

1. Sacrificar los ratones por sobredosis de avertina al 2.5% (15 μ L/kg de peso) y obtener las cabezas mediante decapitación.

2. En condiciones asépticas, extraer cuidadosamente los cráneos y colocarlos en un tubo Falcon de 50 mL con 5 mL de PBS 1X-GPS 1%.

3. Para disecar el cerebro, colocar el cráneo en una caja de 6 cm de diámetro con 4 mL de medio DMEM/F12 con hepes. Extraer el cerebro de la cavidad craneana y colocar en una caja nueva con medio, esto para lavar los residuos de sangre y retirar las meninges. Pasar el cerebro a otra caja y colocar bajo el estereoscopio en una vista ventral. Primero, se procede a disecar la SN haciendo un corte coronal en la parte posterior del hipotálamo y un segundo corte un milímetro anterior al

cerebelo. La SN se encuentra en la región ventral del corte obtenido con forma de media luna. Una vez que se obtiene la SN, se puede observar la zona pAq justo en la parte central del corte. Para obtenerla se realiza una incisión circular alrededor del acueducto. Finalmente se disecciona la ZSV, haciendo un corte coronal un milímetro por delante del quiasma óptico y justo en él. La ZSV se encuentra rodeando los ventrículos laterales, por lo que se corta toda la periferia del ventrículo para obtenerla.

4. Posteriormente, se colocan los tejidos disecados dentro de cajas de 35 mm de diámetro con medio DMEM/F12 con Hepes y se llevan a la campana de flujo laminar. Retirar el medio por los bordes y lavar 3 veces con PBS 1X-GPS 1%.

5. Con un bisturí, hacer fragmentos pequeños del tejido (1 mm) y transferirlos a un tubo Falcon de 15 mL con 3 mL de solución de digestión e incubar a 37°C durante 40 minutos agitando cada 15 minutos.

6. Añadir una solución de inhibidor de tripsina (1 mg/mL; SIGMA) y disgregar el tejido suavemente con pipeta evitando hacer burbujas. Filtrar la suspensión celular a través de un tamiz celular de nylon con apertura de poro de 70 μ M (BD Falcon) y centrifugar a 1500 rpm durante 7 minutos.

7. Aspirar el sobrenadante y resuspender el paquete celular en 1 mL del medio a elegir dependiendo del cultivo celular.

- **Cultivo de neuroesferas (SN, ZSV y pAq)**

1. Llegar hasta el paso 7 del protocolo de cultivo primario de cerebro adulto.

2. Cultivar las células en medio para neuroesferas suplementado con 20 ng de Fgf-2 y Egf, cambiar la mitad del medio cada tercer día. Usar cajas de cultivo de baja adherencia para que se formen los agregados en suspensión.

3. Evaluar la generación de neuroesferas de la ZSV y zona pAq a los siete días de iniciado el cultivo, para la SN evaluar a partir del día quince.

- **Cultivo de células de la sustancia nigra en presencia de factores solubles secretados por células de cuerpos embrioides (Vegf + Fgf-2)**

1. Llegar hasta el paso 7 del protocolo de cultivo primario de cerebro adulto.
2. Preparar en un tubo una mezcla de hidrogel Puramatrix (BD) al 0.15% (solución stock 1%) en una proporción 1:1 con los factores de crecimiento Vegf y Fgf-2, de tal manera que se embeban 10 ng/ μ L de cada factor.
3. Colocar 1 μ L de la mezcla anterior en cada pozo de una microplaca de cultivo de baja adherencia (24 pozos) y dejar asentar por 30 min. Pasado este tiempo, agregar 50 μ L de medio para inducir la polimerización del hidrogel.
4. Sembrar 5×10^5 células por pozo y cultivar durante 12-15 días a 37°C en incubadora (5% CO₂-95%).

- **Inmunofluorescencia sobre caja de cultivo**

1. Aspirar el medio de cultivo y lavar con PBS 1X, posteriormente fijar las células con PFA 4% durante 15 min.
2. Retirar el PFA y lavar una vez con PBS durante 5 min.
3. Permeabilizar las células con una solución de tritón al 0.1% en PBS durante 10 min.
4. Lavar dos veces con PBS durante 5 min.
5. Bloquear con una solución de suero al 10% y tritón al 0.1% en TBS durante 30 min.
6. Incubar en la solución de anticuerpo primario con agitación a 4°C durante toda la noche.
7. Lavar dos veces con PBS durante 5 min.
8. Incubar en la solución de anticuerpo secundario a temperatura ambiente durante dos horas.
9. Lavar dos veces con PBS durante 5 min.
10. Teñir núcleos con una solución de DAPI 1:10,000 durante 10 min.
11. Lavar dos veces con PBS durante 5 min y agregar la solución de montaje Prolong Gold (ThermoFisher Scientific).

- **Inmunofluorescencia contra BrdU en rebanadas de cerebro**

Después de realizar la perfusión intracardiaca de los sujetos experimentales, los cerebros fueron removidos y criopreservados en una solución de sacarosa al 30%. Posteriormente, se realizaron cortes coronales de 30 μm en criostato, los cuales fueron almacenados en una solución anticongelante (etilenglicol 25%, glicerol 25% y PBS 0.1M 50%) hasta la realización de los inmunomarcajes.

1. Lavar con TBS (3 x 5 min)
2. Incubar en una solución de tritón 10x (1%) y H_2O_2 (0.3%) por 15 min
3. Incubar en HCl 1N (37°C) por 30 min
4. Lavar con TBS (1 x 5 min)
5. Incubar en borato de sodio (0.1M pH 8.5) 10 min a temperatura ambiente (TA)
6. Lavar con TBS (1 x 10 min)
7. Incubar en recuperador de antígenos (Retriever; Bio SB) a 65°C por 30 min
8. Incubar en retriever a TA por 15 min
9. Lavar con TBS (3 x 5 min)
10. Incubar en una solución de suero de burro (10%) y tritón 10x (0.1%) por 30 min a TA
11. Incubar en la solución de anticuerpo primario Anti-BrdU 1:100 (ratón) en suero (1%) y tritón 10x (0.1%) durante toda la noche a 4°C
12. Lavar con TBS (3 x 5 min)
13. Incubar en la solución de anticuerpo secundario Alexa 647 anti-ratón 1:1250 en suero (2%) y tritón 10x (2%) a TA por 2 h
14. Lavar con TBS (3 x 10 min)
15. Teñir núcleos con una solución de DAPI 1:10,000 por 15 min
16. Lavar con TBS (3 x 5 min)
17. Montar las rebandas en portaobjetos y cubrir con Prolong Gold o Vectashield o Glicerol-TBS

NOTA: Para realizar algún marcaje contra otro antígeno se omiten los pasos 3-5

- **Transfección de células de mamífero mediante PEI (polietilenimina) lineal**

1. Un día antes de la transfección, se siembran las células a utilizar en cajas de 35 mm, las suficientes para que se tenga una densidad celular de 50-70% el día de la transfección.
2. El día de la transfección, se vierte en un tubo Eppendorf estéril al menos 1 μg del plásmido o plásmidos a transfectar. Como control de transfección, se puede adicionar pGFP (con expresión constitutiva de GFP) en una proporción 1:20 de la cantidad total de plásmido o plásmidos de interés a transfectar. Se adiciona medio DMEM (sin suplementar) hasta tener un volumen final de 100 μL (equivalente a 1:20 del volumen de medio ocupado en cajas de 35 mm). Mezclar por pipeteo.
3. En un segundo tubo Eppendorf, se vierte PEI IX a un volumen de 3 μL por cada μg de plásmido. Se adiciona medio DMEM (sin suplementar) hasta tener un volumen final de 100 μL . Mezclar por pipeteo.
4. Se mezcla el contenido de los 2 tubos, mediante pipeteo y la solución se incuba a temperatura ambiente por 15 minutos.
5. El medio de la(s) caja(s) de 35 mm a utilizar es aspirado con la bomba de vacío. Se adiciona 1 mL de PBS IX y se mueve suavemente para lavar .
6. Se aspira el medio de la(s) caja(s) y se vierten 800-1000 μL de medio de transfección por caja.
7. Se adiciona la solución de PEI:ADN en la(s) caja(s) mediante goteo.
8. Se mantiene en incubadora por 4 horas al menos o durante toda una noche (overnight).
9. Se aspira el medio de transfección mediante bomba de vacío y se vierten 2 mL de medio de proliferación o medio de proliferación reducida.
10. Se evalúa la eficiencia de transfección de 24 a 48 horas después del procedimiento.