



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

EVALUACIÓN DE LA *SUBSTANTIA NIGRA PARS COMPACTA* COMO
SITIO PERMISIVO A LA DIFERENCIACIÓN DOPAMINÉRGICA

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS
PRESENTA:

BIÓL. OMAR COLLAZO NAVARRETE

Director de tesis

DRA. MAGDALENA GUERRA CRESPO
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

COMITÉ TUTOR

DR. LUIS COVARRUBIAS ROBLES, INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA, UNAM
DR. ARTURO HERNÁNDEZ CRUZ, INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR, UNAM
DR. RENÉ DRUCKER COLÍN INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR, UNAM

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., SEPTIEMBRE DE 2020



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.

**Dedico este trabajo a Hanna, Kithze, Gerardin, Yoyis, Prisci, Edson,
Josuesin, Hazel, Mayi, Aisha, Evans, Pauwi, Alexa, César, Antonio,
Karla Aimé y Nataly; esperando les sirva como inspiración para
seguir sus estudios.**

A mis Abuelos y a mis Padres.

A Chriss y Alan.

El presente estudio fue financiado por la Dirección General de Asuntos de Personal Académico a través del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) con los proyectos IN207116 y IN211419 y por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) con el proyecto A1-S-10064, FOINS1723 y la beca de doctorado No. 263466 Otorgada a Omar Collazo Navarrete CVU: 407894.

Agradecimientos académicos.

Al Dr. Luis por darme la oportunidad de trabajar en su laboratorio y proporcionarme el apoyo académico y financiero para poder llevar a término el proyecto. Además, por guiar mi formación desde el establecimiento del proyecto hasta la escritura del artículo.

A la Dra. Magdalena Guerra Crespo quien me motivara a iniciar éste y otros proyectos; gracias por la confianza brindada y por permitirme participar también en la formación de otros recursos humanos.

Al Dr. René Drucker por permitirme iniciar mi carrera en el ámbito científico y haberme motivado para presentar un examen de ingreso al posgrado.

Al Dr. David Hernández, jefe del Laboratorio de Producción de Roedores Transgénicos por el apoyo y dedicación en la realización del presente estudio.

A la Dra. Gilda Guerrero Flores por el apoyo y dedicación en la realización del presente estudio. Por las observaciones y críticas realizadas a la elaboración del artículo y la tesis.

A la M. en C. Concepción Valencia (IBT) a la Biól. Marcela Palomero Rivero (IFC), a la Biól. Diana Millán Aldaco (IFC) y a Francisco Pérez Eugenio por el apoyo técnico brindado a la realización del presente trabajo.

Al M. en C. Andrés Saraleguí y al Dr. Jaime Arturo Pimentel del Laboratorio Nacional de Microscopía Avanzada por el apoyo brindado para la captura y análisis de imágenes presentadas en este estudio.

A la M.V.Z. Claudia Rivera Cerecedo del Bioterio del Instituto de Fisiología Celular, por proporcionar los animales necesarios para los experimentos realizados en el presente estudio.

Agradecimientos especiales

Mi más profundo agradecimiento a mi tía Andre, que desde siempre ha sido una madre para mi y mis hermanos, siempre apoyándonos en cada aspecto, incluyendo nuestro crecimiento y desarrollo académico.

Gracias a todos mis tíos y tías: Eva, Lore, Sove, Car, Rodri, Chucho, Rafa y Tom, por todo su apoyo y enseñanzas.

A mi tía Ana que siempre me demuestra su cariño y me alienta a seguir cada vez que las cosas me sobrepasan.

A David, que se ha convertido en un hermano, siempre dispuesto ayudarme y motivarme. Gracias por todos los consejos y todos los rescates que me has facilitado.

A Gilda, gracias porque si no fuera por tu apoyo tal vez nunca hubiera sacado el proyecto adelante. Gracias por todos los consejos y jalones de oreja que me han regresado al buen camino.

Gracias a todos mis amigos y amigas, cerca o lejos siempre recibo su apoyo y los buenos deseos.

Tabla de contenido

Abreviaturas.....	8
Resumen.....	10
Abstract.	11
1. Introducción y antecedentes.....	12
1.1 Enfermedad de Parkinson.....	12
1.1.1 Síntomas motores y no motores de la enfermedad de Parkinson.	14
1.1.2 Estrategias alternativas al tratamiento farmacológico de la enfermedad de Parkinson.	17
1.1.2.1 Estimulación cerebral profunda.....	17
1.1.2.2 Factores neurotróficos.....	19
1.1.2.3 Sistemas de liberación de fármacos.....	22
1.1.2.4 Ultrasonido de aplicación focal.....	25
1.1.2.5 Terapia de reemplazo celular y células troncales embrionicas.	26
1.1 Neurogénesis dopaminérgica.	33
1.2.1 Neurogénesis dopaminérgica embrionaria.	33
1.1.2 Evidencias de neurogénesis en la <i>substantia nigra pars compacta</i>	39
1.2.3 Estrategias para la diferenciación de células troncales pluripotentes a neuronas dopaminérgicas <i>in vitro</i>	43
2. Hipótesis.....	47
3. Objetivo general.	47
4. Objetivos particulares.	47
5. Materiales y métodos.	48
5.1 Generación de la línea de células troncales embrionicas de ratón que.....	48
expresa <i>Lmx1a</i> bajo el promotor de <i>Nestina</i>	48
5.2 Diferenciación neural <i>in vitro</i> de las células troncales embrionicas.	49
5.3 Animales y procedimientos de trasplante.....	51
5.4 Implante de células de cuerpos embrioides en el explante de mesencéfalo ventral de embrión de ratón.	51
5.5 Trasplante de precursores neurales en el cerebro adulto de rata.	52
5.6 Trasplante de células de cuerpos embrioides en el cerebro adulto de rata.....	52
5.7 Procesamiento de tejido e inmunomarcajes.....	53
5.8 Extracción de RNA y PCR cuantitativo.....	55
5.9 Obtención de imágenes y conteo celular.	56
6. Resultados.	57
6.1 Generación de una línea con mayor potencial dopaminérgico.	57

6.2 La sobreexpresión de <i>Lmx1a</i> promueve la diferenciación dopaminérgica fuera del nicho endógeno.	59
6.3 El potencial neurogénico de la línea R1B5/NesE- <i>Lmx1a</i> <i>in vivo</i> parece alterarse cuando las células adquieren identidad neural <i>in vitro</i>	64
6.4 La sobreexpresión de <i>Lmx1a</i> promueve la diferenciación dopaminérgica de células de cuerpos embrioides en la <i>substantia nigra pars compacta</i>	65
6.5 La lesión de la <i>substantia nigra pars compacta</i> con 6-OHDA favorece la diferenciación da de células derivadas de cuerpos embrioides.....	68
7. Discusión.....	71
8. Conclusiones.....	78
9. Perspectivas.	78
10. Referencias	80
Anexo 1. Materiales y métodos.....	99
Anexo 2. Publicaciones.....	125

Abreviaturas

6-OHDA	6-hidroxidopamina.
ATV	Área tegmental ventral.
bFGF	Factor básico de crecimiento fibroblástico (<i>basic Fibroblast Growth Factor</i>).
cDNA	DNA complementario (<i>complementary DNA</i>).
CDNF	FNT cerebral dopaminérgico (<i>cerebral dopaminergic neurotrophic factor</i>).
CTEs	Células troncales embriónicas.
CTNs	Células troncales neurales.
CRr	Campo retrorubral.
DA	Dopaminérgica.
DBS	Estimulación cerebral profunda (<i>deep brain stimulation</i>).
DMEM	Medio Eagle modificado por Dulbecco (<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>).
DNA	Ácido desoxirribonucleico (<i>deoxyribonuclei acid</i>).
EP	Enfermedad de Parkinson.
FBS	Suero fetal de bovino (<i>fetal bovine serum</i>).
FNT	Factores neurotróficos.
GDNF	Factor neurotrófico derivado de la glía (<i>glial-derived neurotrophic factor</i>).
GFP	Proteína verde fluorescente (<i>green fluorescent protein</i>).
GPi	<i>Globus pallidus</i> interno.
GPS	Gentamicina, penicilina y estreptomina.
iPSC	Células troncales pluripotentes inducidas (<i>induced pluripotent stem cells</i>).
ITS	Insulina/transferrina/selenio/piruvato de sodio.

Lif	Factor inhibidor de leucemia (<i>leukemia inhibitor factor</i>).
MANF	FNT derivado de astrocitos mesencefálicos (<i>mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor</i>).
MPTP	1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina.
mRNA	RNA mensajero (<i>messenger RNA</i>).
NIV	Núcleo intermedio ventral.
NST	Núcleo subtalámico.
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos (<i>phosphate buffered solution</i>).
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (<i>polymerase chain reaction</i>).
PFA	Paraformaldehído.
PNs	Precusores neurales.
qPCR	PCR cuantitativo (<i>quantitative PCR</i>).
RNA	Ácido ribonucleico (<i>ribonucleic acid</i>).
Shh	<i>Sonic hedgehog</i> .
SNC	Sistema nervioso central.
SNpc	<i>Substantia nigra pars compacta</i> .
TA	Temperatura ambiente.
Th	Tirosina hidroxilasa.
VEGF	Factor de crecimiento de endotelio vascular (<i>vascular endothelial growth factor</i>).

Resumen.

Se ha demostrado que el trasplante de neuronas dopaminérgicas (DA) en el estriado puede rescatar el déficit de dopamina en pacientes con la Enfermedad de Parkinson (EP), pero no es una estrategia que detenga la progresión de la enfermedad. Uno de los enfoques de la terapia de reemplazo celular en la EP es optar por la reconstrucción de la vía nigro-estriatal, en la que se busca que las células trasplantadas se integren y proyecten desde la *substantia nigra pars compacta* (SNpc) hacia el estriado. Recientemente, reportamos que la SNpc posee un ambiente neurogénico que es percibido por células troncales embriónicas pluripotentes (p. ej. células de cuerpos embrioides) aunque no logran la diferenciación a neuronas DA. El presente estudio tuvo como objetivo conocer si la SNpc posee señales de especificación y diferenciación a neuronas DA. Trasplantamos en la SNpc, intacta o lesionada, células troncales embriónicas capacitadas para diferenciar a neuronas DA por la sobreexpresión forzada del factor de transcripción *Lmx1a* en la etapa de precursor neural (R1B5/NesE-Lmx1a). Observamos que 6 días post-trasplante (dpt) las células de la línea R1B5/NesE-Lmx1a y de la línea parental (R1B5) diferenciaban a precursores neurales Nes⁺ y a neuroblastos Dcx⁺, pero solo las células derivadas de la línea R1B5/NesE-Lmx1a diferenciaron a células DA Th⁺. En contraste, cuando las células fueron trasplantadas a la SNpc lesionada con 6-hidroxidopamina, la diferenciación a células Th⁺ fue independiente de la expresión exógena de *Lmx1a*, aunque las células no fueron observadas a largo plazo (15 dpt). Estos resultados sugieren que la SNpc no sólo es un nicho permisivo para la diferenciación DA inicial de células pluripotentes no neuralizadas, sino que, cuando es lesionada, libera factores que promueven la adquisición del fenotipo DA de células derivadas de cuerpos embrioides.

Abstract.

Transplantation of dopaminergic (DA) cells into the striatum can rescue dopamine deficiency in a Parkinson's disease condition, but this does not restore full control of motor activity. The minimal condition towards recovery of the nigrostriatal pathway is the proper innervation of transplanted DA neurons or their precursors from the *substantia nigra pars compacta* (SNpc), to their target areas. However, functional integration of transplanted cells would require that the host SNpc is suitable for their survival and/or differentiation. We recently reported that the intact adult SNpc holds a strong neurogenic environment, but primed embryonic stem cells (*e. g.* embryoid body cells, EBCs) could differentiate into DA neurons. In this study, we transplanted into the intact or lesioned SNpc, EBCs derived from embryonic stem cells that were prompted to differentiate into DA neurons by the forced expression of *Lmx1a* in neural precursor cells (R1B5/NesE-Lmx1a). We observed that, 6 days post-transplantation (dpt), R1B5 or R1B5/NesE-Lmx1a EBCs gave rise to Nes⁺ and Dcx⁺ cells within the host SNpc, but only from EBCs exogenously expressing *Lmx1a* differentiated into Th⁺ cells in large number. In contrast, when transplantation was carried out into the 6-hydroxidopamine-lesioned SNpc, the emergence of Th⁺ cells from EBCs was independent of exogenous *Lmx1a* expression, although these cells were no longer present by 15 dpt. These results suggest that the adult SNpc is not only a permissive niche for initiation of DA differentiation of non-neuralized cells but also releases factors upon damage that promote the acquisition of DA characteristics by transplanted EBCs.

1. Introducción y antecedentes.

1.1 Enfermedad de Parkinson.

La enfermedad de Parkinson (EP) se sitúa como la segunda enfermedad neurodegenerativa más común a nivel mundial, afectando entre el 2 y 3 % de la población mayor a los 65 años. Ésta se caracteriza por la muerte progresiva de las neuronas dopaminérgicas (DA) del cerebro medio, una subpoblación conocida como A9 que proyecta desde la *substantia nigra pars compacta* (SNpc) hasta sus blancos en el estriado, principalmente el núcleo caudado y putamen (llamada vía nigro-estriatal; Fig.1), y que forma parte de un circuito neuronal complejo que se ve involucrado en el control del movimiento voluntario [1].

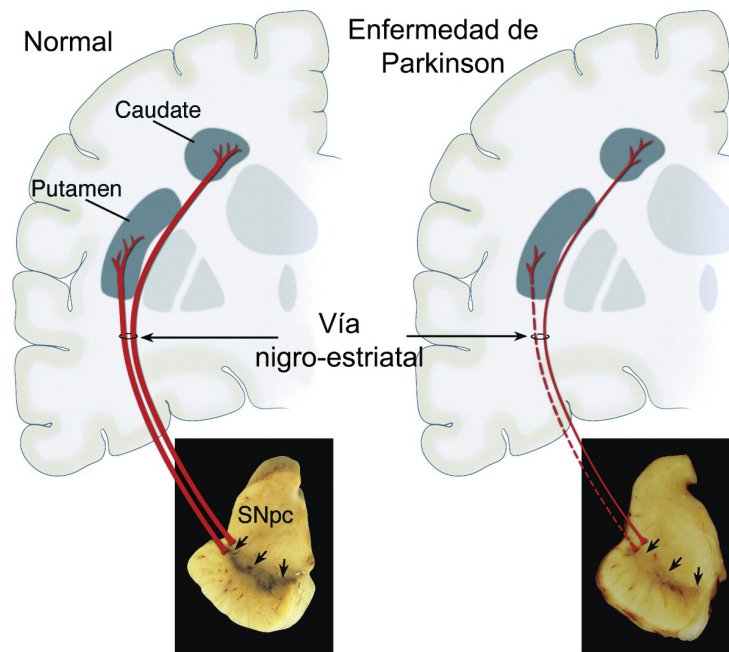


Figura 1. Neuropatología de la enfermedad de Parkinson. Representación esquemática de la condición normal y en la EP de la vía nigro-estriatal (en rojo). Está compuesta por neuronas dopaminérgicas de las cuales sus cuerpos celulares se encuentran en la SNpc (indicada con flechas). Estas neuronas proyectan hacia los ganglios basales en el estriado. La imagen en la parte inferior muestra la pigmentación normal de la SNpc producida por la neuromelanina dentro de las células dopaminérgicas y la despigmentación por la degeneración celular (Modificado de Dauer y Przedborski, 2003).

La muerte de las neuronas DA en la EP provoca un déficit de dopamina en el cerebro anterior, hecho que se traduce en síntomas motores como temblor en reposo, rigidez, dificultad para caminar o iniciar movimientos y problemas de coordinación. Además de estos síntomas que permiten el diagnóstico de la EP, existen síntomas no motores que anteceden a la afección motora y que implican la afectación de otros circuitos neuronales, como mareos, pérdida del equilibrio, amnesia, dificultad para pensar y comprender, ansiedad, pérdida del olfato, entre otros [2,3]. A pesar de los enormes esfuerzos que se han realizado para el estudio de la EP, la causa de la neurodegeneración DA permanece desconocida y el envejecimiento es considerado el mayor factor de riesgo [4].

Otra de las características neuropatológicas de la EP es la agregación intraneuronal de la proteína alfa-sinucleína. A la par, la disfunción mitocondrial, la acumulación de especies reactivas de oxígeno, desregulación en la homeostasis de calcio, afectación del transporte axonal y signos de neuroinflamación están presentes en la EP [5], si bien no son exclusivos, al observarse también en otras enfermedades neurodegenerativas [2].

Por otro lado, el tratamiento de la EP se torna complicado al considerar que los síntomas motores se manifiestan en un paciente cuando éste ha perdido entre el 60 y 80% de las neuronas DA A9, y el déficit de dopamina en el estriado es cercano al 50% [6], lo que impide implementar estrategias de neuroprotección en etapas tempranas. Así, el tratamiento más común se basa en el sustituto farmacológico de la dopamina, un precursor que atraviesa la barrera hematoencefálica para ser metabolizado a dopamina (L-DOPA, levodopa), el cuál se administra en conjunto con un inhibidor de su

metabolismo periférico (Carbidopa) [2]. Sin embargo, estos tratamientos no tienen la capacidad de detener la neurodegeneración, se vuelven ineficientes con el paso del tiempo y derivan en molestos y severos efectos secundarios que pueden ser más limitantes que la propia enfermedad [7]. Estos hechos han provocado tanto la búsqueda de métodos tempranos de diagnóstico, así como de terapias alternativas que puedan ser seguras y de duración sostenida. Una de ellas es la terapia de reemplazo celular, misma que se ha abordado desde numerosos enfoques metodológicos (ver más adelante).

1.1.1 Síntomas motores y no motores de la enfermedad de Parkinson.

Actualmente, la EP se describe como un padecimiento que, mediante la afectación de la liberación de varios neurotransmisores, deriva en diversos síntomas tanto motores como no motores que resultan de la disfunción de varias vías neuronales a nivel central y periférico [8,9]. Sin embargo, como ya se ha mencionado, la EP se asocia principalmente con la pérdida de las neuronas DA de la SNpc, quienes conforman la mayor fuente de dopamina del estriado. La reducción de las proyecciones axonales desde el cerebro medio hasta el estriado y el déficit del neurotransmisor es causante de los principales síntomas motores de la enfermedad. De ellos, los mayormente reconocidos son la bradicinesia (movimientos lentos), el temblor en reposo y la rigidez; dichos síntomas comienzan a manifestarse de manera unilateral y después se manifiestan de manera bilateral, aunque se mantiene cierto grado de asimetría durante el progreso de la enfermedad [10]. El temblor en reposo se presenta principalmente en los brazos, pero también se puede observar en las piernas, el mentón y la mandíbula; además puede

manifestarse durante la marcha [11]. Por su parte, la bradicinesia se caracteriza por la ralentización generalizada de movimientos y fatiga por movimientos repetitivos. En su mayoría, los pacientes describen dicho síntoma como debilidad, lentitud o cansancio. Así mismo, la bradicinesia se puede manifestar como una disminuida capacidad de expresión facial, dificultad para realizar movimientos finos, reducción del tamaño de letra escrita, dificultad para girar cuando se está acostado, arrastre de los pies al caminar y reducción de la distancia recorrida en cada paso [12]. La rigidez, definida como la “resistencia” al intento de generar movimiento articular pasivo, independientemente de la velocidad o direccionalidad, puede afectar cualquier parte del cuerpo y puede provocar dolor. La marcha y el balance también se ven afectados en la EP, la primera se caracteriza por un ritmo lento de ejecución, longitud de paso reducida, giros de varios pasos, postura encorvada y movimiento de brazos reducido. A medida que la enfermedad progresa, pueden surgir más déficits de la marcha, como la vacilación al inicio de los movimientos y durante las transiciones, y la congelación de la marcha [12].

La afectación al sistema motor en la EP ha llevado a un mejor entendimiento de la enfermedad permitiendo un mejor diagnóstico y el surgimiento de escalas para medir la severidad de la EP, además de dar lugar a esquemas de tratamiento más adecuados. Sin embargo, en las últimas décadas se ha puesto especial atención a los síntomas no motores que también afectan de manera importante la calidad de vida de los pacientes. Actualmente, es sabido que la incidencia de dichos síntomas no sólo aumenta con la progresión de la enfermedad, si no que pueden preceder varios años antes a los síntomas motores. Síntomas como la disfunción olfativa, desórdenes del sueño,

estreñimiento, depresión y dolor, son indicadores de una fase preclínica de la EP [3,13]. En fases tempranas de la enfermedad, los síntomas no motores prevalecen en la mayoría de los pacientes y hasta un 21% de ellos reportan sensaciones de dolor, depresión o ansiedad [10,14,15].

Estas afectaciones no motoras señalan que la EP no se limita al sistema dopaminérgico, sino que son varias las vías de neurotransmisión afectadas incluyendo la colinérgica, noradrenérgica y serotoninérgica [16–19]. Así, la depresión podría estar asociada con la afectación de la neurotransmisión DA y noradrenérgica en el sistema límbico y, por su parte, la ansiedad y la apatía con la disminución generalizada de la neurotransmisión DA [20]. Por otro lado, la sobreexcitación asociada a la terapia con agonistas dopaminérgicos es seguida por síntomas no motores. De manera interesante, hasta un 19% de los pacientes que se apegan al tratamiento con agonistas de los receptores D2/D3 reportan comportamientos adictivos en los que se incluyen las apuestas y compras compulsivas [10,14].

Comúnmente, los síntomas no motores de la EP no se distinguen o evalúan en las valoraciones clínicas de rutina ya que es difícil asociar su origen directamente con la EP, sin embargo, dichos síntomas denotan una de las principales causas de discapacidad y, por tanto, el entendimiento de ellos se vuelve crucial para mejorar las labores clínicas de diagnóstico y los tratamientos.

1.1.2 Estrategias alternativas al tratamiento farmacológico de la enfermedad de Parkinson.

En los últimos años se han desarrollado tanto nuevas herramientas tecnológicas como nuevas posibles terapias para tratar trastornos del movimiento, que han permitido refinar las rutinas de diagnóstico, la evaluación clínica y el tratamiento de los pacientes. En el caso de la EP, se han estudiado alternativas a la terapia farmacológica debido a que, en su totalidad, los pacientes dejan de obtener beneficios de la toma de medicamentos después de 3 a 5 años de iniciar el tratamiento y al surgimiento de efectos secundarios antes mencionados. Entre las posibles terapias alternativas se encuentran la estimulación cerebral profunda (*Deep brain stimulation: DBS*), aplicación de moléculas con actividad neuroprotectora, ablación de tejido con ultrasonido y la terapia de reemplazo celular.

1.1.2.1 Estimulación cerebral profunda.

La DBS es un tratamiento que involucra la aplicación de corriente eléctrica mediante implantación de uno o más electrodos en regiones específicas del cerebro. Aunque no se sabe con claridad los mecanismos por los cuales esta estrategia actúa sobre los sitios de aplicación, se postula que puede tener dos vías de acción: **1)** bloqueando las corrientes dependiente de voltaje, principalmente las dependientes de sodio y calcio en el sitio de aplicación y/o **2)** provocando potenciales de acción antidrómicos en los axones adyacentes a la zona de aplicación. Los resultados de esta estrategia son variables; mientras que hay pacientes que tienen beneficios sostenidos (reducción de síntomas

motores y aumento en la calidad de vida), hay otros en los que es ineficiente [9,21,22]. A través de los años, la DBS ha tenido mejoras técnicas principalmente en la neurocirugía (cirugía en paciente dormido), desarrollo de microelectrodos y esquemas de estimulación programados. Uno de los avances que se pudiera considerar de relevancia es la implementación de electrodos direccionales que permiten la estimulación segmentada y ésta, a su vez, una aplicación más precisa y la reducción de síntomas adversos de la DBS [23].

Los blancos de la DBS en los ganglios basales son el núcleo intermedio ventral (NIV), el núcleo subtalámico (NST) y el *globus pallidus* interno (GPi). En el tratamiento de la EP el NIV fue uno de los primeros blancos para realizar talamotomía y después para la DBS. Sin embargo, a la fecha solo se considera su estimulación para pacientes que presentan predominantemente el temblor involuntario; se opta más por estimulación del NST que ayuda a disminuir y alentar la progresión de la bradicinesia y la rigidez. Por su parte, la estimulación del GPi abate principalmente las discinesias, pero no permite la reducción farmacológica requerida en la EP. En contraste, la estimulación del NST permite que se reduzca en más del 50% la dosis de medicamento, además de que ayuda en la disminución de los efectos secundarios que resultan de la terapia farmacológica. Adicionalmente, en pacientes con fluctuaciones motoras, la DBS es superior a cualquier medicamento tanto en etapas tempranas como tardías de la EP [24,25].

Aunque la DBS ha mostrado ser efectiva en la reducción de algunos de los principales síntomas de la EP, no tiene un efecto neuroprotector y no limita la neurodegeneración.

Además, es de considerarse que la colocación de los electrodos en los pacientes requiere de una cirugía compleja con los riesgos implícitos y es muy costosa, lo que hace que pocos pacientes sean beneficiados con ella.

1.1.2.2 Factores neurotróficos.

Debido a que los fármacos utilizados como sustituto de la dopamina en pacientes con EP no detienen la progresión de la enfermedad, una de las estrategias que se ha planteado es el uso de agentes neuroprotectores, esperando ralentizar o retrasar no sólo la muerte neuronal DA, sino la progresión sintomatológica y mantener una mejor calidad de vida para el paciente. Así, se ha evaluado la capacidad de los factores neurotróficos como posibles neuroprotectores de las neuronas DA.

Los factores neurotróficos (FNT) son proteínas endógenas secretadas al espacio extracelular y que son importantes en el desarrollo, diferenciación y mantenimiento de las neuronas. Cada población neuronal requiere de FNT específicos durante el desarrollo embrionario y para su mantenimiento durante la vida adulta. En cuanto a la EP, los FNT que tienen acción sobre las neuronas DA son de gran interés ya que se ha demostrado su potencial para promover la supervivencia de las neuronas, como neuroprotectores y como promotores de la regeneración de la vía nigro-estriatal. La mayoría de los FNT actúan sobre receptores transmembranales específicos con la posibilidad de activar vías de supervivencia y diferenciación, varios de dichos factores han sido probados en estudios preclínicos y en modelos animales de la EP [21-37].

El factor neurotrófico derivado de la glía (*glial-derived neurotrophic factor*: GDNF) fue uno de los primeros en mostrar potencial como molécula terapéutica para tratar la EP, ya que aumentó la sobrevivencia de neuronas DA en cultivo [26]. Varios reportes afirman que la inyección de GDNF directamente al cerebro de roedores protege a las neuronas DA ante un daño citotóxico [27,28]. En otros estudios donde la administración de GDNF se realizó después de provocar la lesión, se observó una reversión de las afecciones motoras y restablecimiento parcial de la integridad nigro-estriatal [29–31]. En el caso de los modelos de la EP en primates no humanos, la infusión de GDNF también promovió un restablecimiento de la vía nigro-estriatal y reducción de los síntomas motores, inclusive cuando éste se infundió semanas o meses después de haberse realizado la lesión, cuando el tejido muestra una degeneración significativa [32–34].

En contraste con los resultados positivos observados tras el uso de GDNF, tanto en el roedor como el primate no humano, el GDNF no tuvo efecto en el modelo roedor de la EP en el que se promueve la sobreexpresión de la alfa-sinucleína (principal componente de los cuerpos de Lewy) que promueve la degeneración progresiva de la vía nigro-estriatal [35,36].

Otro de los FNT utilizados en el modelo de la EP, donde se induce la neurodegeneración de las neuronas DA con la neurotoxina 6-hidroxidopamina (6-OHDA), es el factor de crecimiento de endotelio vascular (*vascular endothelial growth factor*: VEGF). En un esquema de terapia génica en el que se promovió la expresión de VEGF en células

endógenas del estriado lesionado de ratas (7 días después de haberse realizado la lesión) se observó una reversión en la asimetría motora y una mayor densidad de fibras DAs en la vía nigro-estriatal, indicando que el VEGF posiblemente juega un papel en el rescate de las neuronas DA [37]. Adicionalmente, VEGF tienen un efecto neuroprotector cuando se induce su expresión días antes de realizarse la lesión con 6-OHDA [38]. En otro modelo de lesión inducida con rotenona, se trasplantaron al estriado de animales lesionados, células mesenquimales humanas de cordón umbilical que expresan VEGF. En ellos, además de observarse una reversión de la asimetría motora y una mayor densidad de fibras DA en el estriado y en el cerebro medio, las células mesenquimales diferenciaron a células con expresión de marcadores neurales (Nestina) y de neuronas DA (p. ej. Th).

El FNT cerebral dopaminérgico (*cerebral dopaminergic neurotrophic factor*: CDNF) y su homólogo el FNT derivado de astrocitos mesencefálicos (*mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor*: MANF) pertenecen a una familia de proteínas que se localizan principalmente en el lumen del retículo endoplásmico, pero que pueden ser secretados como FNT [39]. Se ha demostrado que el CDNF tiene un efecto protector contra el estrés del retículo endoplásmico y tiene la capacidad de disolver los agregados intracelulares de la alfa-sinucleína [40,41]. El potencial terapéutico del CDNF se ha probado en ratas, tanto en el modelo de la 6-OHDA como en otro modelo en el que se induce lesión con 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP), en los que se observó, después de promover la expresión endógena del CDNF, una restauración significativa de las células DA de la SNpc y una mayor densidad de fibras DA en el estriado, además

de una reversión de la asimetría motora [40,42–44]. De la misma manera, se demostró que la combinación del CDNF con el MANF tienen un efecto sinérgico sobre la neuroprotección de las neuronas DA ante el daño citotóxico y la reversión de la conducta asimétrica motora en el modelo de la 6-OHDA.

Es claro que algunos FNT tienen la capacidad de proteger a las neuronas DA ante un daño citotóxico, sin embargo, ninguno de los experimentos aquí citados demuestra de forma contundente que alguno de los FNT tenga la capacidad de promover la regeneración de la vía nigro-estriatal. Es posible que la acción de los FNT sea la de rescatar aquellas células que se encuentran con un daño parcial y promover la expresión de marcadores DA (utilizados para evaluar la cantidad de células y de fibras DA después del daño y del tratamiento). Otra de las críticas que tienen en general los experimentos descritos, es que éstos se llevan a cabo en un contexto en el que las células se enfrentan a un daño agudo resultado de la exposición a neurotoxinas, por lo tanto, la degeneración no se presenta de manera progresiva como sucede en la EP.

1.1.2.3 Sistemas de liberación de fármacos.

Otra de las limitantes del uso de FNT como posibles moléculas terapéuticas para el tratamiento de la EP, es que estos tienen que ser infundidos directamente al cerebro, o bien promover su expresión en células endógenas (terapia génica), para lo cual se requiere de estrategias que pudieran considerarse no seguras (p. ej. el uso de vectores virales). Lo anterior apuntó a la necesidad de un sistema que permita la acción de dichos

fármacos a nivel del sistema nervioso central (SNC) y sin que la barrera hematoencefálica sea una limitante. En este sentido, se han estudiado nuevos sistemas de liberación de fármacos y métodos que permiten el acceso más eficiente de las sustancias neuroprotectoras al cerebro. Dichas tecnologías pueden permitir la protección de moléculas sensibles contra la degradación y, adicionalmente, regular la liberación durante días o meses. Por otro lado, los dispositivos de liberación controlada pueden ayudar a disminuir la aparición o severidad de los efectos secundarios de los fármacos ya que en muchos de ellos se pueden reducir las dosis utilizadas. Entre los sistemas de liberación controlada de fármacos destacan las macropartículas, nanopartículas e hidrogeles, por su efectividad en la promoción de efectos neuroprotectores al ser combinados con moléculas con potencial terapéutico. Otros sistemas como los liposomas y micelas también han sido estudiados [45].

De entre las moléculas promisorias en el tratamiento de la EP destacan los factores tróficos, en particular el factor GDNF, mencionado anteriormente. Numerosos sistemas de liberación han sido diseñados procurando el incremento de la estabilidad química del GDNF y su retención en el cerebro. Algunos estudios han demostrado en ratones o primates no humanos la eficiencia a nivel preclínico del GDNF encapsulado en micropartículas, donde una sola dosis del GDNF microencapsulado se traduce en un mejoramiento prolongado de la función motora y restauración de la función DA tras una lesión severa. Estos efectos se deben, en parte, a que de esta forma el GDNF actúa de manera sitio-específico en el putamen, evitando la acción en otras regiones, y, además, a que no promovió una respuesta inmunogénica ni se detectaron afectaciones

neurodegenerativas [46]. Así, los sistemas basados en micropartículas acarreadoras pueden servir tanto como acarreadores de GDNF como dispositivos de liberación sostenida [47–49].

En otro estudio, se combinó GDNF con VEGF, un potente angiogénico que puede actuar positivamente en la sobrevivencia celular de cultivos neuronales [50]. Esta combinación se asoció a nanoesferas para ser liberada en el cerebro parcialmente lesionado de ratas, las cuales recuperaron un porcentaje de la función motora y tuvieron un mayor número de neuronas DA tanto en el estriado como en la SNpc. Es notable que los efectos de la combinación de GDNF/VEGF aplicados en nano-esferas se pueden observar desde dosis bajas [51,52].

Otra estrategia prometedora relacionada con los sistemas de liberación de fármacos que se ha utilizado para proveer al cerebro con GDNF es el uso de nano-formulaciones que tienen la capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica gracias a su interacción con receptores del endotelio vascular. Esta estrategia permite la aplicación de tratamientos de manera no invasiva. Así, se ha logrado en ratas parkinsonianas una reversión de las afectaciones motoras, disminución de la pérdida de neuronas DA y el aumento de los niveles de neurotransmisores [47].

Además del GDNF y el VEGF, se ha probado el efecto de otros factores neurotróficos en el contexto de la pérdida neuronal DA, como el factor básico de crecimiento fibroblástico (*basic Fibroblast Growth Factor*: bFGF). Por ejemplo, utilizando acarreadores lipídicos

nanoestructurados (*gelatin nanostructured lipid carriers*), se demostró que el bFGF puede estimular la función DA y juega, además, un papel neuroprotector en ratas lesionadas con 6-OHDA [53].

A pesar de que se han logrado avances importantes en la forma en la que se administran los fármacos o moléculas neurotróficas con potencial terapéutico en la EP y que cada vez hay más trabajos en los que se evalúan nuevos y mejores materiales de micro o nano encapsulamiento, esta estrategia no sortea las complicaciones inherentes al uso de fármacos. A pesar de que las nano o micro formulaciones permiten la aplicación del fármaco de manera no invasiva, además que ayudan a disminuir las dosis requeridas, o bien prolonguen la liberación de moléculas, éstos siguen teniendo una acción ininterrumpida, que puede influenciar la actividad neuronal de otras células no DA y actúen así de manera independiente a la necesidad puntal de los circuitos DA. Lo anterior, como en cualquier forma de aplicación de fármacos en la EP, conlleva a la aparición de efectos secundarios. Adicionalmente, no se ha demostrado de manera contundente que estos sistemas tengan la capacidad de frenar el proceso degenerativo y/o de promover una regeneración del tejido.

1.1.2.4 Ultrasonido de aplicación focal.

En años recientes, el uso del ultrasonido focal como terapia para tratar los desórdenes neurológicos ha tenido gran impacto. Esta técnica no invasiva consiste en la aplicación focal de energía acústica en regiones específicas del cerebro, como resultado se obtiene

la ablación del tejido [54]. Para lograrlo es necesario el uso de resonancia magnética que permite un alto grado de precisión con retroalimentación en tiempo real sobre el efecto del tratamiento. Esta tecnología se ha utilizado en pacientes con la EP, tratando de abatir la actividad de varias regiones del cerebro, responsables de los síntomas motores [54–57].

Una de los problemas no resueltas del ultrasonido con aplicación focal como terapia para la EP es que no está definido cuál es el mejor blanco para realizar la ablación y si será cada región será distinta entre pacientes. Además, a la fecha no se han evaluado la durabilidad a largo plazo de los resultados de la aplicación focal del ultrasonido y si es posible, en términos de viabilidad y seguridad, realizar el procedimiento de manera bilateral. Así, para conocer el verdadero potencial de la terapia ablativa con ultrasonido focal, se necesitan mayor número de ensayos que puedan validar de manera contundente los resultados hasta ahora preliminares. Cabe mencionar que, al ser una estrategia quirúrgica de ablación, el procedimiento no es reversible, cualquier efecto, sea deseable o no, puede ser a largo plazo.

1.1.2.5 Terapia de reemplazo celular y células troncales embriónicas.

La terapia de reemplazo celular tiene como fundamento restablecer las funciones perdidas de un tejido mediante el trasplante de células que tengan capacidades homólogas a las células que se pierden en un proceso degenerativo. En la EP, la pérdida de neuronas DA de la vía nigro-estriatal ha motivado al intento de implementar la terapia

de reemplazo celular, en consecuencia, se han trasplantado, principalmente en el estriado, una enorme variedad de células con cierto grado de homología con las neuronas DA, la mayoría de ellas productoras de dopamina; lo anterior se ha realizado tanto a nivel experimental básico como preclínico y clínico [58–60].

Las pruebas de reemplazo celular realizadas en humanos en las que se usaron neuronas DA o tejido neuronal proveniente de embriones no viables, dieron muestras de la viabilidad de dicha estrategia, pero, de igual manera, se demostraron sus limitaciones [61,62]. Aunque estudios de neuro-imagen y neuropatológicos arrojaron datos de la posible integración de las células DA trasplantadas al estriado, sólo una proporción de los pacientes mostraron beneficios significativos. Adicionalmente, más del 56% de pacientes mostraron discinensias después de suspender 12 horas su tratamiento farmacológico [63]. Los trasplantes realizados en dichos pacientes contenían, además de neuronas DA, células gliales, fibroblastos y células del sistema inmune que pudieran tener efectos desconocidos sobre la supervivencia celular, la reacción inmunológica y el resultado clínico. Por otro lado, se reportó que las células trasplantadas mostraron la patología de las neuronas endógenas, principalmente la acumulación de cuerpos de Lewy [64]. Adicionalmente, en otro paciente que murió 23 meses después de habersele realizado el trasplante intraestriatal de células DA mesencefálicas embrionarias no se encontró la supervivencia de células DA, pero sí la presencia de tejido óseo, cabello, cartílago y epitelio escamoso en numerosos sitios del ventrículo; dicho fenómeno se asoció a la posible causa de muerte [65].

Uno de los aspectos que se debe resolver para establecer una terapia de reemplazo celular para la EP es la necesidad de una fuente de células DA que pueda ser aislada de manera fácil, que sean expandibles en cultivo y que puedan ser trasplantadas eficientemente. De entre los posibles tipos celulares que pudieran contar con tales características se encuentran las células troncales embriónicas (CTEs), las células troncales pluripotentes inducidas (*induced pluripotent stem cells*: iPSC) y las células troncales neurales (CTNs) embrionarias [66].

El sitio de trasplante es otro aspecto importante que debe considerarse al plantear una terapia exitosa de reemplazo celular en la EP. Históricamente, los trasplantes tanto en pacientes como en modelos de la EP se han realizado en el estriado, sitio de proyección de las neuronas DA mesencefálicas, imposibilitando la integración de las células trasplantadas al circuito dopaminérgico nigro-estriatal, convirtiéndose en una fuente de liberación desregulada (no fisiológica) de dopamina asociada con diversos efectos secundarios. Por otro lado, el implante en la SNpc debiera tener la capacidad de proyectar hacia sus blancos en el estriado y responder a las señales de los circuitos preexistentes. Aunque existen trabajos (descritos más adelante) que demuestran que la proyección a través del encéfalo es posible, el trasplante a la SNpc es un campo en el que se necesita profundizar más. Así, el tener una fuente celular adecuada, suficiente, segura y con la capacidad de proyectar, podría, al ser trasplantada, traducirse en mejores resultados clínicos en la EP.

De entre las fuentes celulares mencionadas, las CTEs poseen varias características para ser una fuente celular promisoría en el tratamiento de la EP y también de otras enfermedades degenerativas. Las CTEs son un tipo celular no especializado con la capacidad de autorenovación y pluripotencia (Fig. 2). Al ser pluripotentes, las CTEs pueden ser diferenciadas *in vitro* a CTNs y, subsecuentemente, a neuronas DAs [67]. En contraste con las células recuperadas de tejido embrionario u otro tipo de tejido, las CTEs tienen ventaja debido a su ilimitada capacidad proliferativa *in vitro*. Numerosos protocolos de diferenciación neuronal DA se han establecido con células pluripotentes provenientes de ratón, de primate no humano y de humano, con resultados variados en términos de eficiencia de especificación neural, eficiencia de especificación neuronal DA y diferenciación neuronal DA (ver más adelante). Las células resultantes de dichos protocolos, que serán discutidos más adelante, mostraron características funcionales, morfológicas y electrofisiológicas comparables con neuronas DA endógenas; sin embargo, al ser trasplantadas manifestaron los problemas de cualquier otra fuente celular: liberación no controlada de dopamina, baja sobrevivencia y nula integración funcional.

Desde otro enfoque, se han reportado estudios en los que se trasplantaron entre 10 mil y 200 mil CTEs indiferenciadas en el estriado de ratas lesionadas con 6-OHDA. Después de varias semanas, una quinta parte de los animales trasplantados desarrollaron tumores del tipo teratoma y en el 24 % no se encontró sobrevivencia del trasplante. En el resto de los animales (56%) se observaron células DA en el sitio de trasplante (estriado lesionado) y una mejoría en la conducta motora [68]. Sin embargo, en otro estudio, estos resultados

no fueron reproducibles [69]. Otro ejemplo es el trasplante de una población enriquecida de CTNs del cerebro medio provenientes de CTEs que sobreexpresan el factor de transcripción *Nurr1*, considerado como un factor determinante del destino neuronal DA, en el estriado lesionado de ratas adultas, las cuales diferenciaron y mostraron características morfológicas, funcionales y electrofisiológicas muy similares a las observadas en neuronas mesencefálicas. En algunos casos los animales mostraron mejorías conductuales pero no una recuperación total [70]. Lo anterior puede significar que, aunque existan células DA con características similares a las neuronas perdidas en la EP, éstas no serán funcionales hasta que logren una integración a los circuitos preexistentes. Este estudio, como muchos otros, demuestra que se puede pre-capacitar a las células para que éstas diferencien en el sitio del trasplante, lo que supondría una mayor probabilidad de integración funcional. Sin embargo, el problema de trasplantar células pluri o multipotentes es poder prevenir la proliferación no controlada y la diferenciación no deseada. En la mayoría de los estudios en los que trasplantan células troncales se reporta el surgimiento de tumores y teratomas. Adicional a dichas limitaciones se encuentra la sobrevida de las células trasplantadas y la estabilidad fenotípica.

Una de las estrategias para contender con algunos de los problemas que surgen de los trasplantes convencionales en la EP (efectos secundarios severos y la nula posibilidad de integración funcional) es la de realizar el trasplante en el sitio donde las neuronas DA residen: la SNpc. Este esquema de trasplante ortotópico aumenta las probabilidades de una integración anatómica adecuada y la capacidad de respuesta a las señales

endógenas que regulan la liberación de dopamina; a la fecha estos trasplantes se han realizado tanto en modelos animales como en pacientes.

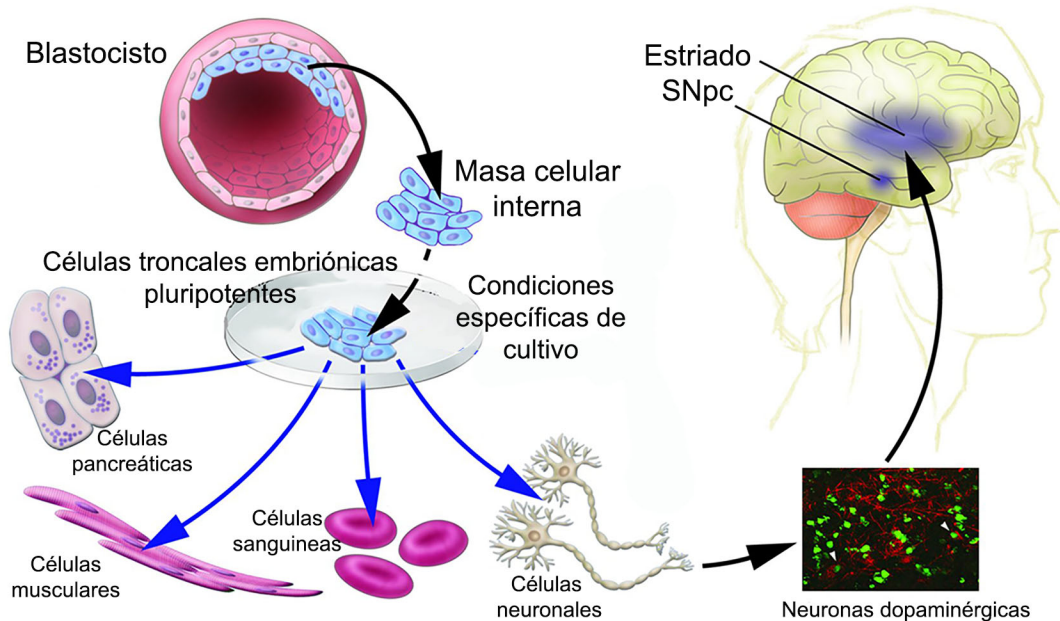


Figura 2. Células troncales embrionarias. Las células CTEs se obtienen de la masa celular interna del blastocisto. Ellas pueden diferenciar a cualquier tipo celular especializado. En cultivo, se han utilizado distintas combinaciones de factores tróficos y morfógenos para dirigir su diferenciación a distintos linajes celulares de entre los que se incluyen las neuronas DA. Dichas neuronas se han utilizado en la búsqueda de una estrategia de reemplazo celular para la EP y se han trasplantado tanto en el estriado como en la SNpc (modificado de Langston 2015).

En un inicio, una de las limitantes del trasplante intranigral fue la de lograr dirigir el crecimiento axonal desde el cerebro medio hasta sus blancos en el estriado. Sin embargo, recientemente se han obtenido evidencias de la posibilidad de reconstruir anatómicamente la vía nigro-estriatal. Una de ellas involucra la creación de “puentes” que permiten el crecimiento dirigido de los axones (*bridging technology*). Estas vías artificiales de crecimiento axonal son generadas por la aplicación de factores de crecimiento, moléculas u otros tipos celulares que se administran en la vía directa que conecta la región del trasplante con el estriado [71-74]. Un ejemplo de ello fue el de

utilizar células de riñón como células de “puenteo” debido a su alta producción de GDNF y el trasplante intranigral de células mesencefálicas ventrales embrionarias; los autores reportaron una mejoría en la conducta motora y la observación de fibras DA en el estriado [71]. En otro trabajo se usó el ácido kaínico como molécula “puente” y se observaron resultados similares al reporte anterior [72]. En dichos estudios, los de “puenteo”, se plantea que esta estrategia genera un ambiente trófico adecuado para guiar de manera efectiva el crecimiento axonal y mejorar los resultados de un trasplante ortotópico. Sorprendentemente, en el 2009 se publicaron 2 artículos en los que no fue necesario realizar un puente [73,74], en ellos se trasplantaron células del mesencéfalo ventral de embrión en la SNpc y, en uno de ellos, un vector para sobreexpresar el GDNF en el estriado. En los dos trabajos (con GDNF y sin él) se observaron fibras del trasplante que proyectaron hasta el estriado, a la par de la disminución de la asimetría motora. Sin embargo, al determinar la identidad de las células del trasplante, además de marcadores DA, expresaron marcadores de otros tipos celulares (como GABA) [73,74]. Más adelante, en un acercamiento preclínico, fueron trasplantadas en el cerebro lesionado de ratas atímicas, tanto células recuperadas del mesencéfalo ventral de embriones humanos no viables como precursores neuronales DA en la etapa inicial de la diferenciación neuronal; sorprendentemente, las células trasplantadas lograron sobrevivir más de 6 meses en el tejido del hospedero y se observaron proyecciones hacia regiones estriatales. Además, los roedores mejoraron en las pruebas de asimetría motora [75]. El mismo grupo de investigación, recientemente demostró que la proyección desde el cerebro medio hacia el cerebro anterior no está limitada por el fenotipo neuronal, al observar que tanto células con identidad mesencefálica ventral como con identidad anterior ventral tienen la

capacidad de proyectar desde la SNpc hacia el estriado. Sin embargo, mientras las células con identidad mesencefálica ventral son invadidas por células del hospedero y pueden proyectar hacia los blancos en el estriado, las células con identidad anterior solamente pueden proyectar hacia los blancos en el estriado pero no recibir invasión de las células del hospedero [76]. A la fecha no se conoce si dichas proyecciones son promovidas por factores en el microambiente o un andamiaje dado por proyecciones de otras células a través del tracto nigro-estriatal.

1.1 Neurogénesis dopaminérgica.

1.2.1 Neurogénesis dopaminérgica embrionaria.

Las neuronas DA deben su nombre a la capacidad de producir y liberar dopamina, un neurotransmisor catecolaminérgico, y a la presencia de la tirosina hidroxilasa (Th), la enzima limitante en la producción de dopamina y que es comúnmente utilizada como marcador de neuronas DA [77]. Las neuronas DA mesencefálicas están distribuidas en tres núcleos: la SNpc, el área tegmental ventral (ATV) y el campo retrorubral (CRr) (Fig. 3). Cada una de las poblaciones de neuronas DA mesencefálicas proyecta hacia blancos específicos y por lo tanto controlan o modulan funciones específicas [78]. Las neuronas del ATV y del CRr proyectan hacia el estriado ventromedial (núcleo *accumbens*), a regiones del sistema límbico y a la corteza prefrontal. Estas neuronas DA regulan el comportamiento emocional, la motivación natural, funciones de recompensa y algunas funciones cognitivas, además, están relacionadas con desórdenes psiquiátricos [79–81].

En contraste, y como ya se ha mencionado, las neuronas DA de la SNpc proyectan principalmente a putamen caudal y al estriado dorsolateral, formando la vía nigro-estriatal que regula principalmente funciones motoras [82].

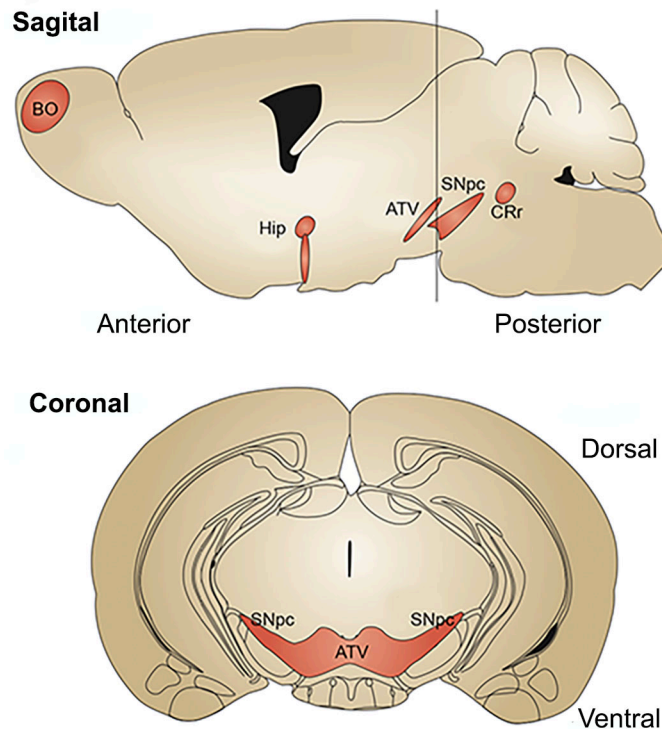


Figura 3. Poblaciones dopaminérgicas en el cerebro adulto de ratón. Esquema que representa la localización de las poblaciones de neuronas DA en el cerebro adulto. En la vista sagital se observa el bulbo olfatorio (OF), el hipotálamo (Hip), el área tegmental ventral (ATV), la *substantia nigra pars compacta* (SNpc) y el campo retrorubral (CRr). En la vista coronal, a nivel del mesencéfalo, se observa el ATV y la SNpc (modificado de Smidt y Burbach, 2007).

Durante el desarrollo embrionario, la gastrulación es el proceso por el cual se establecen las capas germinales: el ectodermo, el mesodermo y el endodermo; este proceso es paralelo a la migración de las células del epiblasto hacia el surco primitivo al tiempo que se establecen los ejes anteroposterior y mediolateral del embrión. Posteriormente, el ectodermo es instruido para formar tanto el tejido epidermal como el SNC, este último precedido por la formación del neuroectodermo o placa neural a partir del ectodermo

medio. Este proceso es regulado por señales provenientes del mesodermo, las cuales promueven la formación de un epitelio compuesto por células columnares que serán distintas a las células de la periferia que, a su vez, darán origen a las células epidermales. Una vez inducida la formación de la placa de piso, mediada por la notocorda, se origina un surco neural con dos pliegues laterales que eventualmente se fusionarán para formar el tubo neural; la formación de dicha estructura depende de cambios en la morfología de las células que componen el neuroepitelio y de la influencia del ectodermo epidermal adyacente a la placa neural [83,84]. Una vez que se forma el tubo neural, se establecen 5 vesículas que preceden a las diferentes estructuras del cerebro adulto, la formación de dichas vesículas se da por la expansión y constricción del neuroepitelio. En orden antero-posterior estas vesículas son: el telencéfalo, que en su región dorsal da origen a la corteza, hipocampo y lóbulos olfatorios, mientras que de la zona ventral derivan la eminencia gangliónica lateral (EGL, la cual genera el estriado), la eminencia gangliónica media (EGM) y la eminencia gangliónica caudal (EGC); el diencefalo, que produce el tálamo e hipotálamo; el mesencéfalo, que da origen a estructuras involucradas en la visión y el control del movimiento; el metencéfalo, del cual deriva el cerebelo, y el mielencéfalo que formará la médula oblonga y en su parte posterior la médula espinal. El metencéfalo y mielencéfalo, a su vez, están organizados en compartimentos más pequeños conocidos como rombómeros, los cuales dan origen a diversos linajes celulares [85].

Durante la formación del tubo neural se define el eje anteroposterior gracias a la expresión de tres genes: *Otx2*, *En1* y *Pax2* [86], la expresión de estos factores de

transcripción es inducida por el Istmo, organizador que se encuentra en la frontera del mesencéfalo con el metencéfalo [87]. En dicha región, Otx2 (el cual es un factor transcripcional involucrado en especificar el cerebro posterior) y Gbx2 se reprimen mutuamente [88]. La regionalización dorsoventral del mesencéfalo también está determinada por la acción de centros organizadores que secretan morfógenos; en este caso, la placa de techo, que se origina en la línea media dorsal, secreta miembros de la familia de proteínas morfogénicas de hueso (*bone morphogenetic proteins*: BMP) y de la vía de Wnt que, en conjunto, especifican a las neuronas dorsales a lo largo del eje anteroposterior del tubo neural [89,90].

Adyacente a la línea ventral del mesencéfalo, la señalización de Shh (*Sonic hedgehog*) y un miembro de la familia de los factores de crecimiento transformante β (Nodal), generados por el mesodermo precordial y la notocorda, promueven la formación de la placa de piso [91]. A su vez, la placa de piso produce Shh que, dependiendo de su concentración local, especifica diversas poblaciones neuronales con identidad ventral [91,92]. En el mesencéfalo, las poblaciones más ventrales están expuestas a concentraciones elevadas de Shh, el cual induce la formación de los núcleos dopaminérgicos alrededor de la línea media [93]. También en la región ventral, la señalización de Shh establece el núcleo ocular motor, constituido por neuronas motoras [94].

Durante la neurogénesis, Shh regula la expresión combinada de diversos genes de factores transcripcionales con homeodominio, lo cual establece un código que determina la identidad posicional de los precursores neurales y su capacidad para diferenciar a un

linaje neuronal específico [95]. En la región cercana a la línea media ventral del mesencéfalo, la expresión del factor de transcripción con homeodominios LIM (Lmx1a) determina qué precursores neurales producirán a las neuronas DA del mesencéfalo [93,96]. Por otro lado, la expresión de Nkx6.1, adyacente a la línea media, define bilateralmente los dominios que darán origen a las neuronas glutamatérgicas del núcleo rojo que, a su vez, mantienen la expresión de Nkx6.1 y adquieren la expresión de Brn3a [94,97] (Fig. 4).

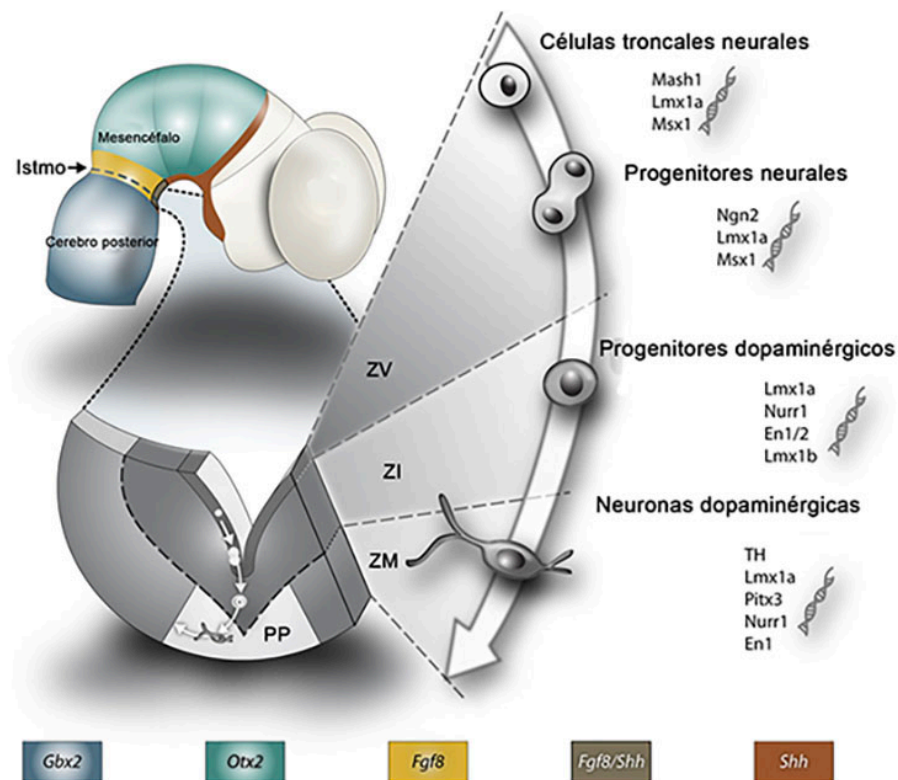


Figura 4. Desarrollo de las neuronas dopaminérgicas. Del lado superior izquierdo se muestra un esquema del SNC en el desarrollo temprano; en él se distinguen el mesencéfalo, el centro organizador (istmo) y el cerebro posterior. Además, los colores indican los dominios en los que se secretan los factores producidos por el istmo o la placa de piso. Los factores se indican en la parte inferior de la imagen. La vista coronal del SNC muestra la región del mesencéfalo donde las neuronas DA se generan y del lado izquierdo un acercamiento que muestra la vía de diferenciación de las neuronas DA con los factores involucrados en cada etapa. Placa de piso (PP), zona ventricular (ZV), zona intermedia (ZI), zona del manto (ZM) (modificado de Deierborg et al., 2008).

En cuanto al proceso de diferenciación de las neuronas DA mesencefálicas, se han identificado varios factores transcripcionales que actúan en distintas etapas del proceso de establecimiento del linaje [98]. En las primeras etapas, como ya se mencionó, *Otx1/2* establecen la región prospectiva del cerebro anterior y medio. En la frontera del mesencéfalo-metencéfalo, la expresión de *Otx1/2* define las zonas en las que los morfógenos *Shh* y *Fgf8* difunden y establecen diversos linajes neuronales incluyendo el dopaminérgico (Fig. 4). En las regiones ventrolaterales del mesencéfalo se logra la difusión de *Shh* hacia regiones más dorsales al tiempo que se reducen dramáticamente el número de neuronas DA y del núcleo rojo, todo esto gracias a la ausencia de *Otx2* y de la expansión ventral de *Nkx2.2*.

Se podría decir que la neurogénesis DA inicia con la conversión de las células de la PP en progenitores neurales. Aunque no se conocen los elementos responsables de dicha transición, ésta podría estar coordinada por la acción de la señalización canónica de *Wnt* que a su vez es activada por *Otx2* [96,99]. Alrededor del día E10.5, los niveles de expresión de *Shh* disminuyen probablemente por la acción de *Msx1*; en consecuencia, se induce la expresión de *Ngn2* que codifica para la Neurogenina 2: una proteína proneural [96,100]. Además, es posible que *Fox 1/2* también contribuye a la activación de *Ngn2*, lo cual refuerza la vía de diferenciación DA en el mesencéfalo [101].

Después de la inducción de la expresión de *Ngn2*, la neurogénesis continúa con la expresión de los genes *Nurr1* y *Pitx3*, que codifican para factores de transcripción que participan en la definición fenotípica terminal de las neuronas DA como la presencia de

la *Th*, el transportador de monoaminas 2 (*vesicular monoamine transporter 2: Vmat2*) y el transportador de dopamina [101–104]. Además, *Nurr1* y *Pitx3*, juegan un rol importante en el mantenimiento de las neuronas DA [105,106]. En neuronas inmaduras, la expresión de *Th* se activa por la acción cooperativa de *Foxa2* y *Lmx1a*; adicionalmente, es posible que *Nurr1* y *Foxa2* regulen la expresión de *Th* durante la diferenciación DA [107].

1.1.2 Evidencias de neurogénesis en la *substantia nigra pars compacta*.

Se creía que la formación de nuevas neuronas partiendo de la diferenciación de CTNs estaba limitada a la etapa de desarrollo embrionario; sin embargo, estudios que se realizaron hace algunas décadas demostraron que en mamíferos, incluyendo al humano, hay procesos neurogénicos asociados con el mantenimiento de la capacidad olfatoria y de la memoria [108–110]. En el cuerpo humano se reconocen nichos en los que residen células troncales adultas, y que la mayoría de dichas poblaciones además de mantener el recambio celular, también son capaces de responder ante un daño y mantener la función e integridad del tejido al cual pertenecen (por ejemplo, la piel [111]). En contraste, en el cerebro se ha demostrado contundentemente que existen al menos dos sitios de neurogénesis: el giro dentado del hipocampo en el que se generan células granulares, y la zona subventricular de los ventrículos laterales donde se generan neuroblastos migrantes que logran su diferenciación a interneuronas DAs cuando alcanzan el bulbo olfatorio [112]. En el humano, aún no se demuestra que el proceso neurogénico responsable de generar nuevas neuronas que se integran al bulbo olfatorio se mantenga en la etapa adulta.

La detección de células que se mantienen en proliferación y la identificación de células migrantes en el cerebro adulto, fueron los primeros indicios de la existencia del proceso neurogénico postnatal [109], aunque los datos no fueron corroborados hasta que dichos fenómenos se pudieron observar en el microscopio electrónico después de tratar a los animales con timidina tritiada (útil para marcar células provenientes de un proceso de división celular) [110]. En la actualidad, para seguir el proceso neurogénico del cerebro adulto es necesario contar con marcadores que nos permitan identificar CTNs, células con capacidad de autorrenovación y diferenciación a precursores neuronales o gliales, y, posteriormente, la identificación secuencial y ordenada de marcadores específicos de cada etapa en el proceso de diferenciación neuronal. Otra de las estrategias para identificar poblaciones de células troncales en el cerebro adulto, es la de probar su capacidad de formar en cultivo agregados de origen clonal que contienen CTNs, conocidos como neuroesferas, que pueden diferenciar tanto a neuronas, como a astrocitos y oligodendrocitos [113].

Como se ha mencionado, en la actualidad se sabe con claridad que existen dos sitios neurogénicos en el cerebro adulto; sin embargo, es posible que la baja proliferación y el bajo índice de recambio celular no permita la identificación de otros sitios de neurogénesis activa y, en consecuencia, existe una controversia en el campo. Uno de los sitios en los que se ha propuesto la existencia de una actividad neurogénica es la SNpc; inclusive se ha propuesto que en la SNpc se mantiene un proceso neurogénico a

lo largo de la vida del organismo pero en nivel muy bajo, por lo cual las herramientas actuales no nos permiten determinarlo de manera contundente [114,115].

Además de haberse reportado el aislamiento de CTNs del cerebro medio con la capacidad de formar neuroesferas, en el 2003 se realizaron estudios en los que se demostró que el número de neuronas DA de la SNpc era similar cuando se comparaba en ratones con distinta edad (desde los dos meses hasta los veinte meses), aunque sorpresivamente, también se identificaron células DA de la SNpc con marcadores de muerte celular [116]. El hecho de que hubiera muerte celular en la SNpc pero que el número de células se mantuviera a lo largo de la vida del ratón, sugiere que existe un proceso neurogénico en el que se generan nuevas células DA de dicha región del mesencéfalo. En el mismo estudio se demostró que después de una lesión, dicho fenómeno de neurogénesis se ve favorecido. No obstante, los resultados no pudieron ser corroborados por otro grupo de investigación [117]. A pesar de este último resultado, en 2016, utilizando un ratón transgénico capaz de impedir la expresión de la *Th* cuando la célula se encuentra en un estado troncal (Nes^+ ; antes de la diferenciación DA), se observó en el ratón una disminución en la población de neuronas DA de la SNpc después de inducir la activación del transgén. La reducción en el ratón transgénico después de 6 meses fue de apenas una octava parte de la población DA en la SNpc, lo que apoya la teoría del recambio lento [114].

Como se mencionó anteriormente, los síntomas primarios de la EP son el resultado de la pérdida de las neuronas DA de la SNpc, por lo que la posibilidad de plantear un

proceso regenerativo utilizando las células troncales del sitio es un tema muy atractivo para el propósito de desarrollar terapias alternativas a la farmacológica. No obstante, además de haber estudios que se contraponen a que exista un proceso neurogénico en la SNpc, existen pocos trabajos que se han enfocado a describir propiedades de la SNpc *in situ* y si ésta puede ser permisiva a la terapia de reemplazo celular.

En cuanto al estudio de sitios neurogénicos y a la búsqueda de estrategias que pudieran ayudar a identificarlos, en 2009 nuestro grupo de investigación encontró que las células derivadas de cuerpos embrioides (CE), agregados tridimensionales que recapitulan algunos aspectos del desarrollo temprano del embrión [118], son capaces de recibir señales de sitios neurogénicos durante el desarrollo temprano del embrión. Así, dichas células se diferencian a neuronas DAs cuando son implantadas en el mesencéfalo ventral de embrión (nicho dopaminérgico) o a neuronas gabaérgicas cuando son implantadas en el núcleo rojo. Otras células con capacidad pluripotente (CTEs) y multipotente (PNs) no diferenciaron de la misma forma [67]. Más adelante nos preguntamos si las células de CE eran capaces de responder a señales neurogénicas del cerebro de ratas en la etapa posnatal (24 días de edad) ; las células derivadas de CEs mostraron una diferenciación neurogénica progresiva cuando fueron implantadas cerca del ventrículo lateral, corroborando la capacidad de los CE para detectar sitios neurogénicos. De manera interesante, cuando las células de CE fueron trasplantadas a la SNpc de ratas adultas (2 meses de edad) éstas diferenciaron a neuronas (Neu-N⁺) después de 30 días, pasando por los estadios previos de CTNs y neuroblasto (Nes⁺ y Dcx⁺ respectivamente); sin embargo, el fenotipo neuronal no fue dopaminérgico [69] (Fig.

5). Lo anterior nos permitió inferir que en la SNpc existen señales de especificación y diferenciación neuronal. En cuanto a la ausencia de diferenciación DA planteamos tres posibilidades, la primera, que la SNpc carece de señales de especificación y diferenciación DA; la segunda, que posee señales que reprimen la diferenciación DA; y, por último, que las señales de especificación y diferenciación DA de la SNpc, en caso de ser un sitio neurogénico DA, no pueden ser interpretadas por las células de los CE. Para descartar algunas de estas posibilidades, una línea celular con alto potencial DA y pocos requerimientos exógenos sería una herramienta ideal para evaluar la existencia o la carencia de propiedades de inducción y diferenciación DA de la SNpc.

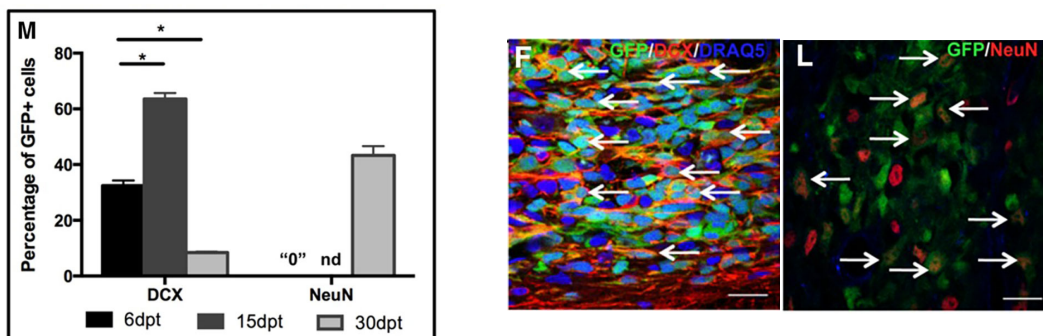


Figura 5. Diferenciación neuronal de CEs trasplantados en la SNpc. Las células derivadas de CEs (GFP⁺) trasplantadas a la SNpc diferencian a neuroblastos (Dcx⁺) 15 días post-trasplante (dpt) y a neuronas (NeuN⁺) 30 dpt. La ausencia de expresión de Th indica la nula diferenciación a células DA. La gráfica muestra el porcentaje de células GFP⁺ que coexpresan los marcadores de diferenciación neural 6, 15 y 30 dpt (Modificado de Maya et al., 2015).

1.2.3 Estrategias para la diferenciación de células troncales pluripotentes a neuronas dopaminérgicas *in vitro*.

Gracias a las características de las CTEs se han ideado numerosos protocolos para derivar células DA a partir de ellas. En algunos protocolos, se permite el crecimiento y la

diferenciación no específica de las células para después seleccionar aquellas con la identidad deseada, sin embargo, es de hacer notar que muestran alto grado de variedad en los tipos celulares generados y bajo porcentaje de células con fenotipo DA [107]. En otros métodos las CTEs son co-cultivadas con células estromales que promueven la diferenciación DA, en este caso el riesgo de contaminación con células que proliferan se incrementa y el número de células DA obtenido es aún bajo [119]. En otros intentos de generar células DA derivadas de CTEs se ha utilizado la adición *in vitro* de una gran variedad de moléculas presentes en etapas tempranas del desarrollo del mesencéfalo para establecer condiciones definidas que favorezcan dicha diferenciación. Aunque se ha logrado así aumentar los porcentajes de diferenciación, se requieren tiempos prolongados de cultivo y en algunos casos la identidad neuronal resultante no es la adecuada [107].

Con los avances en el estudio de los factores de transcripción que controlan la diferenciación DA, la posibilidad de utilizarlos para inducir la diferenciación DA de células troncales es muy prometedora, inclusive, en la actualidad parece ser la estrategia con mejores resultados. Podría esperarse que la expresión ectópica de uno o varios genes maestros en la diferenciación DA sea suficiente para inducir programas específicos de diferenciación neuronal, sin embargo, el éxito de encontrar el gen o genes maestros en general ha sido bajo, debido a las combinaciones específicas expresadas en cada PN y sus niveles de expresión. La efectividad de un gen maestro puede definirse por su habilidad de promover la diferenciación específica de un precursor en la etapa de diferenciación más temprana posible. En este sentido, el gen maestro más efectivo sería

aquel que de manera individual promueva la diferenciación específica de una CTE. En el caso de la diferenciación DA parece ser que ninguno de los factores involucrados en la especificación y diferenciación tiene la habilidad de inducir la diferenciación específica a partir de CTEs.

La sobreexpresión de *Nurr1*, también llamado *Nr4a2*, gen que codifica para un factor de transcripción involucrado en definir características terminales de la diferenciación DA, sobre CTNs obtenidas de distintas regiones del cerebro y cultivadas en monocapa o después de formar neuroesferas, induce la expresión de *Th*, sin embargo, no se obtienen otras características de las neuronas DA [120]. Cuando se induce la sobreexpresión de dicho factor en PNs derivados de CTEs, se promueve la expresión de *Th* y otros marcadores DA como el transportador de dopamina, pero no hay influencia alguna sobre otros factores de especificación DA mesencefálica [121]. Por otra parte, la expresión de *Pitx3*, un factor transcripcional que posee funciones similares a *Nurr1* y que es también importante en el mantenimiento de las neuronas DA mesencefálicas, no es suficiente para promover el fenotipo DA mesencefálico al sobreexpresarlo en CTEs indiferenciadas o en PNs derivados de CTEs. Incluso, la expresión conjunta de *Nurr1* y *Pitx3* no es suficiente para alcanzar el destino DA mesencefálico [122,123].

En contraste, la sobreexpresión de *Lmx1a* mediada por la activación del promotor de *Nestina* (expresión temporal) en CTEs tratadas con FGF8 y SHH promueve la diferenciación eficiente a neuronas inmaduras que, además de expresar *Th*, expresan otros marcadores específicos de neuronas DA con identidad mesencefálica. Esta diferenciación altamente específica es observada en uno de los protocolos más robustos

de diferenciación neuronal a partir de CTEs (protocolo de diferenciación de cinco etapas) y en otras condiciones de cultivo (cultivo en monocapa), indicando que la acción de *Lmx1a* no depende de condiciones particulares de cultivo. Cabe mencionar que las células Th^+ obtenidas de las células control además de expresar *Th*, y no otros marcadores mesencefálicos, expresan marcadores de neuronas gabaérgicas [93,124]. Estas observaciones también se han hecho en células humanas [125].

Tomando en cuenta lo anterior, una línea de CTEs que sobreexpresa *Lmx1a* bajo el promotor de *Nestina*, sería una línea que ofrecería altas probabilidades para estudiar las propiedades neurogénicas de la SNpc.

2. Hipótesis.

La SNpc de rata en la etapa adulta es permisiva a la diferenciación dopaminérgica de células troncales embriónicas de ratón con alto potencial dopaminérgico mesencefálico.

3. Objetivo general.

Evaluar si la SNpc de rata en la etapa adulta es un sitio permisivo a la diferenciación dopaminérgica de células troncales embriónicas con alto potencial dopaminérgico mesencefálico.

4. Objetivos particulares.

1. Generar una línea de CTEs a partir de la línea R1B5 que exprese de manera estable el factor de transcripción *Lmx1a* bajo el promotor de *Nestina*.
2. Corroborar el potencial neurogénico dopaminérgico *in vitro* de la línea de CTEs que exprese de manera estable el factor de transcripción *Lmx1a* bajo el promotor de *Nestina*.
3. Evaluar el potencial neurogénico dopaminérgico *in vivo* de la línea de CTEs que exprese de manera estable el factor de transcripción *Lmx1a* bajo el promotor de *Nestina*.

5. Materiales y métodos.

5.1 Generación de la línea de células troncales embriónicas de ratón que

expresa *Lmx1a* bajo el promotor de *Nestina*.

Para generar la línea transgénica de CTEs que sobreexpresa el factor de transcripción *Lmx1a* en respuesta a la activación del *enhancer* del promotor de *Nestina* (R1B5/*Nes-Lmx1a*), se utilizó la línea de CTEs de ratón R1B5 que expresa de manera constitutiva el gen de la proteína verde fluorescente mejorada (GFP: *enhanced green fluorescent protein*; línea donada por el Dr. Andras Nagy) bajo el promotor híbrido de la actina de pollo y el promotor del citomegalovirus. Inicialmente fue necesario amplificar las CTEs sobre una cama de células alimentadoras (fibroblastos embrionarios de ratón mitomizados), utilizando medio para el crecimiento de CTEs (también llamado M15) compuesto por medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM: *Dulbecco's modified Eagle's medium*, Gibco) suplementado con 15% de suero fetal de bovino (FBS: *fetal bovine serum*, Gibco o Hyclone), GPS (Glutamax 1x, Gibco; penicilina 0.3 mg/mL y estreptomicina 0.5 mg/mL, Sigma), aminoácidos no esenciales 1x (de un *stock* a 100x, Gibco), 2-mercaptoetanol 0.55 mM (Sigma) y 1,000 U/mL de factor inhibidor de leucemia (LIF: *leukemia inhibitor factor*, Chemicon). Las células fueron electroporadas para introducirles el vector *pNesE-Lmx1a* (donado por la Dra. Elisabet Andersson), 24 h después de que las células fueran sembradas se añadió al medio G418 (Sigma) para hacer la selección de clonas. Las clonas seleccionadas fueron cultivadas y expandidas por separado durante 14 días de la misma forma en la que se expandieron las células R1B5 (ver protocolo detallado en el apartado de anexos).

5.2 Diferenciación neural *in vitro* de las células troncales embriónicas.

Con la finalidad de evaluar la expresión del transgén en las clonas seleccionadas, éstas fueron sometidas a un protocolo de diferenciación neural en monocapa [126]. Para ello, las células fueron sembradas en un plato de cultivo cubierto con gelatina al 0.1% de piel de porcino (Sigma) e incubadas de 12 a 15 h en medio M15. Después de la incubación se retiró el medio de las cajas y la superficie se lavó dos veces con *buffer* salino de fosfatos (PBS: *phosphate-buffered saline*) para después ser cultivadas con medio N2B27 compuesto por 50% DMEM/F12 con HEPES (Gibco), 50% de medio Neurobasal (Gibco) y suplementado con N2 y B27 a 1x (De *stocks* a 100x y 50x respectivamente, Gibco). Después de 4 días en cultivo se extrajo el ácido ribonucleico (RNA: *ribonucleic acid*; ver anexo) de los PNs para determinar los niveles de expresión del transgén *pNesE-Lmx1a*.

Para realizar la diferenciación neuronal DA se llevó a cabo el protocolo de diferenciación de 5 etapas [124]; brevemente, las CTEs fueron expandidas sobre una monocapa de células alimentadoras y se incubaron en medio M15 más un inhibidor selectivo de Gsk3 β y uno de Mek1/2, CHIR99021 (3 μ M) y PDO325901 (1 μ M), respectivamente (los dos de Stegmet). Una vez que las CTEs alcanzaron entre el 80 y 90 % de confluencia se subcultivaron a otra monocapa de células alimentadoras y se incubaron durante 3 días con medio M15 sin los inhibidores. Posteriormente, las células se subcultivaron en una caja recubierta con gelatina de piel de porcino con M15 suplementado con LIF hasta que alcanzaron una confluencia entre el 80 y 90% (Etapa 1: crecimiento de CTEs sin células

alimentadoras). Después, las células fueron sembradas en cajas bacteriológicas con propiedades no adherentes durante 4 días, realizándose un cambio de medio a las 48 h (Etapa 2: formación de CEs). Para la selección de los PNs (Etapa 3), los CEs fueron sembrados en condiciones adherentes (cajas cubiertas con gelatina) e incubados en M15 durante 24 h y después en medio de selección compuesto por DMEM/F12 sin HEPES, 1x de insulina/transferrina/selenio/piruvato de sodio (ITS, Gibco) y 1x de GPS, durante 7 días con cambios de medio cada 24 ó 48 h, dependiendo de la acidez del medio. Para expandir los PNs (Etapa 4) las células disociadas con tripsina al 0.05% fueron sembradas en placas de cultivo de 24 pozos previamente tratadas con poli-D-lisina (10 mg/mL, Sigma) y fibronectina (1 mg/mL, Gibco), en esta etapa se utilizó DMEM/F12 sin HEPES, suplementado con 10 ng/mL de Fgf2, 100 ng/mL de Fgf8; y 500 ng/mL de Shh (todos los factores de Prepotech), también llamado medio de expansión de PNs. Esta etapa duró 7 días con cambios de medio cada 24 ó 48 h dependiendo de la acidez del medio. Con la finalidad de promover la diferenciación terminal hacia el fenotipo neuronal DA (Etapa 5), el medio fue sustituido por medio de diferenciación (medio de expansión sin suplementos) y se mantuvieron durante 6 días con cambios de medio cada 24 ó 48 h (ver protocolo detallado en el apartado de anexos). Se realizaron inmunomarcajes y se extrajo RNA de las etapas cuatro y cinco con el fin de evaluar la expresión de genes de diferenciación neural, neuronal y la expresión del transgén *pNesE-Lmx1a* (ver protocolo detallado en el apartado de anexos). Las determinaciones se realizaron en tres cultivos diferentes.

5.3 Animales y procedimientos de trasplante.

Los animales utilizados en los experimentos fueron alojados dentro de barrera de ambiente controlado con un ciclo de luz/obscuridad de 12 h, con acceso *ad libitum* a comida y agua. Todos los procedimientos fueron revisados y autorizados por el Comité Interno para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL; protocolo MGC08) del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM y por el comité de bioética del Instituto de Biotecnología de la UNAM.

5.4 Implante de células de cuerpos embrioides en el explante de mesencéfalo ventral de embrión de ratón.

Con la finalidad de evaluar la capacidad de la sobreexpresión de *Lmx1a* para promover la diferenciación DA, decidimos implantar las células de CEs en el contexto del desarrollo embrionario (explantes de mesencéfalo embrionario) [67,127], tanto en el sitio en el cual se generan las neuronas DA mesencefálicas como en un sitio donde el fenotipo dopaminérgico es reprimido: la línea media del mesencéfalo y la región dorsal del mesencéfalo, respectivamente. Brevemente, las hembras donantes de embriones de la cepa CD1 fueron sacrificadas por dislocación cervical al día 10.5 postcoital (E 10.5; el día de detección del tapón vaginal se consideró como E 0.5), los embriones se recuperaron del útero y se extrajeron del saco amniótico con ayuda de unas pinzas de disección. Bajo el microscopio estereoscópico los mesencéfalos se obtuvieron realizando un corte en la flexura cefálica y un corte posterior a la altura del labio rómbico y colocaron en una gota de colágena de rata con la superficie ventricular hacia arriba. Con ayuda de

una pipeta Pasteur estirada se tomó la suspensión de CEs y se trasplantaron a los sitios deseados en el explante. Los explantes con implantes se cultivaron por 4 ó 7 días (ver protocolo detallado en el aparatado de anexos).

5.5 Trasplante de precursores neurales en el cerebro adulto de rata.

Para evaluar el potencial DA de los PNs de la 4^{ta} etapa del protocolo de diferenciación de 5 etapas, éstos fueron recuperados de la caja de cultivo al 6^{to} día de la etapa de expansión de PNs. Se realizó una suspensión de PNs en medio Optimem (Gibco) y se trasplantaron mediante una cirugía estereotáxica en la SNpc del cerebro adulto de ratas, siguiendo las coordenadas -4.7 mm, -1.6 mm y -8.1 mm; posterior, lateral y ventralmente con respecto a *bregma*. De uno a dos microlitros de una suspensión de PNs (aproximadamente 150,000 células) fueron inyectados con ayuda de una jeringa Hamilton. Para realizar el trasplante, los animales fueron anestesiados con una mezcla de xilacina (8 mg/kg, PiSA) y ketamina (10 mg/kg, PiSA) posteriormente fueron sacrificadas con una sobredosis de pentobarbital (PiSA) a los 6 dpt.

5.6 Trasplante de células de cuerpos embrioides en el cerebro adulto de rata.

Las células recuperadas de CEs del cultivo fueron trasplantadas siguiendo el método descrito para el trasplante de PNs; lo anterior se realizó tanto en ratas intactas y con lesión de 6-OHDA (ver más adelante). La evaluación de los trasplantes de células de CEs se realizó a los 6 y 15 dpt.

Para realizar la lesión, los animales fueron anestesiados con xilacina/ketamina como se ha descrito anteriormente y, mediante cirugía estereotáxica, se inyectaron 0.5 mL de 6-OHDA (Sigma) disuelta en solución salina en un rango de 0.1 mL por minuto en el hemisferio izquierdo, utilizando las coordenadas para la SNpc (mismas utilizadas para el trasplante celular).

Se evaluó a 6 dpt y 15 dpt el potencial de diferenciación de tres cultivos diferentes de cada una de las líneas (R1B5 y R1B5/Nes-Lmx1a) y en cada una de las condiciones: intacta y lesionada. En cada condición de cada cultivo evaluado se trasplantaron tres ratas y de cada cerebro obtenido se hizo la evaluación en dos campos visuales en dos cortes.

5.7 Procesamiento de tejido e inmunomarcajes.

Con la finalidad de evaluar la expresión de ciertos genes en el protocolo de diferenciación neuronal DA, se fijaron células de la 4ª etapa y 5ª etapa. Para la fijación, se retiró el medio de las cajas y se lavaron dos veces con PBS 1x estéril para después agregar 500 µl de paraformaldehído (PFA, Sigma) al 4% frío (~ 4°C) y se incubaron durante 10 min a temperatura ambiente (TA); posteriormente, se lavaron 3 veces con PBS 1x y se almacenaron a 4°C. El tejido embrionario fue fijado con PFA al 4% por 2 h a 4°C con agitación moderada. Posteriormente se hicieron 3 lavados de 15 min a 4°C con PBS 1x para después ser incubados con sacarosa al 30 % (disuelta en PBS; J. T. Baker) durante

24 h. Los tejidos fueron embebidos en Tissue-Tek[®] (Sakura Finetek) y cortados en secciones coronales de 10 μm de grosor en un criostato a -20°C . El tejido se asoció a portaobjetos de cristal con carga positiva.

Para analizar las células trasplantadas al cerebro de rata se realizó perfusión intracardiaca en los animales sacrificados con pentobarbital, primero con PBS seguido de PFA al 4%, las dos soluciones se mantuvieron en hielo durante el procedimiento. Antes de realizar los cortes en congelación, los cerebros fueron secuencialmente deshidratados con sacarosa al 10%, 20% y 30% (24 h en cada solución). Se obtuvieron cortes coronales de 45 μm que fueron almacenados a -80°C en una solución anticongelante constituida por 60% de agua destilada, 20% de etilenglicol y 20% de glicerol.

Después de la fijación, el tejido o las células cultivadas fueron sometidos a un proceso de inmunomarcaje para detectar la expresión de genes de diferenciación neural o neuronal. Los protocolos utilizados y la lista de anticuerpos utilizados se pueden consultar en el apartado de anexos.

Las células y el tejido procesado fueron analizados utilizando microscopía de epifluorescencia o microscopía confocal como se detallará más adelante.

5.8 Extracción de RNA y PCR cuantitativo.

Con la finalidad de corroborar la expresión del transgén en la línea R1B5/Nes-Lmx1a, se realizó una extracción de RNA en la 4ª etapa del protocolo de diferenciación neuronal DA para evaluar la expresión de *Nestina* y *Lmx1a*. La extracción de RNA también se realizó en la 5ª etapa de dicho protocolo para corroborar el potencial neurogénico dopaminérgico de la línea.

Para la medición de RNA se utilizaron al menos 1×10^6 células provenientes de la 4ª y 5ª etapa del protocolo de diferenciación neuronal DA. Se hizo la extracción en dos cultivos independientes. La extracción de RNA se realizó de acuerdo con las especificaciones del fabricante del Riboex (GeneAll; ver anexo). Una vez que se extrajo el RNA se evaluó la integridad en un gel desnaturante con *buffer* de urea al 10 M y 2% de azul de bromofenol (Sigma) y se descartó la presencia de DNA genómico realizando una PCR (*polymerase chain reaction*) con el RNA obtenido de las muestras y oligonucleótidos capaces de distinguir entre RNA mensajero (*messenger* RNA: mRNA,) de DNA genómico (oligos par el gen *Th*; revisar anexos). Posteriormente se realizó la síntesis de cDNA (*complementary* ADN) utilizando la enzima AMV *Reverse Transcriptase* (Invitrogen) y oligo-dT₁₆ (Collaborative Research) siguiendo las instrucciones del fabricante.

El PCR cuantitativo (*Quantitative* PCR: qPCR) se realizó utilizando KAPA SYBR FAST mix (KAPA Biosystems) utilizando oligonucleótidos específicos para *Nestina*, *Lmx1a*, *Lmx1a* proveniente del transgén (Lmx1aTg) y *Th*. Los oligonucleótidos fueron probados

previamente por PCR de punto final para su especificidad y rango de T_M , la cual quedó, para todos los oligonucleótidos en 60°C.

Se utilizó un termociclador Rotor-Gene 3000 (Qiagen). La curva de calibración se realizó utilizando el gen constitutivo *Rplp0* o *Ciclofilina*, midiéndolo en 4 diluciones (1:1, 1:10, 1:100 y 1:1000) por muestra. La expresión fue evaluada utilizando el método del ΔC_t que consiste en obtener el C_t de un gen referencia (*Rplp0* o *Ciclofilina*) y del gen problema. El ΔC_t se obtiene restando el C_t del gen problema menos el C_t del de referencia y la expresión se obtiene de la ecuación $2^{-\Delta C_t}$.

5.9 Obtención de imágenes y conteo celular.

La cuantificación celular en cultivo se realizó en imágenes capturadas en un microscopio Zeiss AxioVision utilizando el *software AxioVison LE*; o bien mediante el conteo directo desde los oculares del equipo. El conteo se realizó en dos campos diferentes de cada cultivo con magnificación de 40x o 60x. En el caso de las células trasplantadas, las imágenes se obtuvieron en un microscopio de láser multifotónico Olympus FV1000 en modo confocal. Las capturas en 60x se realizaron con un objetivo de inmersión UPLSAPO 60XS con apertura numérica de 1.3; las capturas en 40 x fueron con el objetivo UPLFL 40X con apertura numérica de 0.75. En los dos casos las imágenes generadas fueron de 1024x1024 pixeles con una resolución de 4.8 pixeles/ μm en la captura a 60x y 3.2 pixeles/ μm en en la captura a 40x. Las imágenes en tres dimensiones (X, Y, Z) tuvieron una profundidad de hasta 30 μm realizado una captura

cada micra en el plano Z. De cada cerebro trasplantado se analizaron al menos dos campos de dos cortes (tres cerebros por cada trasplante). La cuantificación de las células que tuvieron doble inmunomarcaje se hicieron en planos tridimensionales (capturas continuas en el plano espacial Z). Cuando fue necesario se realizó una prueba comparativa de *t de Student* (muestras independientes; ver resultados).

6. Resultados.

6.1 Generación de una línea con mayor potencial dopaminérgico.

Cuando las células derivadas de CEs de la línea R1B5, que expresa la GFP, son trasplantadas a la zona subventricular de los ventrículos laterales del cerebro adulto (sitio neurogénico), el estriado lesionado o la SNpc, muestran capacidad de diferenciación neuronal; sin embargo, y en contraste con la diferenciación específica observada cuando son implantadas en el nicho embrionario de diferenciación dopaminérgica (línea media del mesencéfalo embrionario [67]), el destino de diferenciación es escasamente DA [69]. Lo anterior puede deberse a la falta de señales de especificación y diferenciación DA en el cerebro adulto, o bien, a la presencia de señales que reprimen tal fenotipo. Con la finalidad de responder este cuestionamiento era necesario contar con un sistema sensor de sitios neurogénicos, pero con requerimientos mínimos en la vía de diferenciación neuronal DA.

En la última década se ha demostrado que la expresión forzada de *Lmx1a* dirigida por la activación del promotor de *Nes* incrementa la capacidad de las CTEs de diferenciar a neuronas DA *in vitro*. Esto se ha demostrado tanto en células humanas como de ratón y utilizando distintos protocolos de especificación y diferenciación neuronal [93,124]; además, las neuronas DA resultantes poseen marcadores de identidad mesencefálica, mientras que las células control expresan, además de marcadores DA (usualmente *Th*), marcadores de otros tipos neuronales, apuntando a una posible diferenciación aberrante que no debe de ser clasificada como dopaminérgica. Tomando en cuenta lo anterior,

decidimos utilizar dicha herramienta para evaluar la permisividad de la SNpc a la diferenciación DA. Así, generamos una línea de CTEs que expresa el transgén *NesE-Lmx1a* y usando como base la línea R1B5 (Fig. 6 A). Las células transfectadas fueron neuralizadas mediante el protocolo de diferenciación neural en monocapa (Fig. 6 B) [128] y fueron seleccionadas dos clones en las que se detectó la expresión *Nestina* y del transgén *NesE-Lmx1a* (R1B5/NesE-Lmx1a/C3 y R1B5/NesE-Lmx1a/C5; Fig. 6, C). De dichas clonas, la clona 3 (de aquí en adelante llamada R1B5/NesE-Lmx1a), no sólo mostró una mayor expresión de *Lmx1a*, sino también una diferenciación DA más consistente en cultivo y por dichas razones fue la utilizada para los experimentos de implante en el mesencéfalo ventral de embrión y en las ratas adultas.

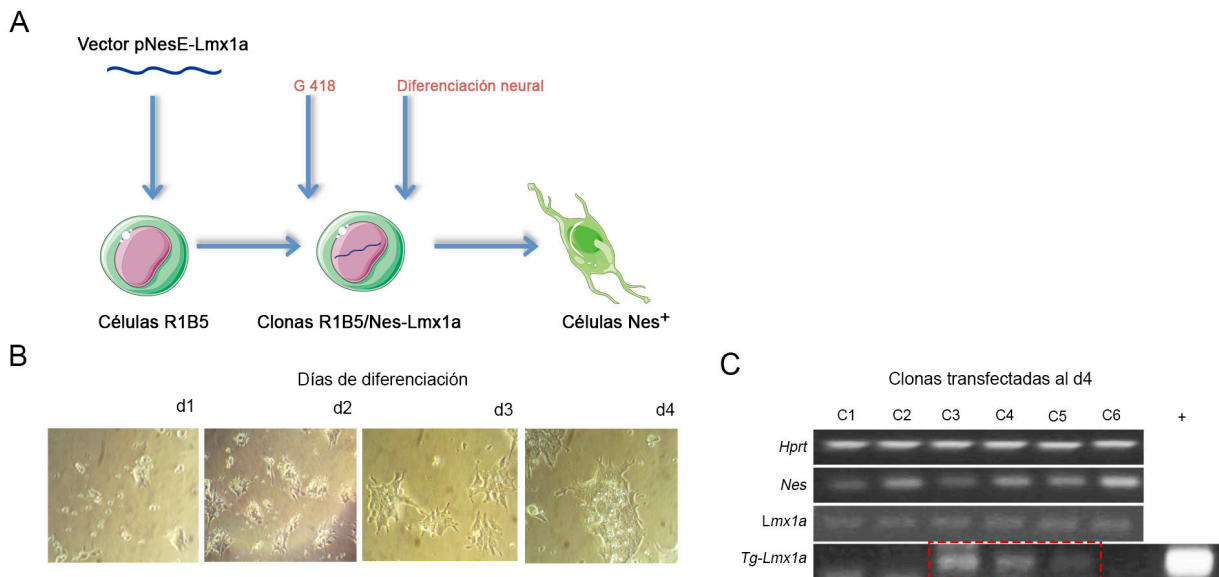


Figura 6. Generación de la línea R1B5/NesE-Lmx1a. (A) Representación esquemática de la estrategia utilizada en la generación y selección de las células de la línea R1B5 que expresaron el transgén *NesE-Lmx1a* cuando fueron diferenciadas a PNs. (B) Imágenes representativas de las células R1B5 transfectadas con *NesE-Lmx1a* y sometidas al protocolo de diferenciación neural en monocapa. (C) Expresión de *Nes*, *Lmx1a* y *Tg-Lmx1a* en las clonas transfectadas al día 4 del protocolo de diferenciación. Los niveles de expresión cualitativa de *Nes*, *Lmx1a* y *Tg-Lmx1a* fueron evaluados con RT-PCR. El recuadro rojo indica las clonas con expresión detectable del *Tg-Lmx1a* en la etapa de PNs; como control positivo se usó una alícuota del plásmido.

6.2 La sobreexpresión de *Lmx1a* promueve la diferenciación dopaminérgica fuera del nicho endógeno.

Para corroborar que nuestras clonas generadas a partir de la línea R1B5 tuvieran un potencial DA incrementado, se realizó un protocolo de diferenciación de 5 etapas, un protocolo robusto y ampliamente utilizado para la diferenciación neuronal [129]; dicho protocolo se llevó a cabo con la línea R1B5/NesE-Lmx1a (Fig. 7, A) y los resultados de la eficiencia de diferenciación fueron comparados con la línea parental. Asimismo, aprovechamos la expresión de la GFP para mostrar la distribución de las células durante la progresión del cultivo entre la línea R1B5 y la línea R1B5/NesE-Lmx1a (Fig. 7, B), sugiriendo que la expresión de *Lmx1a*, o cualquier evento durante la selección de clonas, no afectó el potencial de diferenciación neural. Observamos un efecto positivo de la expresión exógena de *NesE-Lmx1a* sobre la diferenciación neural hacia la 4ª etapa, encontrando no solo más agregados celulares con células *Lmx1a*⁺, sino también un mayor porcentaje de células *Lmx1a*⁺/*Nes*⁺ al comparar los precursores neurales expandidos de la línea R1B5/NesE-Lmx1a contra la línea R1B5 (94.5% vs. 7.8%, n = 3; Fig. 2, C). En consistencia con lo anterior, se detectó una mayor expresión de *Lmx1a* total (endógeno y proveniente del transgen) en precursores neurales de la línea R1B5/NesE-Lmx1a comparando con los precursores neurales de la línea control (Fig. 7, E).

El efecto sobre la diferenciación neuronal DA de la expresión exógena de *Lmx1a* fue evaluado en la 5ª etapa del protocolo de diferenciación, contabilizando el número de agregados celulares en los que hubiera células *Th*⁺ y la cantidad de células *Th*⁺ en cada agregado (Fig. 7, D y F). Encontramos un número sustancialmente mayor de agregados que contenían células *Th*⁺ en los cultivos de la línea R1B5/NesE-Lmx1a que en los de la línea R1B5 (94.4%, n = 3 vs. 38%, n = 2), dato que correlaciona muy bien con el mayor número de agregados *Lmx1a*⁺ observados en la etapa cuatro. Adicionalmente, la proporción de células *Th*⁺ en los agregados de la quinta etapa fue también mayor en la línea R1B5/NesE-Lmx1a que en la línea R1B5 (61%, n = 3 vs. 4%, n = 2). Los niveles de expresión de *Th* fueron consistentes al observar una mayor expresión en la línea

R1B5/NesE-Lmx1a comparando con la línea R1B5 (Fig. 7, F). Estos resultados muestran que la sobreexpresión de *Lmx1a* en la línea transgénica promueve la diferenciación DA desde etapas tempranas (durante la neuralización de las células que es cuando se expresa *Nes*) y tardías de la diferenciación, al tomar en cuenta el número de agregados que tienen células TH⁺ y el número de células Th⁺ en cada uno de ellos.

La capacidad del transgen *NesE-Lmx1a* para promover la diferenciación DA fue también evaluada en el contexto del desarrollo embrionario (*ex vivo*). Se ha demostrado que las células de los CEs pueden ser específicamente instruidas para diferenciar a neuronas DA mesencefálicas cuando se exponen a las señales presentes en el nicho embrionario donde se generan las neuronas DA mesencefálicas (entre el día E9.0 y el día E10.5); dicha diferenciación de las células de CEs es gradual, pasando por precursores neurales Nes⁺/Lmx1a⁺ hasta diferenciar a neuronas posmitóticas Th⁺. En contraste, cuando las células de CEs se implantan en sitios lejanos a la línea media del mesencéfalo ventral, éstas se diferencian a otros fenotipos no DA dependiendo del sitio donde se integren [67]. Utilizando esta estrategia, células derivadas de CEs de la línea R1B5 o R1B5/NesE-Lmx1a fueron trasplantadas sobre la superficie ventricular de explantes de mesencéfalo en E10.5 para evaluar su capacidad de diferenciación intrínseca (fuera del nicho DA endógeno) después de 4 o 7 días post-implantación (dpi; Fig. 8, A). Al día 4 de cultivo, las células de la línea R1B5/NesE-Lmx1a implantadas en la región ventral (dominio DA) fueron en la mayoría de los casos evaluados positivas para los marcadores *Nes* y *Lmx1a* (cinco de seis casos), pero en ningún caso se encontraron células Th⁺ (cero de 6 casos; Fig. 8, B y C); estos resultados son equiparables con lo observado en la línea R1B5 y consistentes con lo antes reportado [67,127]. En contraste, cuando las células de CEs derivadas de la línea R1B5 se implantaron en la región dorsal (dominio no DA) y fueron evaluadas a 4 dpi, éstas no adquirieron el marcador *Lmx1a* mientras que las células derivadas de la línea R1B5/NesE-Lmx1a generaron, en algunos casos, células Lmx1a⁺ (dos de cuatro casos; Fig. 8, B y C). Al día 7, las células derivadas de CEs de la línea R1B5/NesE-Lmx1a dieron lugar a células que co-expresaron *Lmx1a* y *Th*, tanto en la región ventral como en la dorsal (seis de once casos y tres de ocho casos, respectivamente), mientras que las células de CEs derivadas de la línea R1B5 sólo

mostraron la co-expresión de dichos marcadores cuando fueron implantadas en el dominio DA (tres de cuatro casos; Fig. 8, B y C). Debido a que el *Lmx1a* endógeno se activa sólo cuando las células se integran en la línea media o cercanas a ella, nuestros resultados demuestran que la promoción de la diferenciación DA mediada por la activación del transgen *NesE-Lmx1a* se da cuando las células adquieren el fenotipo neuronal (Nes^+); además, el hecho de que varias de las células $Nes^+/Lmx1a^+$ no se diferenciaron a células Th^+ en la región dorsal, indica que existen factores adicionales en el nicho DA que son necesarios para completar la diferenciación neuronal DA, lo cual concuerda con lo observado al utilizar PNs dopaminérgicos tempranos en este mismo modelo [130].

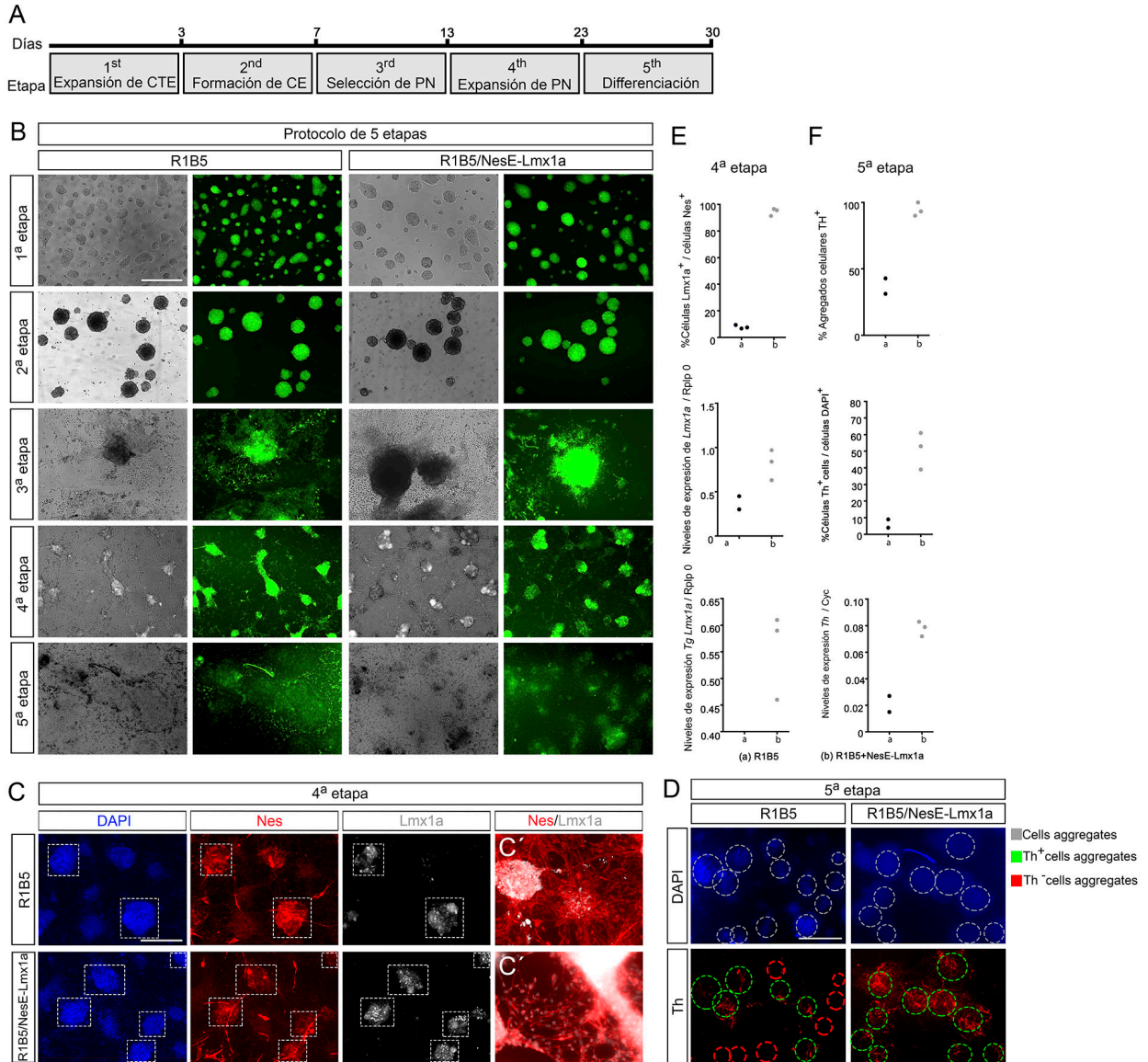


Figura 7. Diferenciación DA *in vitro* de la línea R1B5/NesE-Lmx1a. (A) Esquema de la diferenciación neural DA a través del protocolo de 5 etapas. (B) Imágenes en campo claro y fluorescencia (GFP) de las células en cada una de las etapas del protocolo de diferenciación. (C) Identificación de los PNs dopaminérgicos (Nes⁺/Lmx1a⁺); los cuadros punteados marcan los agregados celulares Nes⁺/Lmx1a⁺. (C') PNs en el área de interagregados. (D) Identificación de las neuronas DA (Th⁺) en los agregados celulares; los círculos punteados delimitan los agregados celulares que contienen o no contienen células Th⁺ (verdes y rojos, respectivamente). (E) Cuantificación de los PNs dopaminérgicos (células Lmx1a⁺/células Nes⁺) y determinación por qPCR de los niveles de expresión de *Lmx1a* en la etapa 4. (F) Cuantificación de las neuronas DA en la 5^a etapa del protocolo de diferenciación y determinación por qPCR de los niveles de expresión de *Th*. Escala 500 μ m. Los puntos negros en las gráficas corresponden a la línea R1B5 y los puntos grises a la línea R1B5/NesE-Lmx1a.

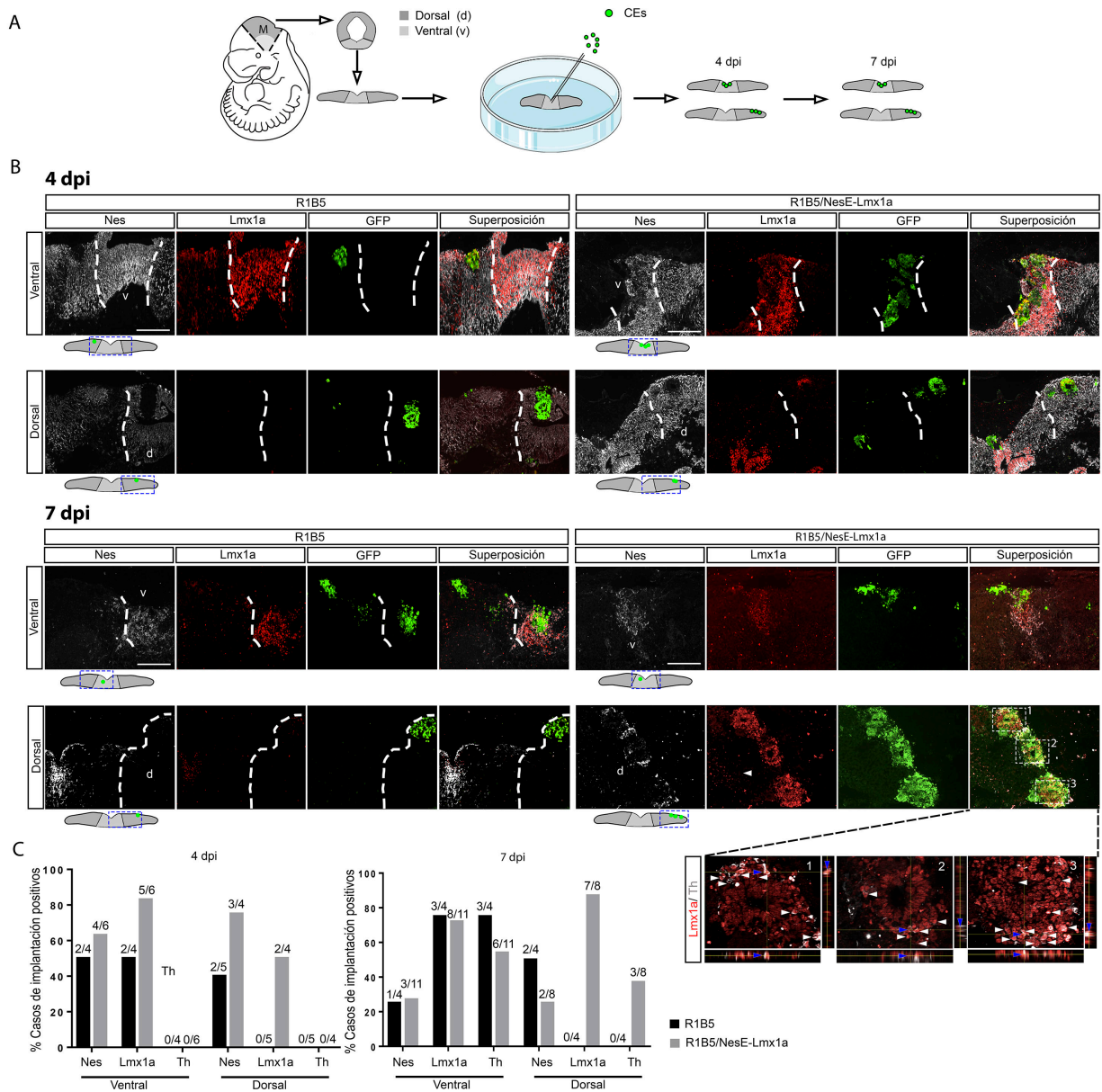


Figura 8. Evaluación de la función del tran gen *NesE-Lmx1a* en el contexto del cerebro medio en desarrollo. (A) Representación esquemática del cultivo de explantes de cerebro medio y de la implantación de células de CE en la zona ventral o dorsal. **(B)** Detección de PNs o neuronas en los explantes de cerebro medio a los 4 y 7 días en la zona ventral y dorsal. Las zonas con magnificación están delimitadas por los rectángulos punteados; las cabezas de flecha en color blanco indican las células trasplantadas (GFP⁺) que coexpresan *Lmx1a* y *Th*. La cabeza de flecha azul indica una de las células de las que se presentan los planos de análisis ortogonal. **(C)** Eficiencia de diferenciación de las células de CE en la zona ventral o dorsal; número de casos de implantación en los que algunas de las células implantadas fueron Nes⁺, Lmx1a⁺ o Th⁺, 4 ó 7 dpi.

6.3 El potencial neurogénico de la línea R1B5/NesE-Lmx1a *in vivo* parece alterarse cuando las células adquieren identidad neural *in vitro*.

Hay pocos estudios enfocados en describir las propiedades del microambiente de la SNpc y de las neuronas DA del subtipo A9; algunos de ellos reportan la presencia de factores importantes en la especificación y diferenciación neuronal DA como Shh y Fgf8. Sin embargo, en el caso de Shh no es aún claro si su liberación, y por tanto su acción, se lleva a cabo desde los somas celulares (SNpc), o bien en el sitio a donde proyectan las neuronas DA (estriado) [131]. Por su parte, el Fgf8 se ha detectado solo cuando se provoca un daño en la SNpc, pero no se ha detectado su expresión en condiciones fisiológicas. En un inicio, estos datos nos indicaban la posibilidad de que las células derivadas de CEs, a pesar de lograr la neuralización *in vivo*, al ser trasplantadas a dicha región del mesencéfalo, no lograrían la especificación DA y por tanto sería necesaria la neuralización *in vitro* en presencia de los factores Shh y Fgf8. Inesperadamente, 6 dpt los PNs de la línea R1B5/NesE-Lmx1a (etapa 4 del protocolo de 5 pasos) se diferenciaron de una manera aberrante, mostrando morfologías no neurales y características de otros tejidos (posiblemente muscular; Fig. 9, A). En este caso no pudimos determinar si el efecto fue provocado por la expresión del transgen *NesE-Lmx1a* debido a que no observamos sobrevida de los PNs derivados de la línea parental; sin embargo, cuando trasplantamos PNs de mesencéfalo ventral de embrión de la etapa E10.5, éstos fueron capaces de diferenciarse a neuronas DA 6 dpt (Fig 9, B) sin que generaran células de otros linajes no neurales. Es necesario realizar repeticiones de este experimento y hacer determinaciones más estrictas para poder afirmar si la neuralización *in vitro* o la sobreexpresión de *Lmx1a* promueven la pérdida del potencial neural de los

PNs derivados del protocolo de diferenciación de 5 pasos; o si las células Nestina+ que se generan *in vitro* son en su totalidad neurales o están comprometidas a otros linajes que también son Nestina+.

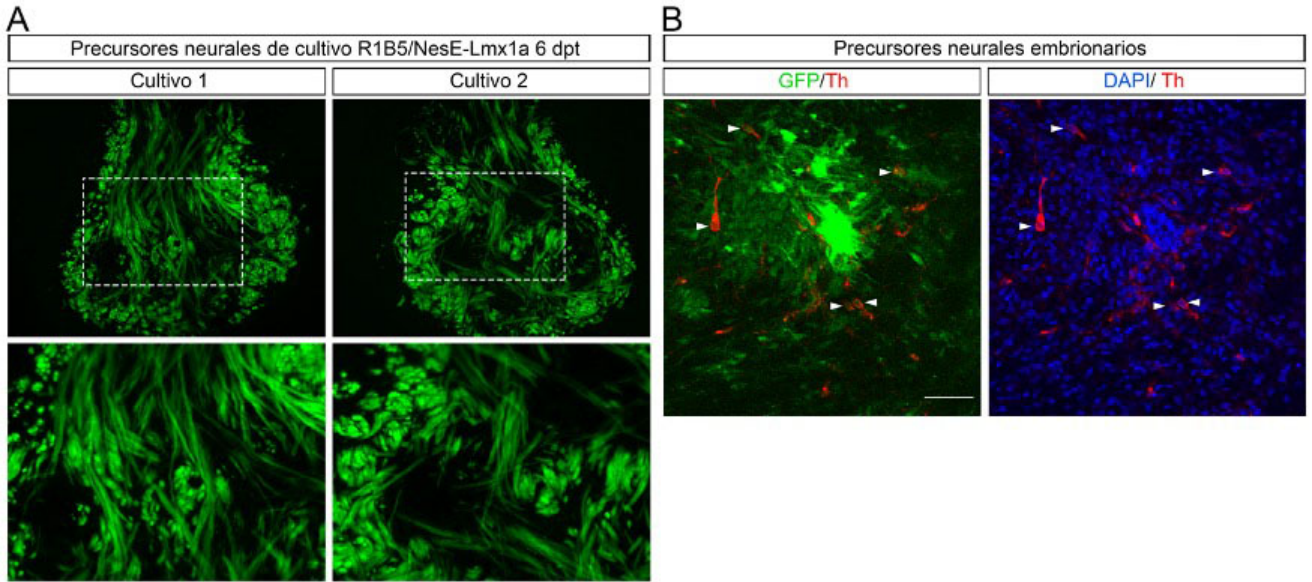


Figura 9. Diferenciación de los PNs provenientes del protocolo de 5 etapas y de los PNs embrionarios. (A) PNs (GFP⁺) de la línea R1B5/NesE-Lmx1a trasplantados a la SNpc y evaluados 6 dpt; los recuadros indican la zona con mayor aumento mostrada en los paneles inferiores. **(B)** PNs dopaminérgicos del cerebro medio (GFP⁺) trasplantados a la SNpc y evaluados 6 dpt. Las cabezas de flecha indican los PNs (GFP⁺) que son Th⁺.

6.4 La sobreexpresión de *Lmx1a* promueve la diferenciación dopaminérgica de células de cuerpos embrioides en la *substantia nigra pars compacta*.

Aunque sigue siendo controversial la existencia de procesos neurogénicos en la SNpc que puedan mantener en constante recambio la población de neuronas DA del subtipo A9, nosotros hemos propuesto que la SNpc se mantiene como un sitio neurogénico silencioso que puede ser detectado por las células derivadas de CEs [69], ya que las células derivadas de CEs de la línea R1B5/NesE-Lmx1a logran sobrevivir cuando son trasplantadas a la SNpc y diferencian a células con identidad neural en una proporción

similar a las células de CEs derivadas de la línea R1B5 (sin diferencias significativas). En detalle, las células trasplantadas de la línea R1B5/NesE-Lmx1a diferencian a células Nes⁺ o Dcx⁺ 6 dpt (marcadores de PNs o neuroblastos, respectivamente; Fig. 10, B y D), así que la sobreexpresión de *Lmx1a* no altera las capacidades neurogénicas de las células de CEs en el cerebro adulto. Sorprendentemente, 6 dpt una proporción de las células trasplantadas de la línea R1B5/NesE-Lmx1a expresó *Th* (GFP⁺/Th⁺), mientras que el mismo marcador de diferenciación DA no fue encontrado en células en las células de CEs de la línea R1B5 (Fig. 10, B, C y D); como ya se había reportado [69]. Consistente con los resultados esperados del efecto del *Lmx1a* al inducir la diferenciación neuronal DA, se detectaron varias células con el marcador Pitx3 (Fig. 10, E), factor de transcripción que se activa específicamente en el cerebro medio en etapas tempranas de la diferenciación DA. Sin embargo, 15 dpt el número de células GFP⁺/Th⁺ se ve reducido, aunque el número de células DCX⁺ se mantiene en porcentajes similares a lo observado con la línea R1B5 (n=2; Fig. 10, D), lo que indicaría que las neuronas DA que se están generando no sobreviven más allá de 15 días, tal vez porque no logran integrarse a los circuitos neuronales. En conjunto, estas observaciones sugieren que *Lmx1a* puede conferir a las células derivadas de CEs (sensores de sitios neurogénicos en el contexto del desarrollo embrionario o en el cerebro adulto) un mayor potencial DA *in vivo*, sin la necesidad de una fuente exógena de *Shh* y/o de *Fgf8* como había sido previamente reportado; sin embargo, es probable que dichos factores sean necesarios para completar la diferenciación DA y/o incrementar la sobrevida a largo plazo de las presuntas neuronas DA encontradas.

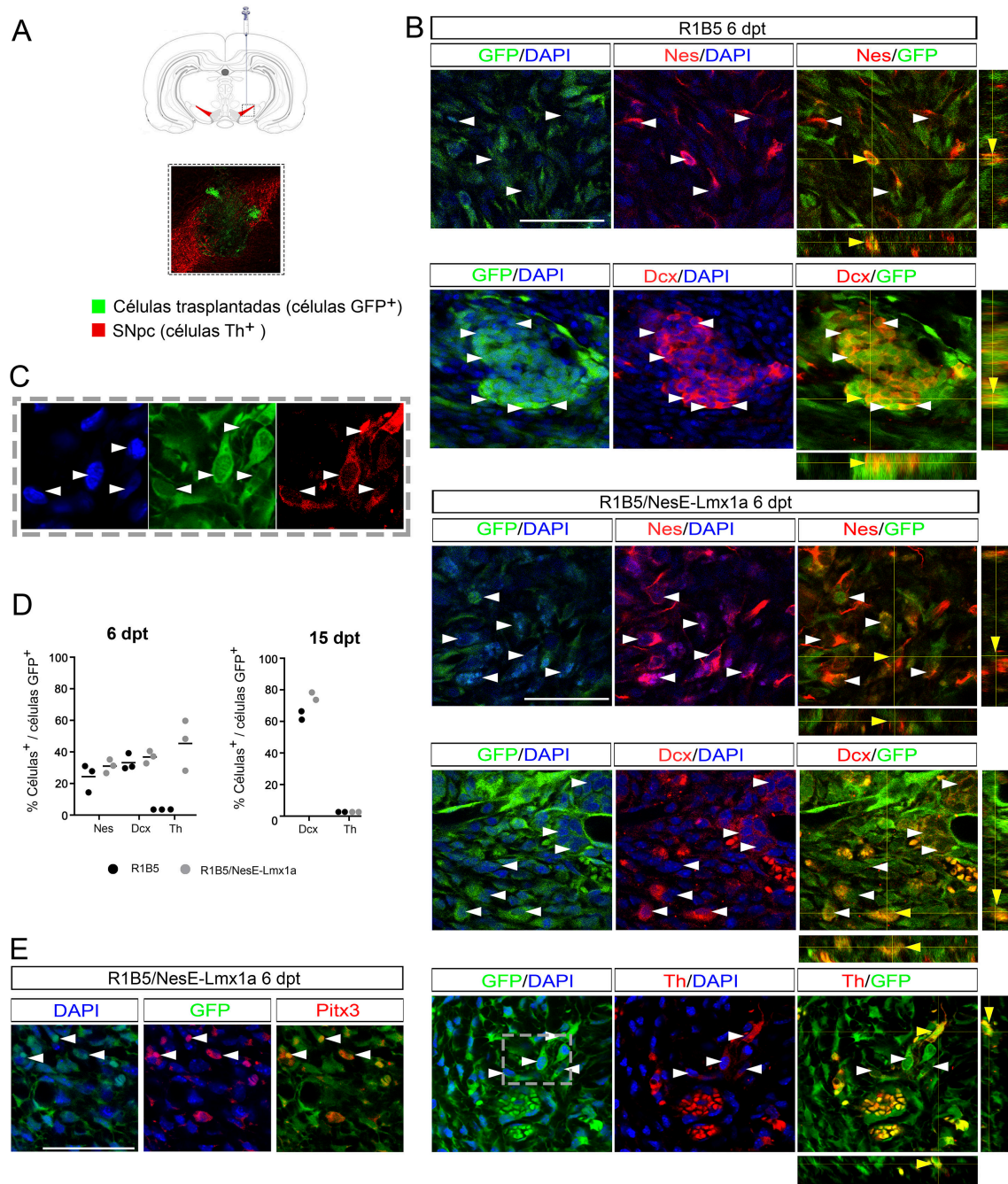


Figura 10. Efecto de la sobreexpresión de *Lmx1a* sobre la diferenciación DA de las células de CE en la SNpc. (A) Representación esquemática del trasplante de las células de CE en la SNpc de ratas adultas. Se muestra una imagen representativa de la corroboración del sitio del trasplante (células GFP⁺ entre las células Th⁺ de la SNpc). **(B)** Destino de las células de CE de la línea R1B5 y la línea R1B5/pNes-Lmx1a 6 dpt. Las cabezas de flecha blancas indican las células trasplantadas (GFP⁺) que coexpresan *Nes*, *Dcx* o *Th*, mientras que las cabezas de flecha amarillas muestran aquellas células de las que se muestran los planos de análisis ortogonal. **(C)** Magnificación marcada por el recuadro en los paneles inferiores de (B). **(D)** Cuantificación de la diferenciación de las células de CE de la línea R1B5 y la línea R1B5/pNes-Lmx1a 6 y 15 dpt; cada punto en la gráfica representa el promedio de eficiencia de diferenciación de un cultivo independiente trasplantado a tres ratas. **(E)** Detección de *Pitx3* como marcador de identidad mesencefálica.

6.5 La lesión de la *substantia nigra pars compacta* con 6-OHDA favorece la diferenciación de células derivadas de cuerpos embrioides.

En el pasado se ha demostrado que generar daño al cerebro puede promover la neurogénesis, tanto de PNs endógenos como de exógenos, o bien, de células pluripotentes indiferenciadas [69,132,133]. Con el fin de evaluar si la SNpc puede convertirse en un sitio de neurogénesis más robusto después de ser lesionada con 6-OHDA, se evaluó el fenotipo de células derivadas de CEs de las líneas R1B5 y R1B5/NesE-Lmx1a cuando son trasplantadas a la SNpc después de ser lesionada. Observamos que después de 6 dpt una proporción de células trasplantadas directamente al área dañada presentan una morfología neuronal, inesperadamente algunas de ellas eran Th⁺ (>20%) no importando si eran de la línea R1B5 o de la línea R1B5/NesE-Lmx1a (Fig. 11, B y D; Fig. 12). Además, una proporción de dichas células co-expresaron *Dcx* y *Th* (>90%; Fig. 12, C y D). En contraste con la sobrevivencia al menos de 30 dpt del trasplante de células derivadas de CEs en la SNpc sin lesión, la condición lesionada no permite la sobrevivencia a largo plazo de las células trasplantadas, posiblemente por un fenómeno de cavitación resultado de la neurodegeneración inducida con la 6-OHDA en el tejido hospedero. Nuestros resultados sugieren que la SNpc lesionada promueve un ambiente neurogénico y además adquiere propiedades que promueven la diferenciación hacia el fenotipo DA. Adicionalmente, encontramos algunos grupos de células GFP⁺/Th⁺/Dcx⁺ con una morfología distinta a la neuronal (Fig. 13, A).

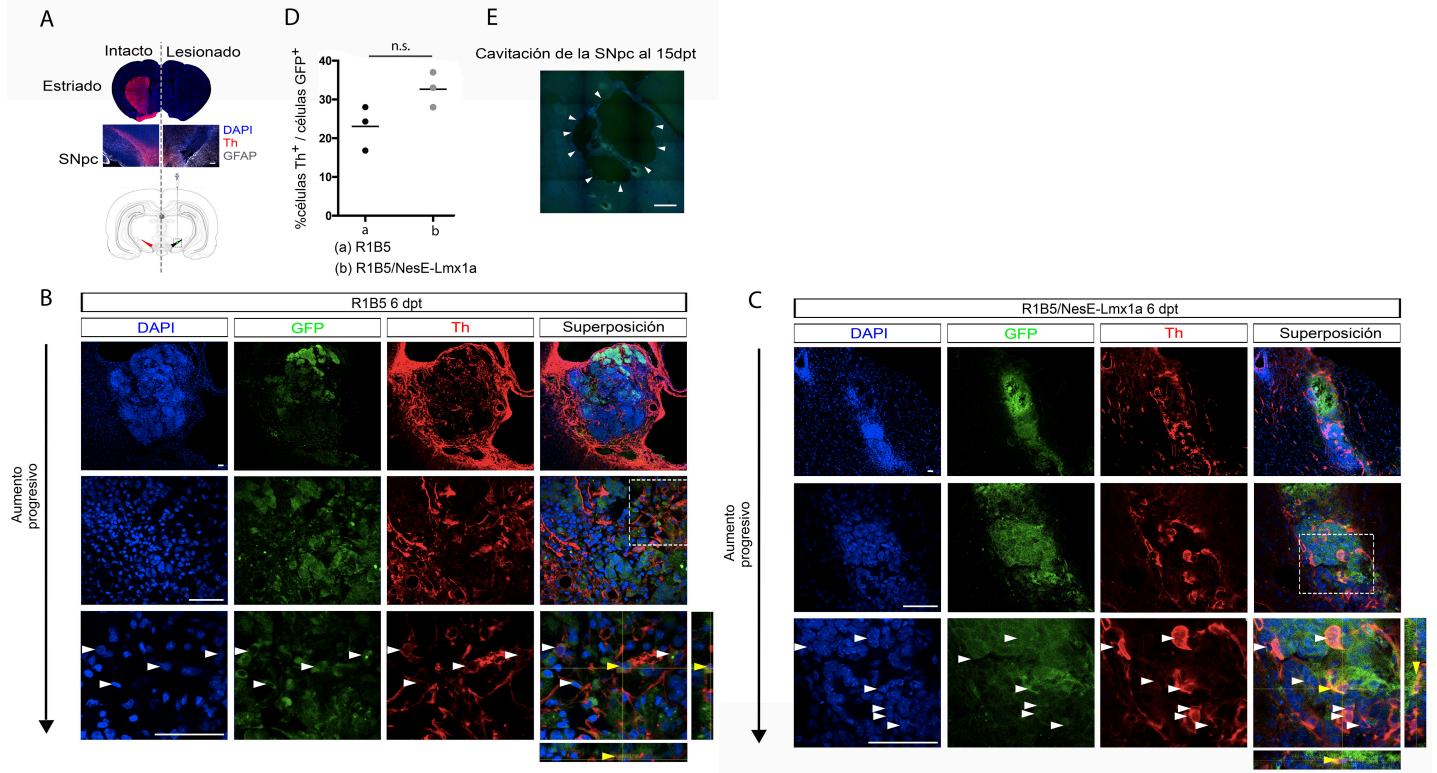


Figura 11. Influencia de la lesión con 6-OHDA sobre la diferenciación de CE. **(A)** Representación grafica del trasplante de células de CEs en el modelo de lesión de la SNpc. Imágenes representativas de la pérdida unilateral de Th (rojo) en un corte coronal del estriado y de la SNpc dos semanas después de realizar la lesión **(B y C)** Identificación de posibles neuronas DA. Se detectaron células Th⁺ derivadas de la línea R1B5 6dpt **(B)** y de la línea R1B5/NesE- Lmx1a **(C)** cuando se trasplantaron en el cerebro lesionado. Los recuadros delimitan el área con mayor aumento mostrada en los paneles inferiores; las cabezas de flecha blancas indican las células Th⁺ derivadas del trasplante, mientras que las cabezas de flecha amarillas indican las células analizadas en la vista ortogonal. Barra de escala 50 μ m. **(D)** Cuantificación de las células Th⁺ derivadas del trasplante en el contexto de lesión. Las células fueron contadas manualmente, cada punto en la gráfica representa el promedio de diferenciación de tres cultivos diferentes trasplantados al cerebro de tres ratas; n.s, sin diferencias significativas. Es de importancia notar que, en contraste con los resultados obtenidos del trasplante en ratas intactas, en este caso las células de la línea R1B5 adquieren la expresión de *Th*. **(E)** Reconstrucción en dos planos (X-Y) de la región lesionada 15 días después de aplicar la 6-OHDA. La imagen esta compuesta por 3 tomas en el plano X por 4 tomas en el plano Y. Las cabezas de flecha indican la zona de cavitación.

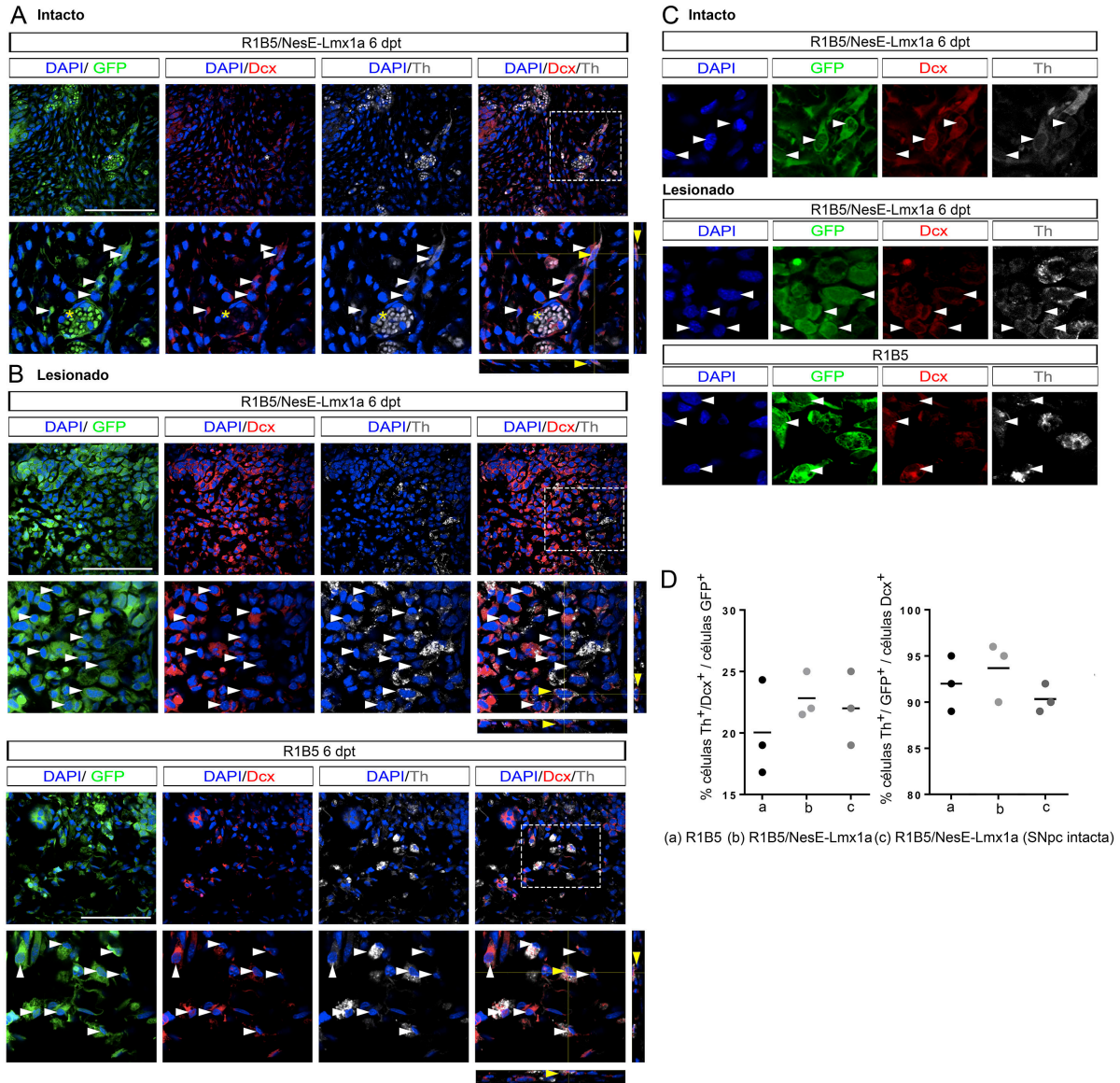


Figura 12. Diferenciación de las células de CE a neuroblastos DA *in vivo*. (A y B) El marcador de neuroblastos Dcx fue detectado en células Th⁺ derivadas del trasplante de las líneas R1B5 o R1B5/NesE-Lmx1a, tanto en condición intacta como en la condición lesionada. Los recuadros marcados en los paneles superiores delimitan el área con mayor magnificación mostrada en los paneles inferiores. Las cabezas de flecha apuntan aquellas células GFP⁺ que co-expresan Th y Dcx, mientras que las cabezas de flecha amarillas apuntan aquellas células que fueron analizadas en la vista ortogonal. El asterisco señala a un grupo de células Th⁺/Dcx⁺ con identidad no neuronal. Barra de escala 100 μ m. (C) Mayor magnificación de las células Th⁺/Dcx⁺. (D) Cuantificación de los neuroblastos DA en la SNpc intacta y lesionada; cada punto en la gráfica representa la eficiencia promedio de diferenciación de un cultivo independiente trasplantado y evaluado en el cerebro de 3 ratas.

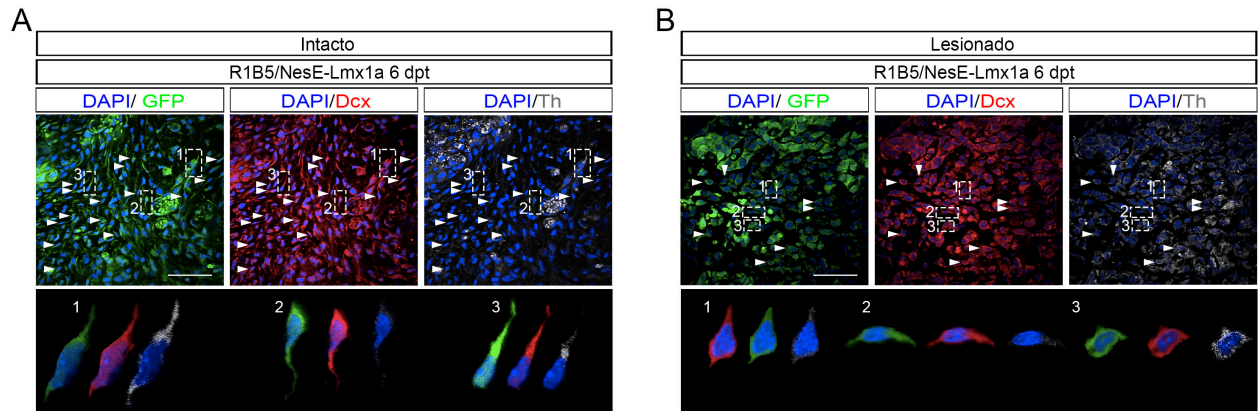


Figura 13. Características morfológicas de los neuroblastos Th^+/Dcx^+ derivados de las CE de la línea R1B5/NesE-Lmx1a. Detección del marcador de neuroblastos Dcx en células Th^+ de CE de SNpc intacta (A) y lesionada (B). En los paneles inferiores se muestra una selección de las células Th^+/Dcx^+ que poseen una morfología característica de fibroblastos: núcleo y soma alargado con pequeñas extensiones unipolares o bipolares que son mas anchas en la base. Barra de escala 50 μm .

7. Discusión.

De entre las posibles terapias alternativas (no farmacológicas) para el tratamiento de la EP destaca la del reemplazo celular, que supone el re-establecimiento de la neurotransmisión dopaminérgica gracias a la implantación de células DA de origen exógeno. A la fecha, el trasplante al estriado, región de proyección de las neuronas DA de la SNpc, es la estrategia más utilizada para probar la capacidad de las células trasplantadas de liberar dopamina [134]. Desde este enfoque, no es necesario, y tampoco es de esperarse, que las células trasplantadas tengan la capacidad de integrarse a los circuitos nigro-estriatales; en cambio se espera que las células sirvan como un sistema de liberación de dopamina que rescate en cierta medida la deficiencia de dopamina en los ganglios basales. En contraste, el trasplante en la SNpc requiere de

células con la capacidad, no solo de producir dopamina, si no de proyectar desde el cerebro medio hasta el estriado y generar conexiones funcionales con los circuitos preexistentes. De entre las posibles fuentes celulares que pueden ser utilizadas para dicho propósito, destacan las células troncales embrionarias que pudieran ser diferenciadas *in vivo* a neuronas, propiedad que aumenta las posibilidades de una integración funcional.

Nosotros hemos demostrado que la SNpc intacta puede inducir la diferenciación neuronal de células no neuralizadas pluripotentes derivadas de CEs, sin embargo, el fenotipo terminal no es dopaminérgico [69]. Este resultado apuntó a dos posibilidades, 1) que las células de CEs no tuvieran la capacidad de diferenciar a neuronas dopaminérgicas *in vivo* y 2) que en la SNpc existan factores que no permitan la diferenciación DA o la sobrevivencia neuronal. Para resolver dicha cuestión, generamos una línea de CTEs con mayor potencial de diferenciación dopaminérgica *in vivo*, resultado de la expresión del transgén *NesE-Lmx1a*, posteriormente evaluamos esa capacidad *in vivo*, tanto en la SNpc intacta como en la SNpc lesionada. En un inicio, confirmamos que las CTEs que poseen el transgén *NesE-Lmx1a* incrementan su capacidad de diferenciar a neuronas DA cuando son sometidas al protocolo de diferenciación de 5 etapas en presencia de Shh y Fgf; además inferimos que la acción de Lmx1a es importante en dos etapas del protocolo. El hecho de que Lmx1a incrementa el número de grupos celulares que contienen células Th⁺ puede ser considerado un indicativo de la contribución de dicho gen en la especificación inicial de los precursores neurales dopaminérgicos, mientras

que un número mayor de células Th⁺ en cada uno de los grupos podría implicar que, después de la especificación inicial, Lmx1a también contribuye a la diferenciación DA.

En el contexto de la SNpc intacta, sólo se observa la diferenciación de las células de CEs a neuroblastos Th⁺ en la presencia de Lmx1a derivado del transgén cuando las células son evaluadas 6 dpt, sin embargo, a los 15 dpt dichas células (GFP⁺/Th⁺) no son detectables. Tomando en cuenta lo descrito anteriormente sobre la doble acción de Lmx1a sobre la diferenciación DA *in vitro*, una de las posibles explicaciones a la no prevalencia de células Th⁺ es que la especificación inicial mediada por Lmx1a se lleva a cabo *in vivo*, pero la diferenciación no continua y/o la identidad de neuroblasto dopaminérgico se pierde.

Las células indiferenciadas (no neuralizadas) de los CEs mantienen la capacidad de diferenciarse a neuronas cuando se colocan en sitios o condiciones neurogénicas del cerebro adulto; dicha diferenciación, más que ser un evento predeterminado, es resultado de la interacción de las células con un ambiente permisivo o inductivo de la diferenciación neuronal. Cuando las células de CE se colocan en el estriado intacto (sitio no neurogénico) no se observa la diferenciación neural, en cambio las células se diferencian en cierto porcentaje a astrocitos. En particular, la diferenciación de las células que expresan Lmx1a (aquellas derivadas de la línea R1B5/NesE-Lmx1a) a células Th⁺ 6 dpt revela no sólo la ausencia de señales que repriman la especificación dopaminérgica, que pueden ser parcialmente cubiertas por la expresión de Lmx1a, sino también la ausencia de señales de diferenciación DA terminal.

Se ha demostrado ampliamente que los PNs tienen la capacidad de sobrevivir, e incluso diferenciarse, cuando son trasplantados en sitios lesionados del cerebro adulto, demostrando que una lesión, inducida por acción mecánica o por la infusión de toxinas, genera un ambiente propicio para la supervivencia de células trasplantadas y la neurogénesis específica [133,135]. En el caso de la SNpc lesionada con 6-OHDA, las células derivadas de CEs pueden detectar y responder a las señales neurogénicas preexistentes en el sitio, pero en contraste con los resultados observados en la SNpc intacta, parece ser que la expresión exógena de *Lmx1a* no es determinante en la adquisición del fenotipo dopaminérgico, ya que las células de CE de la línea R1B5 también derivan a neuroblastos dopaminérgicos. Estos datos sugieren que la lesión con 6-OHDA no sólo no afecta las propiedades neurogénicas de la SNpc, si no también promueve un ambiente que favorece la diferenciación DA. Por ahora se desconocen en su totalidad las moléculas involucradas en promover la neurogénesis en los sitios neurogénicos embrionarios o del adulto, así como los niveles y temporalidades en las que ellas se expresan, o cuáles son las moléculas presentes en la SNpc después de sufrir una lesión, y lograrlo es una tarea que tomaría mucho tiempo resolver. Sin embargo, es una observación que debe de empezar a considerarse, ya que los resultados (sean buenos o malos) que se observan después de realizar cualquier trasplante en cualquier modelo de la EP pueden estar notablemente influenciados por el ambiente promovido por la lesión que dista de ser el mismo que resulta de la neurodegeneración progresiva en un paciente.

En contraste con los resultados anteriores, cuando se han trasplantado PNs dopaminérgicos en diferenciación se ha logrado observar un porcentaje significativo de sobrevida y de integración. Por ejemplo, los PNs recuperados del mesencéfalo en desarrollo del ratón (E 12.5) y trasplantados en la SNpc lesionada diferencian en un buen número a neuronas DA y en algunos casos muestran la habilidad de proyectar hacia el estriado [75]. Sin embargo, es de relevancia mencionar que los PNs trasplantados en dichos estudios incluyen muchos PNs que tienen ya un compromiso celular definido hacia la diferenciación DA, así que no son necesarios factores adicionales que promuevan la diferenciación neuronal. En consecuencia, en un estudio en el que se trasplantaron PNs con distintos grados de diferenciación en la SNpc intacta o en el estriado lesionado, se determinó que las neuronas observadas derivan principalmente de precursores neurales Neurog2⁺, mismos que en el mesencéfalo ventral de embrión representan a la población de neuroblastos dopaminérgicos comprometidos a diferenciarse a neuronas DA. Lo anterior también se observa cuando se trasplantan precursores neurales dopaminérgicos derivados *in vitro* a partir de células troncales humanas [75]. Por lo tanto, la diferenciación ineficiente o la baja sobrevida de los PNs DA provenientes de las CT en nuestro estudio, puede estar relacionada con su limitada capacidad para alcanzar un estado de diferenciación más avanzado. En el caso del experimento realizado en la SNpc lesionada, no es posible determinar si las células logran un estado de diferenciación más avanzado debido a que la sobrevida se ve fuertemente afectada por las condiciones adversas que resultan de la lesión con 6-OHDA (principalmente la cavitación progresiva). Sería interesante saber si la adición post-trasplante de factores necesarios para la progresión de la diferenciación DA, como Shh y Fgf8, puede

incrementar la eficiencia de diferenciación en cuando las células de CE son trasplantadas a la SNpc.

Una de las estrategias comúnmente utilizadas para aumentar la sobrevivencia de los trasplantes es aplicar tratamientos que supriman la acción del sistema inmune, o bien utilizar animales con deficiencias del sistema inmunitario (por ejemplo, ratones atímicos). Nosotros realizamos todos nuestros experimentos de trasplante en ratas inmunocompetentes y evitamos el uso de inmunosupresores, como el tacrolimus o la ciclosporina. Esta decisión fue el resultado de la observación de que las células de CE reducen su capacidad proliferativa y de diferenciación en la presencia de inmunosupresores que pudieran estar afectando la capacidad angiogénica del hospedero [136,137]. Aunque la respuesta inmune del hospedero pudiera estar afectando las células del trasplante en la SNpc intacta, ese efecto no parece ser evidente hasta los 15 dpt, tiempo en el que podemos observar el mayor número de neuroblastos (células Dcx⁺). Una de las posibilidades por las cuales no se observan células Th⁺ provenientes de las células trasplantadas, es que el sistema inmune afecte de manera selectiva aquellas células maduras que cuentan con una identidad inmunológica definida que pudiera no lograrse durante el proceso de diferenciación, aunque parece mayor la probabilidad de que las células degeneren por la falta de factores que permitan la progresión en la diferenciación DA.

En nuestro grupo de investigación creemos que las células pluripotentes con potencial neurogénico dopaminérgico (como las células de CE) o bien de PNs no diferenciados,

tienen mayor posibilidad de integrarse de manera funcional a los circuitos neuronales preexistentes cuando son trasplantados al cerebro adulto, esto debido a las propiedades plásticas de las células indiferenciadas y a su capacidad de responder a las señales existentes en el medio. Aunque no se han descrito con detalle, en los sitios neurogénicos, o con propiedades neurogénicas como la SNpc, deben existir señales que promuevan, además de la diferenciación neuronal específica, la integración de las células que constantemente son generadas, como es el caso de los neuroblastos migrantes provenientes de la zona subventricular de los ventrículos laterales que alcanzan su diferenciación terminal a interneuronas DAs, y por lo tanto su integración, sólo después de llegar a los bulbos olfatorios. A pesar de que la SNpc posee un ambiente neurogénico que se mantiene después de ser lesionada con 6-OHDA, parece no tener señales que dirijan la diferenciación DA, o al menos no señales que puedan ser interpretadas por los neuroblastos dopaminérgicos derivados de la diferenciación *in vivo* de células de los CE. Por su parte, Lmx1a y la lesión con 6-OHDA contribuyen a la promoción de la especificación DA temprana de las células de CE, pero, de acuerdo con nuestras observaciones, es posible que se necesiten factores adicionales para que alcancen la diferenciación terminal. Así, es posible que la diferenciación DA terminal de las células no neuralizadas de los CE se logre con la adición de factores intrínsecos como Foxa2 o de factores extrínsecos como Shh y Fgf8.

8. Conclusiones.

- La SNpc es un sitio permisivo a la diferenciación DA de células con alto potencial de diferenciación hacia ese linaje.
- La lesión de la SNpc con 6-OHDA promueve un ambiente neurogénico que puede ser detectado por células pluripotentes derivadas de CEs.
- La sobreexpresión del factor de transcripción Lmx1a no afecta el potencial neurogénico de las células derivadas de CEs.
- Es posible que los PNs obtenidos *in vitro* pierdan la capacidad de recibir señales de diferenciación neuronal en los sitios neurogénicos del cerebro adulto.

9. Perspectivas.

- Realizar un mayor número de experimentos de trasplante de precursores neurales al finalizar la etapa de expansión del protocolo de cinco etapas, con la finalidad de corroborar que se pierde la capacidad neurogénica cuando son trasplantados al cerebro de ratas adultas sin inmunosupresión.
- Implementar estrategias que promuevan una supervivencia más prolongada de las células trasplantadas en el contexto de lesión. Lo anterior permitirá conocer más a detalle la influencia de la lesión sobre la diferenciación de células troncales pluripotentes.
- Generar una línea de células troncales embrionarias con alto potencial dopaminérgico y que no dependa de la adición de factores solubles, apoyándose

de la sobre expresión de FoxA2 (Fgf 8 y Shh) y evaluar su potencial de diferenciación dopaminérgico en el contexto sin lesión y con lesión.

- Buscar estrategias que promuevan la neurogénesis endógena sin la necesidad de realizar trasplantes de células indiferenciadas.

10. Referencias.

1. Elbaz A, L Carcaillon, S Kab and F Moisan (2016). Epidemiology of Parkinson's disease. *Rev Neurol (Paris)* 172: 14–26.
2. Armstrong MJ and MS Okun (2020). Diagnosis and Treatment of Parkinson Disease: A Review. *Jama* 323: 548–560.
3. Chaudhuri KR, DG Healy and AHV Schapira (2006). Non-motor symptoms of Parkinson's disease: Diagnosis and management. *Lancet Neurol*.
4. FAHN S (2006). Description of Parkinson's Disease as a Clinical Syndrome. *Ann N Y Acad Sci*.
5. Subramaniam SR and MF Chesselet (2013). Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in Parkinson's disease. *Prog Neurobiol* 106–107: 17–32.
6. Dauer W, S Przedborski, JB Schulz and BH Falkenburger (2003). Parkinson's disease: mechanisms and models\rNeuronal pathology in Parkinson's disease. *Neuron*.
7. Kostić VS, J Marinković, M Svetel, E Stefanova and S Przedborski (2002). The effect of stage of Parkinson's disease at the onset of levodopa therapy on development of motor complications. *Eur J Neurol*.
8. Politis M and C Loane (2011). Serotonergic dysfunction in Parkinson's disease and its relevance to disability. *ScientificWorldJournal*.
9. Follett KA, FM Weaver, M Stern, K Hur, CL Harris, P Luo, WJ Marks, J Rothlind, O Sagher, C Moy, R Pahwa, K Burchiel, P Hogarth, EC Lai, JE Duda, K Holloway, A Samii, S Horn, JM Bronstein, G Stoner, PA Starr, R Simpson, G Baltuch, A De Salles, GD Huang and DJ Reda (2010). Pallidal versus subthalamic deep-brain stimulation for Parkinson's disease. *N Engl J Med*.

10. Berg D, RB Postuma, CH Adler, BR Bloem, P Chan, B Dubois, T Gasser, CG Goetz, G Halliday, L Joseph, AE Lang, I Liepelt-Scarfone, I Litvan, K Marek, J Obeso, W Oertel, CW Olanow, W Poewe, M Stern and G Deuschl (2015). MDS research criteria for prodromal Parkinson's disease. *Mov Disord*.
11. Dirx MF, H Zach, BR Bloem, M Hallett and RC Helmich (2018). The nature of postural tremor in Parkinson disease. *Neurology*.
12. Postuma RB, D Berg, M Stern, W Poewe, CW Olanow, W Oertel, J Obeso, K Marek, I Litvan, AE Lang, G Halliday, CG Goetz, T Gasser, B Dubois, P Chan, BR Bloem, CH Adler and G Deuschl (2015). MDS clinical diagnostic criteria for Parkinson's disease. *Mov Disord*.
13. Tolosa E, C Gaig, J Santamaría and Y Compta (2009). Diagnosis and the premotor phase of Parkinson disease. *Neurology*.
14. Chaudhuri KR, C Prieto-Jurcynska, Y Naidu, T Mitra, B Frades-Payo, S Tluk, A Ruesmann, P Odin, G Macphee, F Stocchi, W Ondo, K Sethi, AHV Schapira, JCM Castrillo and P Martinez-Martin (2010). The nondeclaration of nonmotor symptoms of Parkinson's disease to health care professionals: An international study using the nonmotor symptoms questionnaire. *Mov Disord*.
15. S.S. O, W D.R., G D.A., M L.A., S-M L. and L A.J. (2008). Nonmotor symptoms as presenting complaints in Parkinson's disease: A clinicopathological study. *Mov Disord*.
16. Wolters EC (2009). Non-motor extranigral signs and symptoms in Parkinson's disease. *Park Relat Disord*.
17. Halliday G, A Lees and M Stern (2011). Milestones in Parkinson's disease-Clinical and pathologic features. *Mov Disord*.

18. Jellinger KA (2012). Neuropathology of sporadic Parkinson's disease: Evaluation and changes of concepts. *Mov Disord*.
19. Buddhala C, SK Loftin, BM Kuley, NJ Cairns, MC Campbell, JS Perlmutter and PT Kotzbauer (2015). Dopaminergic, serotonergic, and noradrenergic deficits in Parkinson disease. *Ann Clin Transl Neurol*.
20. Thobois S, C Ardouin, E Schmitt, E Lhommée, H Klingler, J Xie, C Lagrange, A Kistner, M Aya Kombo, V Fleury, A Poisson, V Fraix, E Broussolle, P Pollak and P Krack (2010). Behavioral disorders in Parkinson's disease: From pathophysiology to the mastery of dopaminergic treatment. *Rev Neurol (Paris)*.
21. Antonini A, E Moro, C Godeiro and H Reichmann (2018). Medical and surgical management of advanced Parkinson's disease. *Mov Disord*.
22. Rodriguez-Oroz MC, JA Obeso, AE Lang, JL Houeto, P Pollak, S Rehncrona, J Kulisevsky, A Albanese, J Volkmann, MI Hariz, NP Quinn, JD Speelman, J Guridi, I Zamarbide, A Gironell, J Molet, B Pascual-Sedano, B Pidoux, AM Bonnet, Y Agid, J Xie, AL Benabid, AM Lozano, J Saint-Cyr, L Romito, MF Contarino, M Scerrati, V Fraix and N Van Blercom (2005). Bilateral deep brain stimulation in Parkinson's disease: A multicentre study with 4 years follow-up. *Brain*.
23. Steigerwald F, L Müller, S Johannes, C Matthies and J Volkmann (2016). Directional deep brain stimulation of the subthalamic nucleus: A pilot study using a novel neurostimulation device. *Mov Disord*.
24. Deuschl G, C Schade-Brittinger, P Krack, J Volkmann, H Schäfer, K Bötzel, C Daniels, A Deutschländer, U Dillmann, W Eisner, D Gruber, W Hamel, J Herzog, R Hilker, S Klebe, M Kloß, J Koy, M Krause, A Kupsch, D Lorenz, S Lorenzl, HM

Mehdorn, JR Moringlane, W Oertel, MO Pinsker, H Reichmann, A Reuß, GH Schneider, A Schnitzler, U Steude, V Sturm, L Timmermann, V Tronnier, T Trottenberg, L Wojtecki, E Wolf, W Poewe and J Voges (2006). A randomized trial of deep-brain stimulation for Parkinson's disease. *N Engl J Med*.

25. Deuschl G, M Schüpbach, K Knudsen, MO Pinsker, P Cornu, J Rau, Y Agid and C Schade-Brittinger (2013). Stimulation of the subthalamic nucleus at an earlier disease stage of Parkinson's disease: Concept and standards of the EARLYSTIM-study. *Park Relat Disord*.

26. Lin LFH, DH Doherty, JD Lile, S Bektesh and F Collins (1993). GDNF: A glial cell line - Derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons. *Science* (80-).

27. Kirik D, C Rosenblad, A Björklund and RJ Mandel (2000). Long-term rAAV-mediated gene transfer of GDNF in the rat Parkinson's model: Intrastriatal but not intranigral transduction promotes functional regeneration in the lesioned nigrostriatal system. *J Neurosci*.

28. Kordower JH and A Bjorklund (2013). Trophic Factor Gene Therapy for Parkinson's Disease. *Mov Disord*.

29. Aoi M, I Date, S Tomita and T Ohmoto (2000). The effect of intrastriatal single injection of GDNF on the nigrostriatal dopaminergic system in hemiparkinsonian rats: Behavioral and histological studies using two different dosages. *Neurosci Res*.

30. Björklund A, D Kirik, C Rosenblad, B Georgievska, C Lundberg and RJ Mandel (2000). Towards a neuroprotective gene therapy for Parkinson's disease: Use of adenovirus, AAV and lentivirus vectors for gene transfer of GDNF to the nigrostriatal system in the rat Parkinson model. *Brain Res*.

31. Winkler C, H Sauer, CS Lee and A Björklund (1996). Short-term GDNF treatment provides long-term rescue of lesioned nigral dopaminergic neurons in a rat model of Parkinson's disease. *J Neurosci*.
32. Gash DM, Z Zhang, A Ovadia, WA Cass, A Yi, L Simmerman, D Russell, D Martin, PA Lapchak, F Collins, BJ Hoffer and GA Gerhardt (1996). Functional recovery in parkinsonian monkeys treated with GDNF. *Nature*.
33. Grondin R, Z Zhang, A Yi, WA Cass, N Maswood, AH Andersen, DD Elsberry, MC Klein, GA Gerhardt and DM Gash (2002). Chronic, controlled GDNF infusion promotes structural and functional recovery in advanced Parkinsonian monkeys. *Brain*.
34. Iravani MM, S Costa, MJ Jackson, BC Tel, C Cannizzaro, RKB Pearce and P Jenner (2001). GDNF reverses priming for dyskinesia in MPTP-treated, L-DOPA-primed common marmosets. *Eur J Neurosci*.
35. Ulusoy A, M Decressac, D Kirik and A Björklund (2010). Viral vector-mediated overexpression of α -synuclein as a progressive model of Parkinson's disease. In *Progress in Brain Research*, p.
36. Decressac M, A Ulusoy, B Mattsson, B Georgievska, M Romero-Ramos, D Kirik and A Björklund (2011). GDNF fails to exert neuroprotection in a rat α -synuclein model of Parkinson's disease. *Brain*.
37. Tian Y, S Sun, C Tang, J Wang, X Chen and X Qiao (2006). Intrastratial gene transfer of vascular endothelial growth factor rescues dopaminergic neurons in a rat Parkinson's disease model. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*.
38. Tian YY, SG Sun, JN Wang, CJ Tang, Y Feng, L Wang, XW Chen and X Qiao (2006). Adenovirus mediated vascular endothelial growth factor gene transfer protection

dopaminergic neurons in parkinson's disease: Experiment with rats. Natl Med J China.

39. Lindholm P, MH Voutilainen, J Laurén, J Peränen, VM Leppänen, JO Andressoo, M Lindahl, S Janhunen, N Kalkkinen, T Timmusk, RK Tuominen and M Saarma (2007). Novel neurotrophic factor CDNF protects and rescues midbrain dopamine neurons in vivo. Nature.

40. Airavaara M, BK Harvey, MH Voutilainen, H Shen, J Chou, P Lindholm, M Lindahl, RK Tuominen, M Saarma, B Hoffer and Y Wang (2012). CDNF Protects the Nigrostriatal Dopamine System and Promotes Recovery After MPTP Treatment in Mice. Cell Transplant.

41. Voutilainen MH, S Bäck, J Peränen, P Lindholm, A Raasmaja, PT Männistö, M Saarma and RK Tuominen (2011). Chronic infusion of CDNF prevents 6-OHDA-induced deficits in a rat model of Parkinson's disease. Exp Neurol.

42. Voutilainen MH, F De Lorenzo, P Stepanova, S Bäck, LY Yu, P Lindholm, E Pörsti, M Saarma, PT Männistö and RK Tuominen (2017). Evidence for an additive neurorestorative effect of simultaneously administered CDNF and GDNF in hemiparkinsonian rats: Implications for different mechanism of action. ENeuro.

43. Back S, J Peränen, E Galli, P Pulkila, L Lonka-Nevalaita, T Tamminen, MH Voutilainen, A Raasmaja, M Saarma, PT Männistö and RK Tuominen (2013). Gene therapy with AAV2-CDNF provides functional benefits in a rat model of Parkinson's disease. Brain Behav.

44. Ren X, T Zhang, X Gong, G Hu, W Ding and X Wang (2013). AAV2-mediated striatum delivery of human CDNF prevents the deterioration of midbrain dopamine neurons in a 6-hydroxydopamine induced parkinsonian rat model. Exp Neurol.

45. Del Rey NL-G, A Quiroga-Varela, E Garbayo, I Carballo-Carbajal, R Fernández-Santiago, MHG Monje, I Trigo-Damas, MJ Blanco-Prieto and J Blesa (2018). Advances in Parkinson's Disease: 200 Years Later. *Front Neuroanat* 12: 1–14.
46. Garbayo E, E Ansorena, H Lana, M del M Carmona-Abellan, I Marcilla, JL Lanciego, MR Luquin and MJ Blanco-Prieto (2016). Brain delivery of microencapsulated GDNF induces functional and structural recovery in parkinsonian monkeys. *Biomaterials*.
47. Huang R, L Han, J Li, F Ren, W Ke, C Jiang and Y Pei (2009). Neuroprotection in a 6-hydroxydopamine-lesioned Parkinson model using lactoferrin-modified nanoparticles. *J Gene Med*.
48. Migliore MM, R Ortiz, S Dye, RB Campbell, MM Amiji and BL Waszczak (2014). Neurotrophic and neuroprotective efficacy of intranasal GDNF in a rat model of Parkinson's disease. *Neuroscience*.
49. Hernando S, E Herran, J Figueiro-Silva, JL Pedraz, M Igartua, E Carro and RM Hernandez (2018). Intranasal administration of TAT-conjugated lipid nanocarriers loading GDNF for Parkinson's disease. *Mol Neurobiol*.
50. Sheikh MA, YS Malik, Z Xing, Z Guo, H Tian, X Zhu and X Chen (2017). Polylysine-modified polyethylenimine (PEI-PLL) mediated VEGF gene delivery protects dopaminergic neurons in cell culture and in rat models of Parkinson's Disease (PD). *Acta Biomater*.
51. Herrán E, C Requejo, JA Ruiz-Ortega, A Aristieta, M Igartua, H Bengoetxea, L Ugedo, JL Pedraz, JV Lafuente and RM Hernández (2014). Increased antiparkinson efficacy of the combined administration of VEGF- and GDNF-loaded nanospheres in a partial lesion model of Parkinson's disease. *Int J Nanomedicine*.

52. Herrán E, JÁ Ruiz-Ortega, A Aristieta, M Igartua, C Requejo, JV Lafuente, L Ugedo, JL Pedraz and RM Hernández (2013). In vivo administration of VEGF- and GDNF-releasing biodegradable polymeric microspheres in a severe lesion model of Parkinson's disease. *Eur J Pharm Biopharm.*
53. Zhao YZ, X Li, CT Lu, M Lin, LJ Chen, Q Xiang, M Zhang, RR Jin, X Jiang, XT Shen, XK Li and J Cai (2014). Gelatin nanostructured lipid carriers-mediated intranasal delivery of basic fibroblast growth factor enhances functional recovery in hemiparkinsonian rats. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol Med.*
54. Elias WJ, N Lipsman, WG Ondo, P Ghanouni, YG Kim, W Lee, M Schwartz, K Hynynen, AM Lozano, BB Shah, D Huss, RF Dallapiazza, R Gwinn, J Witt, S Ro, HM Eisenberg, PS Fishman, D Gandhi, CH Halpern, R Chuang, KB Pauly, TS Tierney, MT Hayes, GR Cosgrove, T Yamaguchi, K Abe, T Taira and JW Chang (2016). A randomized trial of focused ultrasound thalamotomy for essential tremor. *N Engl J Med.*
55. Magara A, R Bühler, D Moser, M Kowalski, P Pourtehrani and D Jeanmonod (2014). First experience with MR-guided focused ultrasound in the treatment of Parkinson's disease. *J Ther Ultrasound.*
56. Schlesinger I, A Eran, A Sinai, I Erikh, M Nassar, D Goldsher and M Zaaroor (2015). MRI guided focused ultrasound thalamotomy for moderate-to-severe tremor in Parkinson's disease. *Parkinsons Dis.*
57. Martínez-Fernández R, R Rodríguez-Rojas, M del Álamo, F Hernández-Fernández, JA Pineda-Pardo, M Dileone, F Alonso-Frech, G Foffani, I Obeso, C Gasca-Salas, E de Luis-Pastor, L Vela and JA Obeso (2018). Focused ultrasound subthalamotomy in patients with asymmetric Parkinson's disease: a pilot study. *Lancet Neurol.*

58. Kriks S, JW Shim, J Piao, YM Ganat, DR Wakeman, Z Xie, L Carrillo-Reid, G Auyeung, C Antonacci, A Buch, L Yang, MF Beal, DJ Surmeier, JH Kordower, V Tabar and L Studer (2011). Dopamine neurons derived from human ES cells efficiently engraft in animal models of Parkinson's disease. *Nature* 480: 547–551.
59. Li W, E Englund, H Widner, B Mattsson, D van Westen, J Lätt, S Rehncrona, P Brundin, A Björklund, O Lindvall and J-Y Li (2016). Extensive graft-derived dopaminergic innervation is maintained 24 years after transplantation in the degenerating parkinsonian brain. *Proc Natl Acad Sci* 113: 6544–6549.
60. Müller J, C Ossig, JFW Greiner, S Hauser, M Fauser, D Widera, C Kaltschmidt, A Storch and B Kaltschmidt (2015). Intrastratial transplantation of adult human neural crest-derived stem cells improves functional outcome in parkinsonian rats. *Stem Cells Transl Med* 4: 31–43.
61. Freed CR, PE Greene, RE Breeze, WY Tsai, W DuMouchel, R Kao, S Dillon, H Winfield, S Culver, JQ Trojanowski, D Eidelberg and S Fahn (2001). Transplantation of embryonic dopamine neurons for severe Parkinson's disease. *N Engl J Med*.
62. Olanow CW, CG Goetz, JH Kordower, AJ Stoessl, V Sossi, MF Brin, KM Shannon, GM Nauert, DP Perl, J Godbold and TB Freeman (2003). A double-blind controlled trial of bilateral fetal nigral transplantation in Parkinson's disease. *Ann Neurol*.
63. Hagell P, P Piccini, A Björklund, P Brundin, S Rehncrona, H Widner, L Crabb, N Pavese, WH Oertel, N Quinn, DJ Brooks and O Lindvall (2002). Dyskinesias following neural transplantation in parkinson's disease. *Nat Neurosci*.
64. Li JY, E Englund, JL Holton, D Soulet, P Hagell, AJ Lees, T Lashley, NP Quinn, S Rehncrona, A Björklund, H Widner, T Revesz, O Lindvall and P Brundin (2008). Lewy

bodies in grafted neurons in subjects with Parkinson's disease suggest host-to-graft disease propagation. *Nat Med*.

65. Hagell P and P Brundin (2001). Cell survival and clinical outcome following intrastriatal transplantation in Parkinson disease. *J Neuropathol Exp Neurol*.

66. Meyer AK, M Maisel, A Hermann, K Stirl and A Storch (2010). Restorative approaches in Parkinson's Disease: which cell type wins the race? *J Neurol Sci* 289: 93–103.

67. Baizabal J-M and L Covarrubias (2009). The embryonic midbrain directs neuronal specification of embryonic stem cells at early stages of differentiation. *Dev Biol* 325: 49–59.

68. Björklund LM, R Sánchez-Pernaute, S Chung, T Andersson, IYC Chen, KSP McNaught, AL Brownell, BG Jenkins, C Wahlestedt, KS Kim and O Isacson (2002). Embryonic stem cells develop into functional dopaminergic neurons after transplantation in a Parkinson rat model. *Proc Natl Acad Sci U S A*.

69. Maya-Espinosa G, O Collazo-Navarrete, D Millán-Aldaco, M Palomero-Rivero, G Guerrero-Flores, R Drucker-Colín, L Covarrubias and M Guerra-Crespo (2015). Mouse Embryonic Stem Cell-Derived Cells Reveal Niches that Support Neuronal Differentiation in the Adult Rat Brain. *Stem Cells* 33: 491–502.

70. Chung S, KC Sonntag, T Andersson, LM Bjorklund, JJ Park, DW Kim, UJ Kang, O Isacson and KS Kim (2002). Genetic engineering of mouse embryonic stem cells by *Nurr1* enhances differentiation and maturation into dopaminergic neurons. *Eur J Neurosci*.

71. Chiang YH, M Morales, FC Zhou, C Borlongan, BJ Hoffer and Y Wang (2001). Fetal

intra-nigral ventral mesencephalon and kidney tissue bridge transplantation restores the nigrostriatal dopamine pathway in hemi-parkinsonian rats. *Brain Res.*

72. Zhou FC, YH Chiang and Y Wang (1996). Constructing a new nigrostriatal pathway in the Parkinsonian model with bridged neural transplantation in substantia nigra. *J Neurosci.*

73. Gaillard A, M Decressac, I Frappé, PO Fernagut, L Prestoz, S Besnard and M Jaber (2009). Anatomical and functional reconstruction of the nigrostriatal pathway by intranigral transplants. *Neurobiol Dis* 35: 477–488.

74. Thompson LH, S Grealish, D Kirik and A Björklund (2009). Reconstruction of the nigrostriatal dopamine pathway in the adult mouse brain. *Eur J Neurosci* 30: 625–638.

75. Grealish S, E Diguët, A Kirkeby, B Mattsson, A Heuer, Y Bramouille, N Van Camp, AL Perrier, P Hantraye, A Björklund and M Parmar (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.

76. Adler AF, T Cardoso, S Nolbrant, B Mattsson, DB Hoban, U Jarl, JN Wahlestedt, S Grealish, A Björklund and M Parmar (2019). hESC-Derived Dopaminergic Transplants Integrate into Basal Ganglia Circuitry in a Preclinical Model of Parkinson's Disease. *Cell Rep* 28: 3462-3473.e5.

77. Arenas E, M Denham and JC Villaescusa (2015). How to make a midbrain dopaminergic neuron. *Dev* 142: 1918–1936.

78. Roeper J (2013). Dissecting the diversity of midbrain dopamine neurons. *Trends Neurosci.*

79. Carlsson A (2001). A half-century of neurotransmitter research: Impact on neurology

and psychiatry. In *Bioscience Reports*, p.

80. Chao J and EJ Nestler (2004). *Molecular Neurobiology of Drug Addiction*. *Annu Rev Med*.

81. Hornykiewicz O (1978). Psychopharmacological implications of dopamine and dopamine antagonists: a critical evaluation of current evidence. *Neuroscience*.

82. Lees AJ, J Hardy and T Revesz (2009). Parkinson's disease. *Lancet*.

83. Colas JF and GC Schoenwolf (2001). Towards a cellular and molecular understanding of neurulation. *Dev Dyn*.

84. Jessell TM (2000). Neuronal specification in the spinal cord: Inductive signals and transcriptional codes. *Nat Rev Genet*.

85. Goridis C and H Rohrer (2002). Specification of catecholaminergic and serotonergic neurons. *Nat Rev Neurosci*.

86. Matsunaga E, I Araki and H Nakamura (2000). Pax6 defines the di-mesencephalic boundary by repressing En1 and Pax2. *Development*.

87. Nakamura H, T Sato and A Suzuki-Hirano (2008). Isthmus organizer for mesencephalon and metencephalon. *Dev Growth Differ*.

88. Millet S, K Campbell, DJ Epstein, K Losos, E Harris and AL Joyner (1999). A role for Gbx2 in repression of Otx2 and positioning the mid/hindbrain organizer. *Nature*.

89. Chizhikov V V. and KJ Millen (2004). Mechanisms of roof plate formation in the vertebrate CNS. *Nat Rev Neurosci*.

90. Lee KJ and TM Jessell (1999). THE SPECIFICATION OF DORSAL CELL FATES IN THE VERTEBRATE CENTRAL NERVOUS SYSTEM. *Annu Rev Neurosci*.

91. Placzek M and J Briscoe (2005). The floor plate: Multiple cells, multiple signals. *Nat*

Rev Neurosci.

92. Machold R and G Fishell (2002). Hedgehog patterns midbrain ARChitecture. Trends Neurosci.

93. Andersson E, U Tryggvason, Q Deng, S Friling, Z Alekseenko, B Robert, T Perlmann and J Ericson (2006). Identification of intrinsic determinants of midbrain dopamine neurons. Cell 124: 393–405.

94. Blaess S, JMD Corrales and AL Joyner (2006). Sonic hedgehog regulates Gli activator and repressor functions with spatial and temporal precision in the mid/hindbrain region. Development.

95. Briscoe J, A Pierani, TM Jessell and J Ericson (2000). A homeodomain protein code specifies progenitor cell identity and neuronal fate in the ventral neural tube. Cell.

96. Ono Y, T Nakatani, Y Sakamoto, E Mizuhara, Y Minaki, M Kumai, A Hamaguchi, M Nishimura, Y Inoue, H Hayashi, J Takahashi and T Imai (2007). Differences in neurogenic potential in floor plate cells along an anteroposterior location: Midbrain dopaminergic neurons originate from mesencephalic floor plate cells. Development.

97. Fedtsova N and EE Turner (2001). Signals from the ventral midline and isthmus regulate the development of Brn3.0-expressing neurons in the midbrain. Mech Dev.

98. Ang SL (2006). Transcriptional control of midbrain dopaminergic neuron development. Development.

99. Omodei D, D Acampora, P Mancuso, N Prakash, LG Di Giovannantonio, W Wurst and A Simeone (2008). Anterior-posterior graded response to Otx2 controls proliferation and differentiation of dopaminergic progenitors in the ventral mesencephalon. Development.

100. Joksimovic M, BA Yun, R Kittappa, AM Anderegg, WW Chang, MM Taketo, RDG McKay and RB Awatramani (2009). Wnt antagonism of Shh facilitates midbrain floor plate neurogenesis. *Nat Neurosci*.
101. Ferri ALM, W Lin, YE Mavromatakis, JC Wang, H Sasaki, JA Whitsett and SL Ang (2007). Foxa1 and Foxa2 regulate multiple phases of midbrain dopaminergic neuron development in a dosage-dependent manner. *Development*.
102. Zetterström RH, L Solomin, L Jansson, BJ Hoffer, L Olson and T Perlmann (1997). Dopamine neuron agenesis in Nurr1-deficient mice. *Science* (80-).
103. Smits SM, T Ponnio, OM Conneely, JPH Burbach and MP Smidt (2003). Involvement of Nurr1 in specifying the neurotransmitter identity of ventral midbrain dopaminergic neurons. *Eur J Neurosci*.
104. Saucedo-Cardenas O, JD Quintana-Hau, WD Le, MP Smidt, JJ Cox, F De Mayo, JPH Burbach and OM Conneely (1998). Nurr1 is essential for the induction of the dopaminergic phenotype and the survival of ventral mesencephalic late dopaminergic precursor neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*.
105. Smidt MP, SM Smits, H Bouwmeester, FPT Hamers, AJA van der Linden, AJCGM Hellemons, J Graw and JPH Burbach (2004). Early developmental failure of substantia nigra dopamine neurons in mice lacking the homeodomain gene Pitx3. *Development*.
106. Nunes I, LT Tovmasian, RM Silva, RE Burke and SP Goff (2003). Pitx3 is required for development of substantia nigra dopaminergic neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*.
107. Guerrero-Flores G and L Covarrubias (2011). Dopaminergic Differentiation Potential of Neural Precursor Cells Derived from Embryonic Stem Cells. In *Embryonic Stem Cells: The Hormonal Regulation of Pluripotency and Embryogenesis*, p.

108. Gould E (2007). How widespread is adult neurogenesis in mammals? *Nat Rev Neurosci* 8: 481–488.
109. Altman J and GD Das (1965). Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J Comp Neurol*.
110. Wiskott L, MJ Rasch and G Kempermann (2006). A functional hypothesis for adult hippocampal neurogenesis: Avoidance of catastrophic interference in the dentate gyrus. *Hippocampus*.
111. So WK and TH Cheung (2018). Molecular regulation of cellular quiescence: A perspective from adult stem cells and its niches. In *Methods in Molecular Biology*, p.
112. Gould E (2007). How widespread is adult neurogenesis in mammals? *Nat Rev Neurosci* 8: 481–488.
113. Guo W, NE Patzlaff, EM Jobe and X Zhao (2012). Isolation of multipotent neural stem or progenitor cells from both the dentate gyrus and subventricular zone of a single adult mouse. *Nat Protoc*.
114. Albright JE, I Stojkowska, AA Rahman, CJ Brown and BE Morrison (2016). Nestin-positive/SOX2-negative cells mediate adult neurogenesis of nigral dopaminergic neurons in mice. *Neurosci Lett* 615: 50–54.
115. Morrison BE (2016). Discovery of nigral dopaminergic neurogenesis in adult mice. *Neural Regen Res*.
116. Zhao M, S Momma, K Delfani, M Carlén, RM Cassidy, CB Johansson, H Brismar, O Shupliakov, J Frisén and AM Janson (2003). Evidence for neurogenesis in the adult mammalian substantia nigra. *Proc Natl Acad Sci U S A*.
117. Frielingsdorf H, K Schwarz, P Brundin and P Mohapel (2004). No evidence for new

dopaminergic neurons in the adult mammalian substantia nigra. *Proc Natl Acad Sci U S A*.

118. Rathjen J and PD Rathjen (2001). Mouse ES cells : experimental exploitation of pluripotent differentiation potential. 587–594.

119. Kawasaki H, K Mizuseki, S Nishikawa, S Kaneko, Y Kuwana, S Nakanishi, SI Nishikawa and Y Sasai (2000). Induction of midbrain dopaminergic neurons from ES cells by stromal cell-derived inducing activity. *Neuron* 28: 31–40.

120. Kim HJ, M Sugimori, M Nakafuku and CN Svendsen (2007). Control of neurogenesis and tyrosine hydroxylase expression in neural progenitor cells through bHLH proteins and Nurr1. *Exp Neurol*.

121. Kim JY, HC Koh, JY Lee, MY Chang, YC Kim, HY Chung, H Son, YS Lee, L Studer, R McKay and SH Lee (2003). Dopaminergic neuronal differentiation from rat embryonic neural precursors by Nurr1 overexpression. *J Neurochem*.

122. Martinat C, J-J Bacci, T Leete, J Kim, WB Vanti, AH Newman, JH Cha, U Gether, H Wang and A Abeliovich (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.

123. Chung S, E Hedlund, M Hwang, DW Kim, B-S Shin, D-Y Hwang, UJ Kang, O Isacson and K-S Kim (2005). The homeodomain transcription factor Pitx3 facilitates differentiation of mouse embryonic stem cells into AHD2-expressing dopaminergic neurons. *Mol Cell Neurosci* 28: 241–252.

124. Friling S, E Andersson, LH Thompson, ME Jönsson, JB Hebsgaard, E Nanou, Z Alekseenko, U Marklund, S Kjellander, N Volakakis, O Hovatta, A El Manira, A

Björklund, T Perlmann and J Ericson (2009). Efficient production of mesencephalic dopamine neurons by Lmx1a expression in embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 7613–7618.

125. Cai J, A Donaldson, M Yang, MS German, G Enikolopov and L Iacovitti (2009). The Role of Lmx1a in the Differentiation of Human Embryonic Stem Cells into Midbrain Dopamine Neurons in Culture and After Transplantation into a Parkinson's Disease Model. *Stem Cells* 27: 220–229.

126. Ying QL, M Stavridis, D Griffiths, M Li and A Smith (2003). Conversion of embryonic stem cells into neuroectodermal precursors in adherent monoculture. *Nat Biotechnol*.

127. Guerrero-Flores G, A Bastidas-Ponce, O Collazo-Navarrete, M Guerra-Crespo and L Covarrubias (2017). Functional determination of the differentiation potential of ventral mesencephalic neural precursor cells during dopaminergic neurogenesis. *Dev Biol* 429: 56–70.

128. Ying Q-L, M Stavridis, D Griffiths, M Li and A Smith (2003). Conversion of embryonic stem cells into neuroectodermal precursors in adherent monoculture. *Nat Biotechnol* 21: 183–186.

129. Lee SH, N Lumelsky, L Studer, JM Auerbach and RD McKay (2000). Efficient generation of midbrain and hindbrain neurons from mouse embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 18: 675–679.

130. Guerrero-flores G, A Bastidas-ponce, O Collazo-navarrete and M Guerra- (2017). Functional determination of the differentiation potential of ventral mesencephalic neural precursor cells during dopaminergic neurogenesis. *Dev Biol* 429: 56–70.

131. Gonzalez-Reyes LE, M Verbitsky, J Blesa, V Jackson-Lewis, D Paredes, K Tillack, S Phani, ER Kramer, S Przedborski and AH Kottmann (2012). Sonic Hedgehog Maintains Cellular and Neurochemical Homeostasis in the Adult Nigrostriatal Circuit. *Neuron* 75: 306–319.
132. Arvidsson A, T Collin, D Kirik, Z Kokaia and O Lindvall (2002). Neuronal replacement from endogenous precursors in the adult brain after stroke. *Nat Med* 8: 963–970.
133. Jones KS and BJ Connor (2016). The effect of pro-neurogenic gene expression on adult subventricular zone precursor cell recruitment and fate determination after excitotoxic brain injury. *J Stem Cells Regen Med* 12: P25–P35.
134. Boronat-García A, M Guerra-Crespo and R Drucker-Colín (2017). Historical perspective of cell transplantation in Parkinson’s disease. *World J Transplant.*
135. Parent JM, ZS Vexler, C Gong, N Derugin and DM Ferriero (2002). Rat forebrain neurogenesis and striatal neuron replacement after focal stroke. *Ann Neurol* 52: 802–813.
136. Siamakpour-Reihani S, J Caster, DB Nepal, A Courtwright, E Hilliard, J Usary, D Ketelsen, D Darr, XJ Shen, C Patterson and N Klauber-DeMore (2011). The Role of calcineurin/NFAT in SFRP2 induced angiogenesis-A rationale for breast cancer treatment with the calcineurin inhibitor Tacrolimus. *PLoS One.*
137. Rafiee P, J Heidemann, H Ogawa, NA Johnson, PJ Fisher, MS Li, MF Otterson, CP Johnson and DG Binion (2004). Cyclosporin A differentially inhibits multiple steps in VEGF induced angiogenesis in human microvascular endothelial cells through altered intracellular signaling. *Cell Commun Signal.*

138. Wong RHF, I Chang, CSS Hudak, S Hyun, HY Kwan and HS Sul (2009). A Role of DNA-PK for the Metabolic Gene Regulation in Response to Insulin. *Cell*.

139. Jaeger I, C Arber, JR Risner-Janiczek, J Kuechler, D Pritzsche, I-C Chen, T Naveenan, MA Ungless and M Li (2011). Temporally controlled modulation of FGF/ERK signaling directs midbrain dopaminergic neural progenitor fate in mouse and human pluripotent stem cells. *Development* 138: 4363–4374.

Anexo 1. Materiales y métodos

1. Cultivo celular

Medios de cultivo, factores de crecimiento y suplementos

1. Medio DMEM (Dulbecco's *modified Eagle's medium*, Gibco). Disolver el contenido del sobre en un litro de agua desionizada estéril, ajustar el pH a 7.4, filtrar con membrana de 0.22 μm (Millex-GV) y almacenar a 4°C hasta por un mes.
2. Suero fetal de bovino certificado para su uso en células troncales (SFB, Gibco o Hyclone). Inactivar a 56°C durante 30 min. Se recomienda hacer alícuotas y almacenar a -20°C.
3. β -Mercaptoetanol (Gibco).
4. Glutamax/Penicilina/Estreptomicina 100x (GPS, glutamax/*penicilin /streptomicyn*). Disolver en 10 ml de glutamax (Gibco) 300 mg de penicilina (Sigma) y 500 mg de estreptomicina (Sigma) para después filtrar con membrana de 0.22 μm . Una vez filtrado agregar 90 ml extra de Glutamax. Hacer alícuotas y almacenar a -20°C.
5. Piruvato de sodio 100x (Gibco).
6. Aminoácidos no esenciales 100x (Gibco).
7. Solución amortiguadora de fosfatos estéril (PBS; *phosphate saline buffer*). Disolver en 900 mL de agua desionizada estéril 8 g de cloruro de sodio (NaCl, J. T. Baker), 0.2 g de cloruro de potasio (KCl, Sigma), 1.44 g de fosfato de sodio dibásico (Na₂HPO₄, Sigma) y 0.24 g de fosfato de potasio monobásico (KH₂PO₄, Sigma). Ajustar pH a 7.4 y filtrar con membrana de 0.22 μm .

8. Gelatina de piel de porcino 0.1% (Sigma). Mezclar 0.01 g de gelatina de piel de porcino en agua desionizada estéril. Calentar en el microondas para disolver (no es recomendable que hierva). Filtrar con membrana de 0.22 μm y almacenar a temperatura ambiente. Si la gelatina se prepara a una concentración mayor, ésta deberá de esterilizarse en autoclave.
9. Verseno 10 x (EDTA 0.22%, Gibco). Disolver en 50 mL de PBS 10 mg de EDTA y filtrar con membrana de 0.22 μm .
10. Tripsina 2.5% (Gibco).
11. Factor inhibidor de leucemia (LIF: *Leukemia Inhibitor Factor*, Chemicon).
12. Mitomicina C (Mitolem). Disolver 2 mg en 4 mL de PBS estéril (0.5 mg/mL).
13. Poli-D-lisina (Sigma) 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en agua desionizada estéril.
14. Medio para cultivo de células troncales (M15). Preparar 100 mL de DMEM al 15% de SFB, GPS 1x, piruvato de sodio 1x, aminoácidos no esenciales 1x y 180 μL de β -Mercaptoetanol. No es necesario filtrar.
15. Medio de cultivo para fibroblastos embrionarios de ratón o células alimentadoras (M10). Preparar 50 mL de DMEM al 10% de SFB, GPS 1x, piruvato de sodio 1x, aminoácidos no esenciales 1x y 180 μL de β -Mercaptoetanol.
16. Medio de congelación. Se deberá preparar con 60% de DMEM, 20% de dimetil sulfóxido grado cultivo celular (DMSO, Sigma) y 20% de SFB.
17. Medio de selección de células precursoras neurales ITS-A (*insulin/transferrin, selenium/sodium piruvate*). A 7500 μL de medio DMEM/F12 sin HEPES agregar 100 μL de suplemento ITS-A 100x (Gibco), 100 μL de GPS al 100x y 50 μL de fibronectina del stock al 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (Gibco). Filtrar con membrana de 0.22 μm .

18. Medio para expansión de Células Precursoras Neurales. Para 50 mL:

- DMEM/F12 sin HEPES (Gibco): 48.441 mL.
- N2 100x (Gibco): 500 μ L.
- GPS 100x: 500 μ L.
- Laminina 0.85 μ g/ μ L (Gibco): 58.82 μ L.
- Factores de crecimiento. Preparar a las siguientes concentraciones:
 - Fgf2: 1 ng/mL (Gibco).
 - Fgf8: 5 ng/mL (Peprotech).
 - Shh: 25 ng/mL (Peprotech).

Las alícuotas de Fgf2, Fgf8 y Shh deben diluirse en medio DMEM/F12 sin HEPES con albúmina (Sigma) a 1 mg/mL. Esterilizar por filtración con membrana de 0.22 μ m.

- Medio para diferenciación de Células Precursoras Neurales a neuronas DAs.

Para 50 mL:

- DMEM/F12 sin HEPES: 48.441 mL.
- N2 100x: 500 μ L.
- GPS 100x: 500 μ L.
- Laminina 0.85 μ g/mL: 58.82 μ L.
- Ácido ascórbico 10 mM (Sigma): 500 μ L.

2. Obtención de fibroblastos embrionarios de ratón.

Materiales e insumos

- Hembras gestantes de E13.5-E14.5 días post-coito.
- Cajas de cultivo de 10 cm de diámetro (Corning).
- Medio M10.
- Material de disección.
- Tubo para centrífuga de 15 mL.
- Alcohol al 70%.
- Microscopio estereoscópico
- Gelatina de piel de porcino.
- Tripsina 2.5%.
- Verseno 1x (EDTA 0.02%).
- PBS 1x
- 2 jeringas de 5 mL con aguja.
- Filtro de membrana de 0.22 μm
- Agua destilada estéril.

Procedimiento

1. De un grupo de hembras en etapa reproductiva (preferentemente de una edad entre 6 semanas y 4 meses) identificar aquellas que se encuentren en la etapa de estro y colocarlas en compañía de un macho fértil. Se pueden colocar hasta dos hembras con un macho. El procedimiento se debe llevar a cabo por la tarde (entre las 17 y 19 h).

La presencia de “tapón vaginal” (*copulation plug*) en la mañana siguiente a la cruce será indicativo de apareamiento y tendrá que considerarse como el día 0.5

de gestación. Es importante que las hembras sean examinadas durante las primeras horas de la mañana (8 a 10 h), de lo contrario el tapón vaginal puede ya no ser visible.

2. Para gelatinizar las cajas de 10 cm de diámetro es necesario verter 4 mL de gelatina de piel de porcino al 0.1% y distribuir uniformemente sobre la superficie de la caja e incubar a temperatura ambiente al menos media hora. Transcurrido el tiempo de incubación desechar los restos de gelatina líquida que permanecen en la caja. Las cajas se pueden almacenar hasta por una semana a temperatura ambiente.
3. Sacrificar a la ratona gestante por dislocación cervical, limpiar la zona ventral con alcohol al 70% y hacer una incisión sobre la piel del abdomen con la finalidad de descubrir el peritoneo. Con ayuda de una pinza levantar el peritoneo y hacer una incisión, exponer los cuernos uterinos y realizar una disección cuidando no dañar los embriones. Colocar los cuernos uterinos en una caja de cultivo limpia y apartar los embriones cortando entre las separaciones de los sacos amnióticos.
4. Tomar cada uno de los embriones y, con ayuda de dos pinzas, rasgar el saco amniótico hasta que el embrión quede totalmente expuesto. Bajo el microscopio, hacer una disección de la cabeza, cola, extremidades inferiores y superiores y separarlos del resto del cuerpo, posteriormente, hacer una incisión longitudinal desde la cavidad abdominal hasta la cavidad torácica y retirar todos los órganos

internos para después verter los arcos costales junto con las vértebras en el tubo de 15 mL con PBS 1x.

5. Quitar el émbolo de una jeringa de 5 mL y transferir el tejido con el menor volumen de líquido posible. Procurar que el tejido se sitúe en el fondo de la jeringa y colocar nuevamente el émbolo. Dentro de la campana de flujo laminar abrir una de las cajas gelatinizadas y desplazar el émbolo de la jeringa con la finalidad de comprimir el aire y hacer pasar el tejido por la jeringa. El tejido será “macerado” y expulsado con fuerza. Procurar que quede bien distribuido sobre la superficie de la caja de cultivo.
6. Añadir 10 mL de medio M10 e incubar a 37° C y 5% de CO₂.
7. Cambiar medio a las 24 h y cada vez que éste se acidifique hasta que las células lleguen a la confluencia deseada.
8. Cuando la confluencia celular sea cercana al 90% retirar el medio y lavar dos veces con PBS atemperado a 37°C. Añadir 1 mL de tripsina al 0.25% diluida en verseno 1x. Incubar de 5 a 10 min a 37°C. Transcurrido el tiempo, inactivar la tripsina con 1 mL de medio M10 y transferir la suspensión celular a un tubo de centrifuga de 15 mL. Dejar sedimentar los retos de tejido por 5 min y transferir el sobrenadante a otro tubo de centrifuga de 15 mL; centrifugar 3 min a 1000 rpm y retirar el sobrenadante. Resuspender el comprimido celular con medio M10 en un

volumen no mayor a 5 mL y resembrar las células recuperadas en 2 ó 3 cajas de 10 cm utilizando M10. Cambiar medio a las 24 h y cada vez que se acidifique.

9. Congelar cuando las células tengan una confluencia del 90% (ver protocolo de congelación más adelante).

3. Establecimiento de monocapa de células alimentadoras

Materiales e insumos

- Fibroblastos embrionarios de ratón.
- Caja de cultivo de 60 mm de diámetro.
- Gelatina de piel de porcino 1x.
- Mitomicina.
- Medio de cultivo M10.
- PBS 1x estéril.

Procedimiento

1. Gelatinizar una caja de cultivo de 60 mm como se mencionó en el procedimiento anterior.
2. Sembrar de 1×10^6 fibroblastos embrionarios de ratón en 4 mL de medio M10. Cambiar medio a las 24 h y revisar confluencia.
3. Cuando la confluencia celular sobre la superficie de la caja se encuentre entre el 80 y 90 %, agregar al medio 100 μ L de mitomicina que se encuentra a una

concentración de 2 mg/5 mL (disuelta en PBS 1x) e incubar durante dos horas a 37°C.

4. Después de las dos horas de incubación se debe de retirar el medio que contiene la mitomicina y lavar la superficie de la caja dos veces con PBS 1x atemperado a 37°C. Adicionar 4 mL de medio M10 atemperado a 37°C.
5. Mantener la monocapa de células alimentadoras en la incubadora.

4. Amplificación de CTEs

Materiales e insumos

- Monocapa de células alimentadoras.
- Alícuota de células troncales embriónicas.
- Medio M15.
- CHIR99021.
- PDO325901.
- PBS 1x estéril.
- Tripsina 0.25%.
- Cajas de 60 mm gelatinizadas.

Procedimiento

1. Sembrar 1×10^6 de CTEs sobre la monocapa de células alimentadoras utilizando medio M15. Cambiar el medio a las 24 h y cada vez que éste se acidifique.

2. Una vez que las colonias de CTEs cubran el entre el 80 y 90% de la superficie se tienen que subcultivar. Para el subcultivo se debe de retirar el medio y lavar dos veces con PBS1x, añadir 500 μ L de tripsina 0.25% (diluida en verseno 1x) e incubar hasta que se hayan despegado las colonias (entre 5-10 min) a 37°C, inactivar tripsina con 2 mL de medio M15 y pasar la suspensión a un tubo de 15 mL. Centrifugar 3 min a 1000 rpm y retirar el sobrenadante.
3. Realiza el conteo celular y sembrar 1×10^6 células en una caja de 60 mm de diámetro (se pueden sembrar más de una caja de manera consecutiva para obtener un mayor número de células).
4. Adicionar CHIR99021 y PDO325901 (medio 2i) 1 μ L/mL de medio M15 concentraciones.
5. Cambiar medio a las 24 h y cada vez que el medio se acidifique.
6. Cultivar en medio 2i hasta llegar a confluencia de entre 80 y 90%.
7. Congelar (ver protocolo de congelación más adelante).

5. Protocolo de diferenciación neural en monocapa

Materiales e insumos

- Placas de cultivo de 24 pozos.
- Gelatina 1x.
- Medio M15.
- PBS 1x estéril.
- Suplemento N2 100x.
- Suplemento B27 100x.
- Medio DMEM/F12 con HEPES.
- Medio neurobasal.

- CTEs en cultivo.

Procedimiento

1. Subcultivar de 5×10^5 a 1×10^6 CTEs a una caja gelatinizada de 35 mm e incubar por 24 h.
2. Subcultivar las células y sembrar en una placa de 24 pozos previamente gelatinizada, sembrar 200 mil células por pozo e incubar durante 15 h con medio M15.
3. Retirar el medio y lavar dos veces con PBS1x.
4. Preparar medio de diferenciación neural con 50% de DMEM/F12 y 50% de neurobasal, suplementarlo con 1x de N2 y B27.
5. Cultivar durante 7 días y realizar cambios de medio cada 24 ó 48 h.

6. Protocolo de diferenciación neuronal de 5 etapas

Materiales e insumos

- Monocapa de células alimentadoras.
- CTEs en cultivo.
- Medio M15.
- Factor inhibidor de leucemia (*inhibitor leukemia factor*; LIF).
- Tripsina 0.25% y 0.05%.
- PBS 1x estéril.

- Cajas gelatinizadas de 60 mm y 10 cm.
- Cajas de cultivo bacteriológicas (no adherentes).
- Placas de cultivo de 24 pozos.
- Poli-D-lisina 10 µg/mL; preparada con agua milli-Q y filtrada con membrana de 0.22 µm.
- Fibronectina 1 mg/mL; preparada con agua milli-Q y filtrada con membrana de 0.22 µm.
- Medio de selección de PNs.
- Medio de expansión de PNs.
- Medio de diferenciación neuronal.

Procedimiento

Primera etapa: Expansión de CTEs

1. Sembrar de 1 a 2×10^6 millones de CTEs sobre la capa de células alimentadoras. Cambiar medio cada 24 h.
2. Una vez que se logre la confluencia de 80 al 90% (aproximadamente al 3er día), subcultivar a una caja gelatinizada libre de células alimentadoras. En esta etapa se debe de utilizar medio M15 suplementado con LIF (1 uL/mL). Cambiar y suplementar medio cada 24 h.

Segunda etapa: Formación de CEs

3. Una vez alcanzada la confluencia (3 a 4 días), las células deben de ser subcultivadas a una placa de cultivo no adherente (de 1 a 2×10^6) utilizando M15 sin adicionar ningún factor anti-diferenciación.
4. Dos días después de la siembra de las células troncales se habrán formado CEs de 2 días. Para hacer el cambio de medio todo el contenido de la caja se debe de pasar a un tubo de centrifuga de 50 mL, ya sea con una pipeta de boca ancha (desechable de 25 mL), o bien, vaciando gentilmente el contenido de la caja directamente al tubo, ello con la finalidad de no dañar los agregados. Dejar sedimentar por 5 min y aspirar de 5 a 7 mL de medio procurando no dañar los agregados en el fondo del tubo.
5. Añadir medio M15 hasta completar 10 mL y resuspender de manera gentil con la pipeta desechable de 25 mL.
6. Resembrar los CEs en la caja original.

Tercera etapa: selección de PNs

7. Al día 4 de la formación de CEs éstos deben de ser transferidos gentilmente a un tubo de 50 mL, dejar que se sedimenten por 5 min y retirar el mayor volumen de medio posible.
8. Resuspender en 10 mL de medio M15 y sembrar en una caja gelatinizada de 10 cm.

9. Al día siguiente de haber hecho el subcultivo, se debe de retirar el medio y lavar 2 veces con PBS 1x y adicionar 10 mL de medio de selección de PNs.
10. Cambiar medio a las 24 h y cada vez que se acidifique hasta el 6to día. Las cajas para la expansión de precursores se deben de preparar entre el 4º y 5º de la etapa de selección (ver más adelante).

Cuarta etapa: expansión de PNs

11. Cubrir los pozos de una caja de 24 pozos con 0.5 mL de poli-D-lisina (10 mg/mL) e incubar toda la noche.
12. Lavar los pozos 3 veces con PBS 1x y cubrir con 0.5 mL de fibronectina (1 mg/mL) e incubar a 37°C por al menos 3 h, después lavar 3 veces con PBS 1x.
13. Cumplidos los 6 días de la selección, aspirar el medio de las cajas con las células y lavar 2 veces con PBS 1x.
14. Agregar 2 mL de tripsina 0.05% e incubar por 5 min a 37°C. Balancear la caja gentilmente e incubar por 5 min más.
15. Inactivar la tripsina con 3 mL de medio M15. Utilizando los 5 mL tripsina/M15 lavar repetidamente el fondo de la caja procurando que todas las células se desprendan. Es importante no despegar los agregados remanentes de la etapa de selección.
16. Transferir la suspensión a un tubo de centrifuga de 15 mL y dejar que los agregados se sedimenten por 5 min.

17. Tomar el sobrenadante y transferirlo a un tubo de centrifuga de 15 mL. Disociar brevemente y centrifugar a 1000 rpm por 3 min.
18. Resuspender en medio de expansión de PNs y sembrar de 3×10^5 células por pozo en las cajas pretratadas con poli-D-lisina y fibronectina.
19. Agregar Fgf2 (10 ng/ml), Fgf8 (100 ng/ml) y Shh (500 ng/ml), procurar que el volumen final en el pozo sea de 500 μ L, e incubar a 37°C.
20. Cambiar el medio de expansión al 3^{er} día y cada vez que éste se acidifique.

Quinta etapa: Diferenciación de PNs a neuronas DAs

21. Cambiar el medio de expansión por medio de diferenciación. Incubar durante 6 días cambiando medio cada 48 h.

7. Extracción de RNA y qPCR

- Materiales e insumos
- Suspensión de células recuperadas de cultivo.
- TRIzol (Invitrogen)
- Cloroformo (J. T. Baker)
- Centrifuga refrigerada.
- Tubos libres de RNAsas (Axigen).
- Micropipetas limpias.
- Puntas para micropipeta libres de RNAsas.
- Isopropanol (J. T. Baker).
- Etanol grado biología molecular (Merck).
- Agua estéril y libre de RNAsas.
- Kit de DNAsa (Roche).
- Nanofotómetro (Implen).

- Buffer de urea 10 M a 2% de azul de bromofenol.
- Gel de agarosa al 2%
- TAE 1x
- Cámara de electroforesis y fuente de poder.
- Termociclador Rotor Gene (Qiagen)
- Kit de síntesis de cDNA.

Procedimiento

1. Centrifugar las células y descartar el sobrenadante.
2. Añadir 500 μ L de TRIzol e incubar las muestras 5 min a temperatura ambiente.
3. Añadir 100 μ L de cloroformo, agitar por inversión por 10-15 s y dejar reposar 5 min a TA para después centrifugar a 10,000 rpm por 30 min a 4°C.
4. Se formarán tres fases, se toma la fase acuosa, cuidando de no tomar parte de alguna de las otras y transferir a un tubo limpio.
5. Añadir 250 μ L de isopropanol y mezclar suavemente por inmersión por 15 s. Dejar toda la noche a -20°C.
6. Centrifugar a 10,000 rpm, 4°C, por 30 min (se formará un pellet). Quitar el sobrenadante, añadir 500 μ L de etanol al 75% (diluirlo en H₂O estéril y libre de RNAsas) y agitar con vórtex por 5-10 s.
7. Centrifugar a 14,000 rpm a 4°C por 15 min. Remover el sobrenadante y dejar secar a TA. Disolver en agua estéril y libre de RNAsas, entre 5–20 μ L dependiendo del tamaño del pellet.
8. Mezclar 5 μ L de RNA, 1 μ L de *buffer* DNAsa 10x, 0.2 μ L DNAsa, llevar a 10 μ L con H₂O y calentar por 15 min a 37°C.

9. Cuantificar el RNA en el nanofotómetro.
10. Para verificar la integridad del RNA se mezcla el volumen que contenga 1 µg de RNA y se agregan 3 volúmenes de *buffer* de urea (10 M de urea con 2% de azul de bromofenol), se mezcla y se calienta a 55°C por 5 min. La mezcla se corre en un gel de agarosa al 2% con TAE 1x, dejando que el azul salga del pozo (10-15 min a 100 V).
11. Para corroborar que las muestras no contengan DNA genómico, se hace un PCR con el RNA utilizando un par de oligonucleótidos que logren distinguir RNAm (oligos para el gen *Th*) de DNA genómico.
12. Para la síntesis de cDNA, mezclar el oligo dT, el RNA y los dNTPs y se calientan 5 min a 65°C. Se centrifugan 1 min. Se añade el *buffer*, DTT, la enzima y el agua y se mezcla. Se incuba a 42°C por una hora y luego 10 min a 72°C (6 µL *buffer* 5x, dNTPs 10 mM 1.5 µL, 1 µL oligo dT 500 µg/mL, transcriptasa 0.5 µL, DTT 3 µL, RNA 1 µg y llevar a 30 µL con agua).
13. Verificar mediante PCR de un gene constitutivo (*Ciclofilina* o *Rplp0*) que el cDNA se haya sintetizado bien y que no tenga DNA genómico (oligos para *Th*).

Gene	Sequence 5' to 3'	Reference
<i>Rplp0</i>	Forward: CACTGGTCTAGGACCCGAGAA Reverse: AGGGGGAGATGTTCAGCATGT	[138]
<i>Cyclophilin</i>	Forward: GGCAAATGCTGGACCAAACAC Reverse: TTCCTGGACCCAAAACGCTC	

<i>Nestin</i>	Forward: TGAGAACTCTCGCTTGCAGACAC Reverse: GGTCCTCTGGTATCCCAAGGAAATG	[139]
<i>Th</i>	Forward: TGGGACACGTACCCATGTTG Reverse: ACCAGTACACCGTGGAGAGT	Primer blast
<i>Th genómico</i>	Forward: TACGCCACGCTGAAGGGCCTCTAT Reverse: AGGTGAGGAGGCATGACGGATGTA	Primer blast
<i>Lmx1a</i>	Forward: GGACCATAAGCGACCCAAAC Reverse: CCTGAACCACACGGACACTC	[139]
<i>Tg-Lmx1a</i>	Forward: GGACCATAAGCGACCCAAAC Reverse: CCTGAACCACACGGACACTC	Primer blast

8. Preparación de suspensión celular para implante al mesencéfalo o trasplante al cerebro adulto

Materiales e insumos

- CEs de 4 días.
- Tripsina 0.25%.
- Medio Optimem (Gibco).

Procedimiento

1. Transferir los CEs de 4 días a un tubo falcon de 15 mL.

2. Centrifugar a 200 rpm durante 2 min y aspirar el sobrenadante.
3. Agregar al tubo 2 mL de tripsina al 0.25% atemperada y resuspender gentilmente.
4. Incubar durante 15 min procurando mover cada 5 min.
5. Inactivar con 5 mL de medio M15, resuspender y tomar una alícuota para contar el número de células.
6. Centrifugar durante 3 min a 1000 rpm, retirar el sobrenadante y resuspender en medio optimen procurando tener una concentración de $3 \times 10^5/\mu\text{L}$.
7. Mantener la suspensión celular en hielo hasta el momento del implante al explante de mesencéfalo o trasplante al cerebro adulto.

9. Implante de células de CEs al mesencéfalo de embrión

Materiales e insumos

- Mesencéfalos de E10.5.
- Medio DMEM/F12.
- Mezcla de colágena compuesta por 25% colágena de rata, 2.5% NaCl 1.5 M. 2.5% NaHCO_3 al 7.5% y 70 % de medio para explantes.
- Medio para explantes compuesto por 72% de medio Optimem, 25% de DMEM/F12 con HEPES, Glucosa 40 mM y GPS 1x.
- Capilar de cristal estirado.
- Sistema de aspiración para pipeta de boca.
- Cajas de cultivo de 35 mm.

Procedimiento

1. Falta la parte de obtener los mesencéfalos.
2. Cortar la línea media dorsal del mesencéfalo para cultivar los tejidos en la disposición de “libro abierto”.
3. Gentilmente y con ayuda de una pipeta de boca ancha o una punta de micropipeta recortada, transferir cada uno de los tejidos a una caja de 35 mm (4 explantes máximo por caja) dejando un poco del medio donde se hizo la disección.
4. Dentro de la gota, los tejidos se deben de manipular para posicionar la zona ventricular hacia arriba y la zona pial en contacto con la superficie de la caja. Una vez que el tejido se haya posicionado, se debe de retirar el mayor volumen de medio posible y se embebe cada mesencéfalo en 35 μ L de la mezcla de colágena.
5. Antes de cortar los explantes por la línea media dorsal, preparar una suspensión de células de CEs.
6. Con la ayuda de un mechero, estirar varias pipetas de cristal con la finalidad de obtener una con un diámetro muy reducido que permita el flujo de la suspensión celular. Colocar la pipeta en el sistema de aspiración.
7. Utilizar la pipeta de cristal y el sistema de aspiración para colocar las células de la suspensión celular sobre la superficie del explante sin perforarlo.
8. Una vez que se haya hecho el “depósito” de las células sobre la región ventricular del mesencéfalo, éste se debe de incubar por 3 h a 37°C.
9. Cumplido el tiempo de incubación agregar gentilmente 2 mL de medio de explantes y cultivar hasta por 7 días a 37°C.

10. Cambiar la mitad de medio cada 48 h.

10. Trasplante de células de CEs a la SNpc de rata adulta

Materiales e insumos

- Ratas Wistar Macho de 250-280 g.
- Mezcla de ketamina y xilacina (PiSA).
- Epinefrina/Lidocaína (PiSA).
- Equipo de cirugía estereotáxica.
- Instrumental e insumos de cirugía.
- Suspensión celular de cuerpos embriodes.
- Jeringa Hamilton de 5 μ L.

Procedimiento

1. Preparar la suspensión celular de CEs y mantenerla en hielo.
2. Pesar a la rata y administrar vía intraperitoneal la dosis de ketamina y xilacina.
3. Una vez que la rata se haya sedado y no muestre signos de sensibilidad o reflejo proceder a “montarla” en el equipo estereotáxico.
4. Inyectar subcutáneamente en la parte superior del cráneo 0.2 mL de epinefrina/lidocaína.
5. Con ayuda de un bisturí, hacer una incisión longitudinal sobre la meseta superior del cráneo. Limpiar cualquier residuo de sangre con un hisopo hasta hacer visible la sutura craneal *bregma*.

6. Trepanar el cráneo en las coordenadas con respecto a *bregma*: -4.7 mm anteroposterior y -1.6 mm medio lateral.
7. Resuspender la suspensión celular y cargar 2 μL con la jeringa Hamilton.
8. Hacer llegar el bisel de la jeringa a través del trepano hasta la coordenada -8.1 mm dorsoventral con respecto a bregma.
9. Trasplantar 1 μL de suspensión celular ($\sim 1.5 \times 10^5$ células) a una velocidad aproximada de 0.1 $\mu\text{L}/\text{min}$. Una vez realizado el trasplante, esperar 3 min antes de retirar la jeringa.
10. Cubrir el trepano con cera para hueso, limpiar la herida con solución salina estéril, cerrar la herida y permitir la recuperación de la rata.
11. Con la misma suspensión se puede repetir el procedimiento hasta en 5 ratas.

11. Inmunomarcajes

Materiales e insumos

- Lápiz hidrofóbico (Vector).
- PBS 1x.
- Cámara húmeda.
- PBT (PBS 1x/ 0.03% Tritón x-100; Biorad).
- Anticuerpos primarios (ver tabla 1).
- Anticuerpos secundarios (ver tabla).
- Recuperador de antígenos 1x (Buffer de citratos; Bio SB).

- Solución de bloqueo.
- DAPI (4', 6-diamino-2-fenilindol; Invitrogen) 1:15,000 en PBS 1x.
- Solución de montaje (Dako).

11.1 Inmunomarcaje en cortes de explantes

1. Dejar las laminillas a TA hasta que pierdan la humedad generada por el descongelamiento, una vez secas pintar cuadrantes alrededor del tejido con lápiz hidrofóbico.
2. Hacer un lavado con PBS durante 10 min (los tejidos nunca deben secarse por lo que las laminillas siempre se dejan en una cámara húmeda).
3. Lavar 3 veces con PBT a TA, 10 min cada lavado.
4. Incubar con recuperador de antígenos a 65°C por 20 min y posteriormente 15 min a TA. Después hacer 2 lavados de 5 min con PBS.
5. Incubar en la solución de bloqueo por 1 h a TA.
6. Diluir los anticuerpos primarios en la solución de bloqueo según la concentración indicada.
7. Incubar los tejidos en el anticuerpo primario durante 30 min a TA y después toda la noche a 4°C.
8. Hacer 3 lavados de 10 min con PBS.
9. Incubar 2 h con el anticuerpo secundario diluido en PBS.
10. Hacer dos lavados de 10 min con PBS.
11. Incubar con DAPI por 5 min para teñir núcleos.
12. Realizar 2 lavados de 10 min con PBS.
13. Se agrega la solución de montaje y se coloca el cubreobjetos tratando de no dejar burbujas.

11.2 Inmunomarcaje en cultivo celular en cajas de cultivo

1. Si las cajas fueron guardadas a 4°C se dejan temperar por unos minutos y se hace un lavado con PBS. Posteriormente se hacen 3 lavados de 10 min con PBT.
2. Se incuba en solución de bloqueo durante 30 min.
3. El anticuerpo primario se diluye en solución de bloqueo y se incuba durante toda la noche a 4°C con agitación moderada.
4. Después se hacen 3 lavados de 10 min con PBS.
5. Se incuba con el anticuerpo secundario 1 h a TA con agitación.
6. Se hace un lavado con PBS.
7. Se incuba con DAPI por 5 min.
8. Se hacen 2 lavados más con PBS y se cubre con solución de montaje.

11.3 Inmunomarcaje en cortes de cerebro

Ya que los cortes de cerebro se mantienen en flotación, el proceso de inmunomarcaje se debe de llevar a cabo en placas de cultivo de multipozos, no es necesario que éstas sean estériles.

1. Lavar los cortes en la caja multipozos (de 24 pozos) 10 min con PBS 1x.
2. Se lava 3 veces con PBT, 10 min por lavado.
3. Se incuba con recuperador de antígenos 1x a 65°C durante 30 min. El recuperador de antígenos tiene que ser atemperado antes de usarse.

4. Incubar 15 min a temperatura ambiente.
5. Lavar 3 veces con PBT e incubar con solución de bloqueo durante 30 min.
6. Diluir el anticuerpo primario en solución de bloqueo e incubar el tejido en 150 μ L durante 15 min a TA. Utilizar cajas de 96 pozos.
7. Incubar toda la noche a 4° C y en agitación lenta.
8. Lavar 3 veces con PBT.
9. Incubar 2 h a TA con anticuerpo secundario diluido en solución de bloqueo.
10. Lavar 3 veces con PBS 1x.
11. Incubar con DAPI durante 15 min.
12. Lavar 3 veces con PBS 1x.
13. Montar los cortes en laminillas, secar el exceso de PBS y cubrir con solución de montaje. Procurar no dejar burbujas.
14. Cubrir con un cubreobjetos ultrafino.
15. Sellar los bordes del cubreobjetos con barniz para uñas y dejar secar toda la noche a 4°C.

Anticuerpos primarios	Origen	Dilución	Marca
Anti-NeuN	Ratón	1:200	Chemicon
Anti-Dcx	Cabra	1:500	SantaCruz
Anti-Th	Conejo	1:2000	Chemicon
Anti-Nestin	Ratón	1:500	Millipore
Anti-Lmx1a	Conejo	1:2000	Millipore

Anticuerpos secundarios	Origen	Dilución	Marca
Anti-Ratón IgGs coupled to Alexa flour 555	Burro	1:1000	Invitrogen

Anti-Ratón IgGs coupled to Alexa flour 549	Burro	1:1000	Invitrogen
Anti-Ratón IgGs coupled to Alexa flour 647	Burro	1:1000	Invitrogen

Anexo 2. Publicaciones.

STEM CELLS AND DEVELOPMENT
Volume 28, Number 16, 2019
© Mary Ann Liebert, Inc.
DOI: 10.1089/scd.2018.0226

The Substantia Nigra Is Permissive and Gains Inductive Signals When Lesioned for Dopaminergic Differentiation of Embryonic Stem Cells

Omar Collazo-Navarrete,^{1,2,*} David Hernández-García,² Gilda Guerrero-Flores,^{2,*} René Drucker-Colín,^{1,†} Magdalena Guerra-Crespo,^{1,§} and Luis Covarrubias²

Transplantation of dopaminergic (DA) cells into the striatum can rescue from dopamine deficiency in a Parkinson's disease condition, but this is not a suitable procedure for regaining the full control of motor activity. The minimal condition toward recovering the nigrostriatal pathway is the proper innervation of transplanted DA neurons or their precursors from the substantia nigra pars compacta (SNpc) to their target areas. However, functional integration of transplanted cells would require first that the host SNpc is suitable for their survival and/or differentiation. We recently reported that the intact adult SNpc holds a strong neurogenic environment, but primed embryonic stem cells (ie, embryoid body cells, EBCs) could not derive into DA neurons. In this study, we transplanted into the intact or lesioned SNpc, EBCs derived from embryonic stem cells that were prompt to differentiate into DA neurons by the forced expression of *Lmx1a* in neural precursor cells (R1B5/NesE-Lmx1a). We observed that, 6 days post-transplantation (dpt), R1B5 or R1B5/NesE-Lmx1a EBCs gave rise to Nes⁺ and Dcx⁺ cells within the host SNpc, but a large number of Th⁺ cells derived only from EBCs exogenously expressing *Lmx1a*. In contrast, when transplantation was carried out into the 6-hydroxidopamine-lesioned SNpc, the emergence of Th⁺ cells from EBCs was independent of exogenous *Lmx1a* expression, although these cells were not found by 15 dpt. These results suggest that the adult SNpc is not only a permissive niche for initiation of DA differentiation of non-neuralized cells but also releases factors upon damage that promote the acquisition of DA characteristics by transplanted EBCs.

Keywords: transplantation, substantia nigra, dopaminergic differentiation, adult neurogenesis

Introduction

PARKINSON'S DISEASE (PD), the second most common neurodegenerative disease, is characterized by the selective loss of A9-subtype ventral midbrain neurons that project to the striatum [1]. The current therapy for PD is the administration of dopamine analogs that, although effective for reducing some motor symptoms, their effects are lost after long-term administration and, in addition, can generate severe side effects [2]. Hence, there is a pressing demand for more effective therapies.

Among the promising alternative therapies is the replacement of damaged neurons by cell transplantation. Studies in PD patients or animal models have indicated that these therapies can result in significant symptomatic improvements

[3–5]. To date, cell transplantation into the striatum is the most common strategy to rescue from dopamine deficiency; however, cell transplantation into the substantia nigra pars compacta (SNpc) followed by a proper rewiring should provide a better condition for the re-establishment of motor functions. In contrast with transplantations to the striatum, the latter strategy requires cells with the potential of getting the full characteristics of mesencephalic dopaminergic (DA) neurons and a host environment for efficient survival and differentiation, the minimal conditions for functional integration.

Pluripotent stem cells (PSCs), self-renewable cells with high differentiation potential, are a promising cell source for the treatment of degenerative disorders, including PD [6]. Although significant improvements in protocols for specific PSC differentiation have been accomplished [7,8], undesirable

¹Department of Molecular Neuropathology, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico.

²Department of Developmental Genetics and Molecular Physiology, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Mexico.

*Current affiliation: Laboratorio Nacional de Recursos Genómicos, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico.

§Current affiliation: Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico.

†Deceased.

fates or incomplete differentiation could influence functional integration, resulting in poor recovery and/or unwanted side effects after grafting. The *in vitro* DA differentiation of PSCs goes through several stages including ectodermal specification, neuralization, and neuronal differentiation [7,9,10]. Cells at each stage bear distinct characteristics some of which could fit those required, not only for efficient DA differentiation, but also for their integration after being transplanted.

Of interest, embryoid body cells (EBCs), embryonic stem cell (ESC) derivatives representing the cell population at the epiblast stage of embryonic development, differentiate efficiently into DA neurons when transplanted to the DA niche of the developing mesencephalon. However, the efficiency of this specific differentiation was markedly reduced when cells are differentiated *in vitro* [11]. These observations indicate that a large proportion of EBCs hold the full potential to acquire the DA neuronal phenotype when they are in a DA differentiation context, but this is lost or affected when *in vitro* neuronal differentiation is allowed.

The SNpc, site where mesencephalic DA neurons reside in the adult brain, has shown the ability to support DA neuronal survival when mesencephalic fetal cells are implanted after a pharmacological DA neuron depletion. Remarkably, differentiated neurons are able to project axons to the striatum [12–14]. Similarly, DA neurons derived from human ESCs also could survive in the rodent-lesioned adult SNpc [14].

We recently reported that EBCs directly transplanted to the intact adult SNpc, although do not give rise to DA neurons, differentiate into neurons with a similar efficiency to that of EBCs implanted in a well-known neurogenic area, the subventricular zone of lateral ventricles or the rostral migratory tract [15]. In contrast, EBCs cannot differentiate into neurons in the intact striatum, but when they are transplanted after an ischemic lesion, they can derive into neurons, suggesting that a lesion creates a condition that favors neurogenesis [15]. Therefore, the intact SNpc allows EBCs neuronal differentiation, possibly triggered by inductive signals present in this region, but an open question is whether the factors required for directing specific differentiation or survival can emerge upon damage.

In this study, we tested the possibility of *in vivo* DA neuronal differentiation in the intact and lesioned SNpc of ESCs at their earliest stage of differentiation (ie, after forming EBC) using wild-type ESCs and ESCs prompted to differentiate into DA neurons by the Nestin-enhancer-controlled expression of a *Lmx1a* transgene (R1B5/NesE-Lmx1a cell line). R1B5/NesE-Lmx1a EBCs acquired neuronal and DA markers at 6 days post-transplantation (dpt) in the adult SNpc, whereas wild-type EBCs derived into neural precursors cells (NPCs) and neuroblasts but did not acquire DA markers. Of interest, either R1B5/NesE-Lmx1a or wild-type EBCs efficiently differentiate into Th⁺ cells within the 6-hydroxydopamine (6-OHDA)-lesioned SNpc. Therefore, brain damage not only generates conditions that allow neurogenesis of transplanted EBCs but also favor those that promote acquisition of DA characteristics.

Materials and Methods

Generation of the R1B5/NesE-Lmx1a cell line

R1B5 cells (a gift from Andras Nagy) were propagated on mitomycin c-treated mouse embryonic fibroblast cells (feeder

cells) in ESC media (also called M15) composed of Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Gibco, Grand Island, NY) supplemented with 15% heat-inactivated fetal bovine serum, GPS (1×Glutamax; Gibco; 0.3 mg/mL of penicillin and 0.5 mg/mL of streptomycin; Sigma, St. Louis, MO), 1×MEM nonessential amino acids (from a 100×stock; Gibco), 1 mM sodium pyruvate (Gibco), 0.55 mM 2-mercaptoethanol (Sigma), and 1,000 U/mL of leukemia inhibitor factor (LIF; Chemicon, Temecula, CA). Before differentiation, cells were cultured in the 2i media containing the selective Gsk3 β and Mek1/2 inhibitors, CHIR99021 (3 μ M) and PDO325901 (1 μ M), respectively (Stemgent, Beltsville, MD). To generate R1B5/NesE-Lmx1a ESC line, R1B5 cells were electroporated with the pNesE-Lmx1a vector (gift from Elisabet Andersson), and 24 h after reseeding them, cultured in the presence of 400 μ g/mL G418 (Sigma) for clone selection. Individual clones were picked and expanded for 14 days, as described for R1B5 cells.

In vitro differentiation of ESCs

Unbiased neural differentiation was carried out using the one-step short-term protocol based on cells grown as a monolayer [9]. Cells were plated on gelatin-coated dishes and incubated in M15 medium for 12–15 h. Thereafter, cells were washed once with phosphate-buffered saline (PBS) and grown in N2B27 medium, composed of 50% DMEM/nutrient mixture F12 (F12), 50% neurobasal medium, and supplemented with 1×N2 and 1×B27 (from a 100× and 50×stocks, respectively; Gibco). RNA from putative NPCs derived from each clone was extracted to determine the *Lmx1a* transgene expression levels. For specific DA differentiation, we used the progressive 5-stage protocol [7]. In brief, ESCs were expanded on a feeder cell monolayer in M15 medium for 3 days. Then, trypsin-dissociated cells were seeded on gelatinized dishes in feeder-free conditions and cultured in M15 medium supplemented with LIF for 3 days (Stage 1: feeder-free ESC growth). After clearing ESCs from feeder cells, the cells were seeded on non-adherent bacterial culture dishes and cultured for 4 days in M15 media, without LIF or 2i, to form embryoid bodies (EBs; Stage 2). For the selection of NPCs (Stage 3), EBs were seeded on adherent conditions using gelatin-coated culture dishes in M15 medium for 24 h, then, 7 days in the selection medium composed of DMEM/F12 without HEPES (Gibco) plus 1×insulin/transferrin/selenium/sodium pyruvate supplement (100×ITS-A stock; Gibco), 1 mg/mL fibronectin (Gibco) and GPS. For expansion of NPCs (Stage 4), trypsin-dissociated NPCs were seeded on 24-well culture dishes, previously treated with poly-D-lysine (10 μ g/mL; Sigma) and fibronectin (1 μ g/mL; Gibco), in the expansion medium composed of DMEM/F12 without HEPES supplemented with 10 ng/mL Fgf2, 100 ng/mL Fgf8; and 500 ng/mL Sonic Hedgehog (all growth factors from Peprotech, Rocky Hill, NJ) for 7 days. To promote terminal differentiation (Stage 5), cells were cultured in differentiation medium composed of the expansion medium without growth factors for 6 days. Immunolabeling and real time polymerase chain reaction (PCR) were performed at fourth and fifth stage to detect expression of specific genes of neural or neuronal cells and the transgene expression.

Animal and cell transplantation procedures

Animals were housed under a 12-h light/dark cycle with ad libitum access to food and water. All procedures were approved by the bioethical committees of the Instituto de Biotecnología and of the Instituto de Fisiología Celular (MGC08). Embryos used were from CD1 mice at 10.5 days postcoitum (E10.5; 0.5 was the day of mating plug detection); pregnant mice were killed by cervical dislocation. E10.5 midbrain explant cultures and the transplant-into-explant procedure were performed as previously described [11]. The brains of adult male Wistar rats (250 g) were used as the host for EBCs. For transplantation, animals were anesthetized with a mix of xylazine (8 mg/kg; PiSA, Guadalajara, México) and ketamine (10 mg/kg; PiSA) and those with transplanted cells were killed by an overdose of pentobarbital (PiSA) at 6 or 15 dpt. Cell transplantations to adult rat brains were performed by stereotaxic surgery; coordinates for SNpc were obtained from Paxinos and Watson (-4.7, -1.6, and -8.1 mm; posterior, lateral, and ventral to bregma, respectively) [16]. One to two microliters of EB-derived cell suspension (~150,000 cells) was injected using a 5 μ L Hamilton syringe. Animals were lesioned with 6-OHDA as previously described [17]. In brief, animals were anesthetized under ketamine-xylazine (as described previously) and 40 μ g 6-OHDA (Sigma) in 0.5 μ L of saline solution were injected at a rate of 0.1 μ L per minute into the left SNpc (coordinates were the same as for cell transplantations). Cell suspensions were obtained from three independent cultures and each transplanted to brains of groups of three rats.

Tissue processing and immunolabeling

Midbrain explants, after 4 or 7 days in culture, were fixed with 4% paraformaldehyde (PFA; Sigma) for 2 h at 4°C. After dehydration with 30% sucrose (J.T.Baker/Avantor Performance Materials S.A. de C.V., Xalostoc, México) for 24 h at 4°C, 10 μ m coronal sections were obtained from tissues using a cryostat (Microm HM550; Thermo Scientific, Waltham, MA). For cultured cells, they were fixed with cooled 4% PFA for 20 min and then stored in antifreeze solution. To analyze cells implanted in the adult rat brain, an intracardiac perfusion was performed on the killed animals, first with saline solution (PBS), followed by 4% cooled PFA. Before slicing in frozen conditions, tissues were sequentially dehydrated in 10%, 20%, and 30% sucrose (24 h each). Forty-micrometer slices were obtained from brains and collected in antifreeze solution. After fixation, tissue or cells were subjected to immunolabeling using the protocols described in Maya-Espinosa et al. [15] and Baizabal and Covarrubias [11]. The antibodies used are given in Supplementary Table S1. Processed tissues were analyzed with an epifluorescence or confocal microscope as detailed hereunder.

RNA extraction and quantitative PCR

Total RNA extraction with TRIzol (Invitrogen, Waltham, MA) and complementary DNA (cDNA) synthesis with AMV Reverse Transcriptase (RT; Invitrogen) were carried out following the manufacturer's instructions. Messenger RNA (mRNA) levels were determined by real-time quanti-

tative PCR (qPCR) performed on cDNA produced from total RNA of each sample. The qPCR was carried out using standard protocols with KAPA SYBR[®] FAST kit (KAPA Biosystems, Wilmington, MA) and Rotor Gene Q thermocycler (Qiagen, Hilden, Germany). To determine relative gene expression levels, a comparative Ct (Δ Ct) method was used and the amount of a specific mRNA was normalized based on the estimated amount of Rplp0 or Cyclophilin (Cyc) mRNAs. Primer sequences (forward and reverse) are given in Supplementary Table S2.

Image acquisition and cell counting

For cell quantification in culture, images were captured in a Zeiss AxioVision microscope using AxioVision LE software or direct counting from the microscope eyepieces. We counted at 40 \times or 60 \times magnifications in two different fields for each culture. For transplanted cells, images were captured in an Olympus FV1000 multiphoton laser scanning microscope. At least two fields of two slices were analyzed for each transplanted brain (three for each of the three EBC suspensions prepared). Quantifications of double-stained cells were carried out on continuous Z-optical slices. When required, data were statistically analyzed by the Student's *t*-test.

Results

Generation of traceable neural derivatives from ESCs with increased DA differentiation potential

EBCs derived from the R1B5 ESC line, constitutively expressing an *EGFP* transgene, show neural differentiation capacity when transplanted to an adult neurogenic niche, a lesioned striatum or the SNpc; however, in contrast with the specific differentiation observed within the embryonic DA niche [11], their fate was rarely Th⁺ neurons [15]. On the contrary, it has been shown that the forced *Lmx1a* expression driven by the chimeric Nestin-enhancer TK-basal promoter (*NesE*) increases the midbrain DA differentiation capacity of ESCs, as revealed when they are subjected to different DA differentiation protocols [18–20].

To test the capacity of ESCs to carry out DA differentiation in an *in vivo* context, the *NesE-Lmx1a* transgene was introduced to R1B5 ESCs. Transfected clones were initially selected by the ability to activate the *NesE-Lmx1a* transgene in NPCs (ie, expressing *Nestin*) derived from an unbiased short-term monolayer neural differentiation protocol [9] (Supplementary Fig. S1). From the three ESC clones showing a relatively high *NesE-Lmx1a* transgene expression after 4 days in the neural differentiation medium, two were selected for further analysis (R1B5/*NesE-Lmx1a*/C3 and R1B5/*NesE-Lmx1a*/C5) (Supplementary Fig. S1C). Between these two clones, R1B5/*NesE-Lmx1a*/C3 (referred herein as the R1B5/*NesE-Lmx1a*) not only had higher *Lmx1a* expression levels but also showed more consistent DA differentiation in culture (see hereunder) and was used for all transplantation experiments.

Overexpression of *Lmx1a* leads to DA differentiation in a non-DA embryonic domain

The capacity of *Lmx1a* to increase DA differentiation *in vitro* was previously determined and found that *Shh* and

Fgf8 are still required to lead specific differentiation. To corroborate the increased DA differentiation potential of the selected clones, the five-stage protocol was performed with the R1B5/NesE-Lmx1a line and the DA neuronal differentiation efficiency compared with that obtained with the parental R1B5 line (Fig. 1A). For this, we took advantage of the constitutive presence of GFP to make more evident the changes in cell distribution during the differentiation of live cultures. We did not observe any difference between the two lines in the progress of culture across the differentiation process (Fig. 1B), suggesting that the exogenous Lmx1a or any event during clone selection did not generally affect neural differentiation.

In contrast, a specific effect of exogenous *NesE-Lmx1a* transgene was expected because NPCs derived and expanded from R1B5/NesE-Lmx1a cells showed not only more clusters with Lmx1a but also a greater percentage of Lmx1a⁺/Nes⁺ cells in comparison with that determined for NPCs from R1B5 cells (94.5% vs. 7.8%, $n=3$) (Fig. 1C, D). Accordingly, higher levels of total *Lmx1a* mRNA were detected in samples from R1B5/NesE-Lmx1a cells in comparison with samples at the same stage from R1B5 cells (Fig. 1D).

The DA promoting effect of the exogenous Lmx1a on NPCs was evaluated at the differentiation stage by estimating the number of clusters with Th⁺ cells and the proportion of Th⁺ cells within each cluster. We found a markedly higher number of cell clusters with Th⁺ cells in cultures derived from R1B5/NesE-Lmx1a cells compared with cultures derived from R1B5 cells (94.4%, $n=3$ vs. 38%, $n=2$) (Fig. 1E, F), which correlated very well with the increased number of clusters with Lmx1a at the fourth stage. In addition, the proportion of Th⁺ cells in each cluster was also greater for cultures derived from R1B5/NesE-Lmx1a cells than those derived from R1B5 cells (61%, $n=3$ vs. 4%, $n=2$) (Fig. 1F). In agreement with these determinations, differentiated R1B5/NesE-Lmx1a cells showed higher levels of *Th* expression than differentiated R1B5 cells (Fig. 1F). Therefore, Lmx1a in R1B5/NesE-Lmx1a cells can promote DA differentiation at early (estimated by the number of developed Th⁺ clusters) and late (estimated by the number of Th⁺ neurons within each cluster) stages of differentiation.

The DA promoting function of the *NesE-Lmx1a* transgene was also tested in an *in vivo* embryonic context. DA neurogenesis in the midbrain occurs from the gestational stage E9.0 to the stage E14.0 [21]. We previously determined that EBCs could be specifically instructed to differentiate into mesencephalic DA neurons by the milieu of the ventral midbrain of E10.5 embryos, passing through a gradual differentiation from NPCs Nes⁺ and Lmx1a⁺ up to becoming neuronal postmitotic Th⁺ cells [11]. When donor cells implanted into sites far from the ventral midline, they differentiated in accordance with the implantation site.

EBCs derived from the R1B5 or R1B5/NesE-Lmx1a lines were transplanted to the ventricular surface of E10.5 midbrains and cells analyzed at 4 and 7 days postimplantation (dpi) (Fig. 2). At 4 dpi, as with R1B5 EBCs, implanted cells within the ventral region (the DA domain) acquired Nes and Lmx1a markers in most implantation cases (five of six cases) but no Th⁺ cells were detected (zero of six cases) (Fig. 2B, C). In contrast, at this same stage of explant culture, implanted R1B5 EBCs within the dorsal region (non-

DA domain) did not develop into Lmx1a⁺ cells, whereas implanted R1B5/NesE-Lmx1a EBCs within this same region derive into Lmx1a⁺ cells in some implantation cases (two of four cases) (Fig. 2B, C).

At day 7, R1B5/NesE-Lmx1a EBCs implanted in either the ventral or dorsal region gave rise to cells coexpressing *Lmx1a* and *Th* (6 of 11 cases in the ventral region and 3 of 8 cases in the dorsal region) (Fig. 2B, C), whereas coexpression of these markers was only detected for cells derived from R1B5 EBCs when implanted in the DA domain (3 of 4 cases) (Fig. 2B, C), as previously reported. Because the endogenous *Lmx1a* was only activated when EBCs implanted around the midline, these observations agree with the promotion of DA differentiation by the activation of the *NesE-Lmx1a* transgene upon reaching the NPC differentiation stage. The fact that many NPCs ectopically expressing *Lmx1a* in dorsal regions did not become Th⁺ neurons, indicates that additional factors present in the ventral region are required to complete DA differentiation (Fig. 2), as recently reported [22].

Lmx1a overexpression is required for EBCs DA differentiation in the intact SNpc

Although it remains controversial whether the SNpc carries out active neurogenesis for a continuous turnover of DA neurons, we recently propose that, at least, the SNpc holds a silent neurogenic niche that can be detected by EBCs such that they derive into a large number of neurons in this region [15]. Accordingly, R1B5/NesE-Lmx1a EBCs survived in the SNpc and differentiated into a similar proportion of neural cells as transplanted R1B5 EBCs (no significant difference determined). Specifically, transplanted R1B5/NesE-Lmx1a EBCs derived into Nes⁺ or Dcx⁺ (markers for neural stem cells or neuroblasts, respectively) cells at 6 dpt (Fig. 3). Therefore, exogenous *Lmx1a* does not alter the neurogenic capacity of EBCs in the adult brain.

Strikingly, at 6 dpt many cells expressing *Th* were derived from transplanted R1B5/NesE-Lmx1a EBCs (GFP⁺), whereas none was found when R1B5 EBCs were transplanted (Fig. 3) as previously reported [15]. In agreement with the expected effect of Lmx1a in promoting mesencephalic DA neuronal differentiation, several nuclei (at least 16% of total GFP⁺ cells) were detected with Pitx3, a transcription factor emerging specifically in the midbrain at an early stage of DA differentiation (Fig. 3E). However, at 15 dpt, the number of GFP⁺/Th⁺ detected was markedly reduced although the number of Dcx⁺ cells was as for R1B5 EBCs ($n=2$) (Fig. 3D) [15]. These observations suggest that Lmx1a can lead EBCs to gain higher DA potential *in vivo* without the need of exogenous Shh and/or Fgf8, but additional factors seem to be required to complete differentiation and/or increase long-term survival of these putative DA neurons (see Discussion section).

The lesioned SNpc favors DA differentiation of EBCs

In the past, it has been demonstrated that the damaged brain can support neurogenic processes of both endogenous and/or exogenous NPCs or from undifferentiated PSCs [23–25]. To evaluate whether the SNpc can turn into a

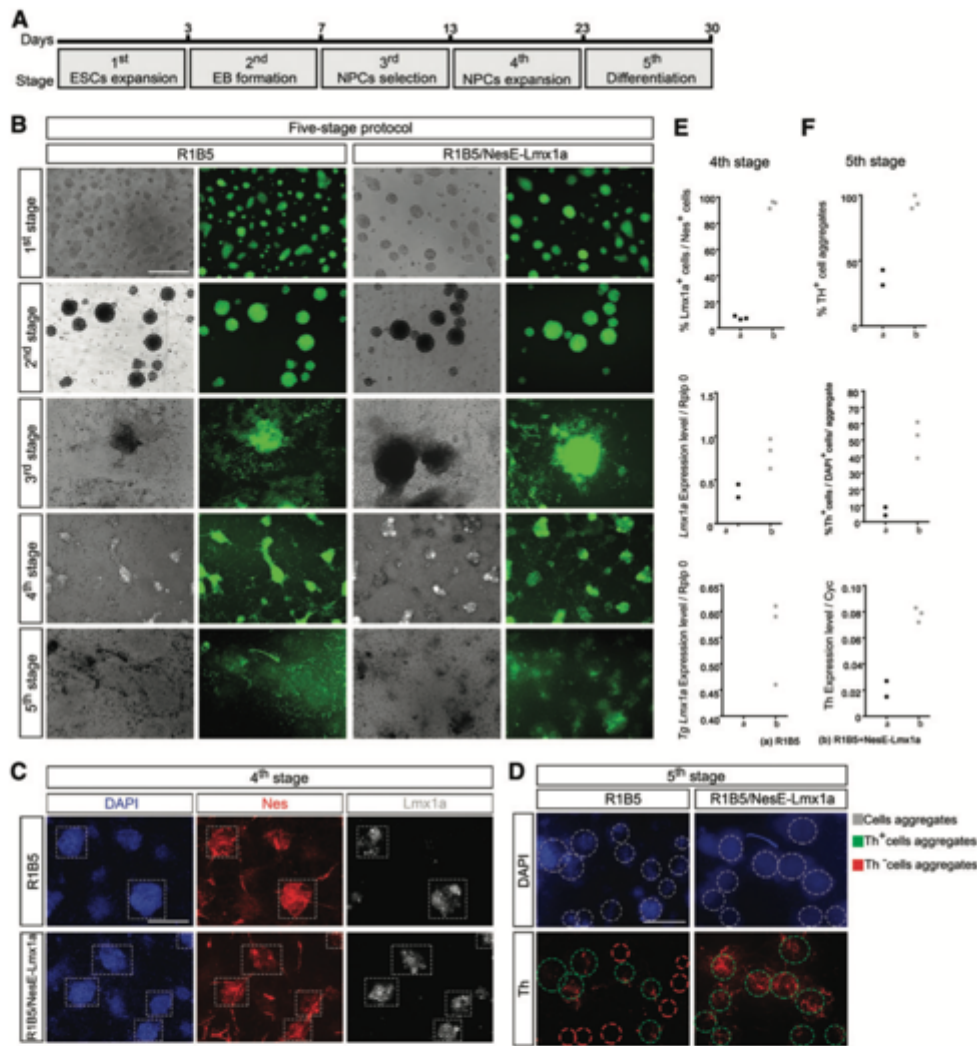


FIG. 1. In vitro DA differentiation of ESCs containing the *NesE-Lmx1a* transgene. **(A)** Scheme of DA neuronal differentiation through the five-stage protocol. R1B5 and R1B5/NesE-Lmx1a ESC were differentiated under the same conditions. **(B)** Bright field and fluorescence (GFP) imaging across each differentiation stage. Low magnification images did not reveal major differences in culture development at any differentiation stage when both cell lines were compared. **(C)** Detection of putative DA NPCs (*Nes*⁺/*Lmx1a*⁺). *Lmx1a* and *Nes* were detected by specific immunolabeling at the fourth differentiation stage; *dashed squares* indicate *Nes*⁺/*Lmx1a*⁺ cell clusters. **(D)** Detection of putative DA neurons (Th⁺). Cells immunopositive for Th were found within clusters at the fifth differentiation stage; *dashed circles* delimit distinct cell clusters containing (green) or not containing (red) Th⁺ cells. **(E)** Quantification of the number of putative DA NPCs. Because of the presence of the *Lmx1a* transgene, abundant *Nes*⁺/*Lmx1a*⁺ cells were detected at the fourth differentiation stage of R1B5/NesE-Lmx1a differentiation (b, *gray dots*), in contrast with the few found in differentiated R1B5 cells at this same stage (a, *black dots*); determination of *Lmx1a* expression levels by RT-qPCR confirmed this observation. **(F)** Quantification of the number of putative DA neurons. At the fifth differentiation stage, more clusters containing Th⁺ cells and more Th⁺ cells in each cluster derived from cells of the R1B5/NesE-Lmx1a cell line (b, *gray dots*) than from those of the R1B5 cell line (a, *black dots*); higher *Th* expression levels determined by RT-qPCR confirmed the increased DA differentiation efficiency of R1B5/NesE-Lmx1a cells. Scale bars: 500 μm. DA, dopaminergic; ESCs, embryonic stem cells; NPCs, neural precursors cells; RT-qPCR, reverse transcriptase quantitative PCR. Color images are available online.

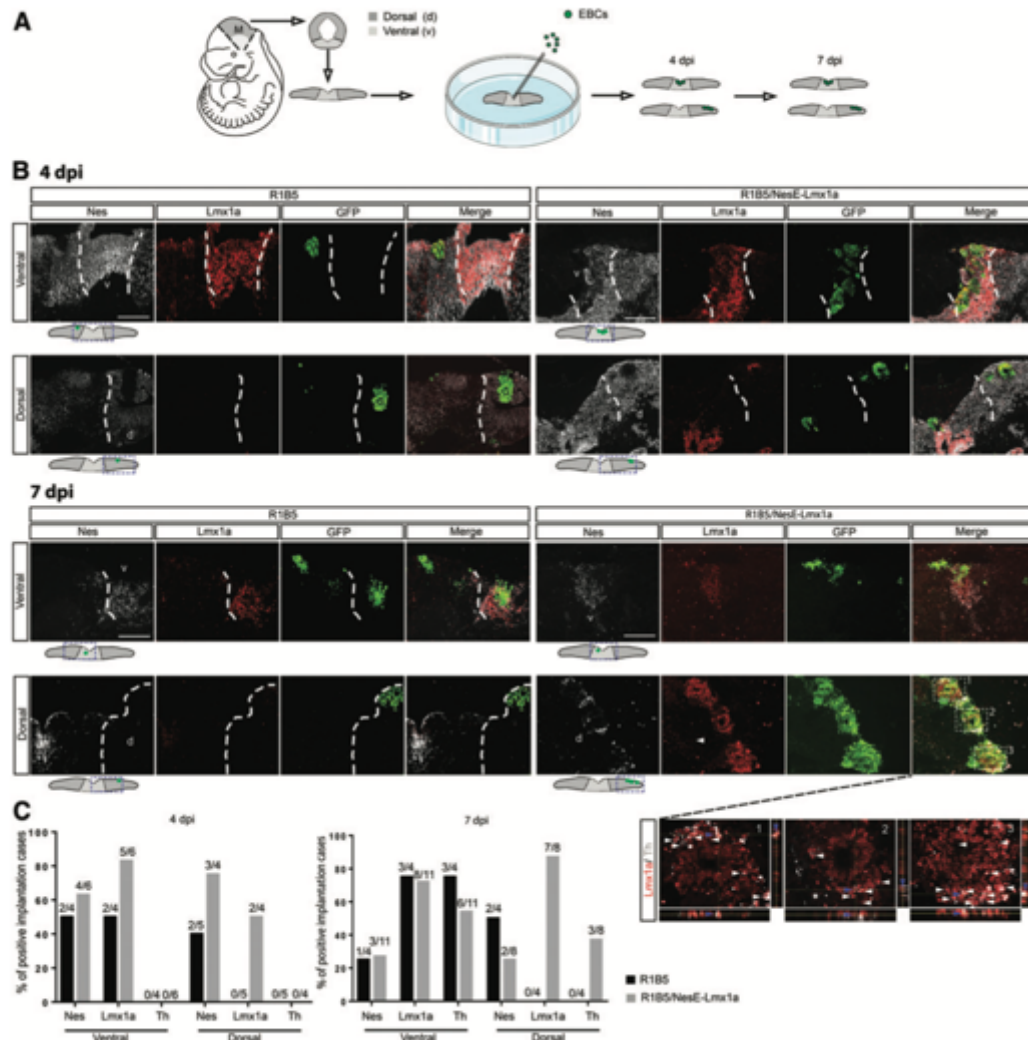


FIG. 2. Evaluation of *Lmx1a* transgene function in the developing midbrain context. **(A)** Schematic representation of the midbrain explant culture and implantation of EBCs into the ventral or dorsal area (DA or non-DA niche, respectively). **(B)** Detection of EBC-derived DA NPCs or neurons in midbrain explants. Nes, *Lmx1a* and Th were detected by immunolabeling at 4 or 7 days after implanting (dpi) R1B5 or R1B5/NesE-*Lmx1a* EBCs (GFP⁺) into the ventral (4 and 7 dpi, upper panels) or dorsal (4 and 7 dpi, lower panels) midbrain regions. Magnification of zones are delimited by dashed squares; white arrowheads indicate implanted cells (GFP⁺) coexpressing *Lmx1a* and Th, whereas some of these selected for orthogonal analysis are indicated with blue arrowheads. **(C)** DA differentiation efficiency of EBCs in the ventral or dorsal midbrain. Number of implantation cases in which implanted cells were positive for Nes, *Lmx1a* or Th markers at 4 or 7 dpi in ventral or dorsal areas were determined. Note that, whereas EBCs derived from both cell lines behaved similarly once integrated into the ventral region or near to it, only those derived from the R1B5/NesE-*Lmx1a* cell line gave rise to Nes⁺ and/or *Lmx1a*⁺ (at 4 dpi) and *Lmx1a*⁺ and/or Th⁺ (at 7 dpi) cells when implanted in the dorsal region. Scale bars: 200 μ m. dpi, days postimplantation; EBC, embryoid body cell. Color images are available online.

stronger neurogenic niche after lesioned with 6-OHDA, the fate of EBCs from R1B5 and R1B5/NesE-*Lmx1a* lines was determined when transplanted to the lesioned SNpc (Fig. 4). At 6 dpt, a proportion of EBCs implanted at the lesioned area had a neuronal morphology and, unexpect-

edly, many of those cells were Th⁺ (>20%) (Fig. 4 and Supplementary Fig. S2) disregarding whether they derived or not from cells containing the *NesE-Lmx1a* transgene (Fig. 4B–D). A significant proportion of these Th⁺ cells coexpressed *Dcx* (>90%) (Fig. 5).

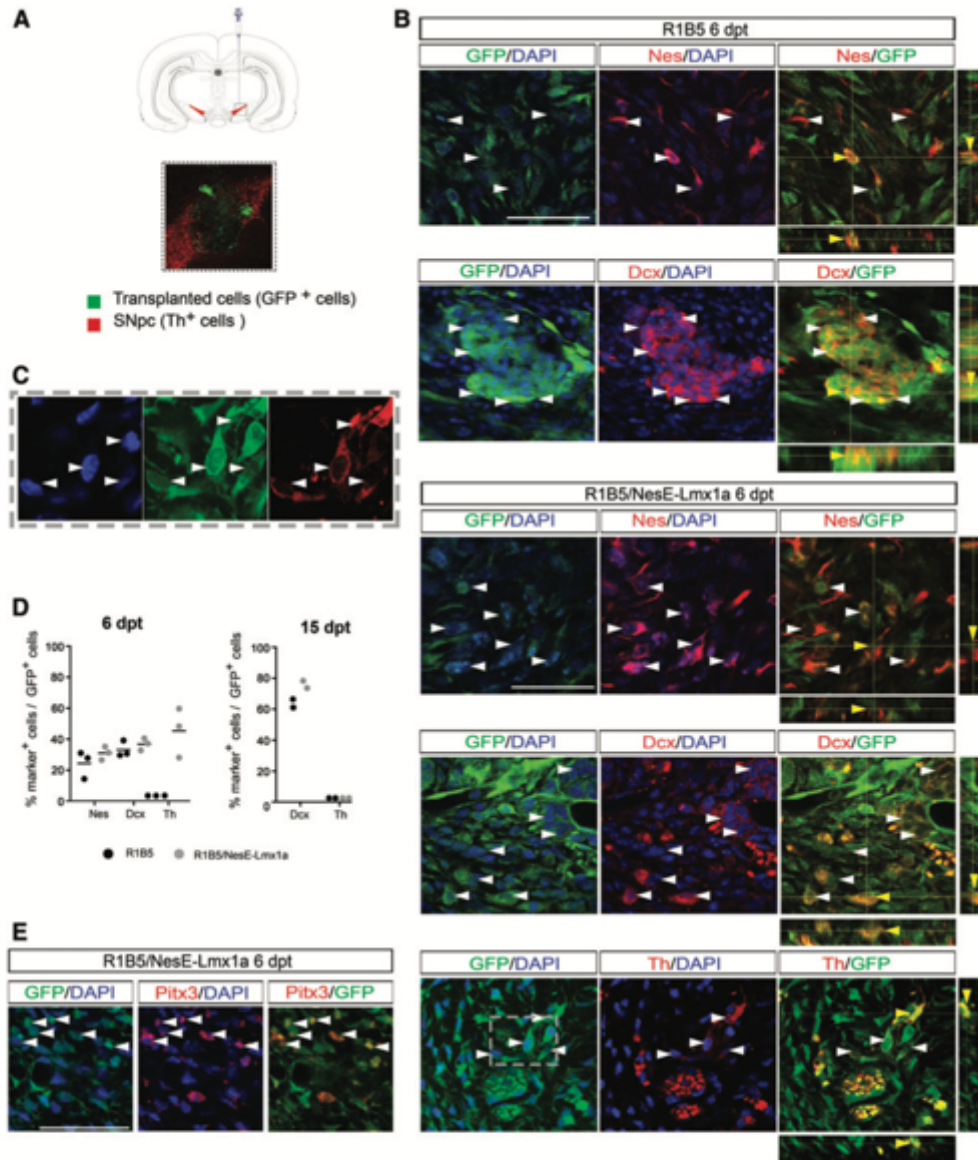


FIG. 3. Effect of *Lmx1a* overexpression on DA differentiation of EBCs in the intact rat SNpc. **(A)** Schematic representation of EBC transplantation to the adult SNpc. A representative image revealing the typical implantation site of EBCs (GFP⁺) within the SNpc (Th⁺, red) is shown. **(B)** DA fate of EBCs in the SNpc at 6 dpt. NPCs (Nes), neuroblast (Dcx), and DA (Th) markers were determined by immunostaining at 6 dpt in cells derived from transplanted R1B5 and R1B5/NesE-Lmx1a EBCs; white arrowheads indicate transplanted cells (GFP⁺) expressing Nes, Dcx or Th, whereas yellow arrowheads indicate those cells selected for orthogonal views. **(C)** A higher magnification of the dashed square in lower panels of **(B)**. **(D)** Quantification of EBC neural and DA differentiation in the SNpc at 6 and 15 dpt. GFP⁺ cells presenting the given marker were manually counted; each point in graph represents the average differentiation efficiency of EBCs derived from an independent culture and transplanted to the brain of three rats. Note that, whereas transplanted EBCs from both lines differentiated into similar number of NPCs and neuroblasts at 6 dpt, only R1B5/pNes-Lmx1a EBCs differentiated into Th⁺ cells. **(E)** Detection of the midbrain-specific DA differentiation marker Pitx3. Pitx3 was immunodetected in transplanted cells at 6 dpt; arrowheads indicate positive nuclei for this marker. Scale bars: 50 μ m. dpt, Days posttransplantation; SNpc, substantia nigra pars compacta. Color images are available online.

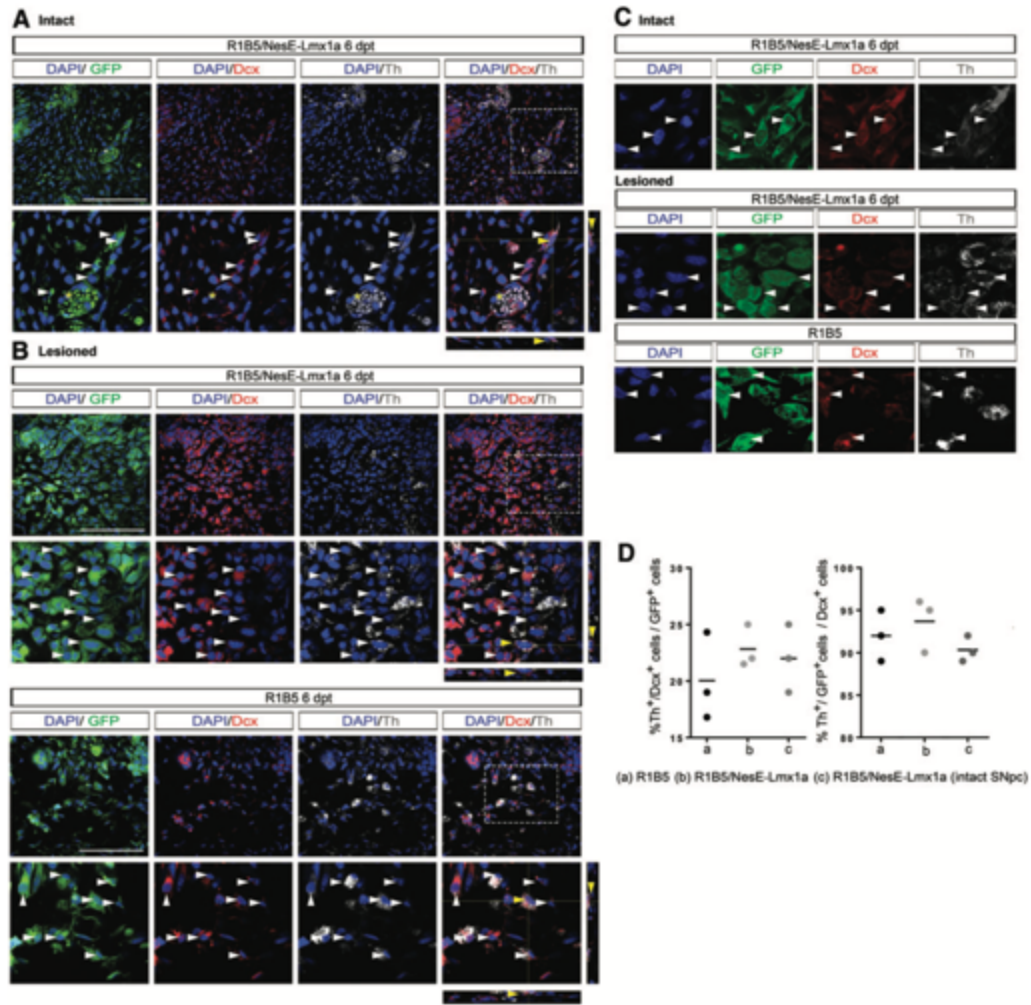


FIG. 5. Differentiation of transplanted EBCs into DA neuroblasts. The Dcx neuroblast marker was immunodetected in Th⁺ cells derived from transplanted R1B5 or R1B5/NesE-Lmx1a EBCs in the intact (A) or lesioned (B) SNpc. Dashed squares in upper panels delimit the magnified area shown in lower panels. White arrowheads indicate transplanted cells coexpressing Th and Dcx, whereas yellow arrowheads indicate those cells analyzed in orthogonal views. The asterisk indicates a group of Th⁺/Dcx⁻ cells that might represent chromafin-like cells. Scale bars: 100 μ m. (C) Higher magnifications of transplanted Th⁺/Dcx⁺ cells (indicated by white arrowheads). (D) Quantification of EBC-derived DA neuroblasts in the intact and lesioned SNpc. GFP⁺ cells positive for Th were manually counted; each point in graph represents the average differentiation efficiency of EBCs derived from an independent culture and transplanted to the brain of three rats. Note that most Th⁺ cells derived from both lines were neuroblasts as indicated by the presence of Dcx. Color images are available online.

releasing dopamine without requiring the extension of long axons. In contrast, an approach based on transplantation to the SNpc requires cells for transplantation that not only produce dopamine but also are able to direct axons to the specific target neurons in the striatum.

We previously demonstrated that the intact adult SNpc can support efficient neuronal differentiation of non-neuralized

EBCs, but DA neurons are not within the EBC-derived neurons [15]. Here we looked to find whether the inability of EBCs to derive DA neurons in the SNpc is limited by the capacity of transplanted cells or by the SNpc host environment that prevents specific differentiation or neuronal survival. For this purpose, we developed a traceable ESC line prompted to differentiate into DA neurons and

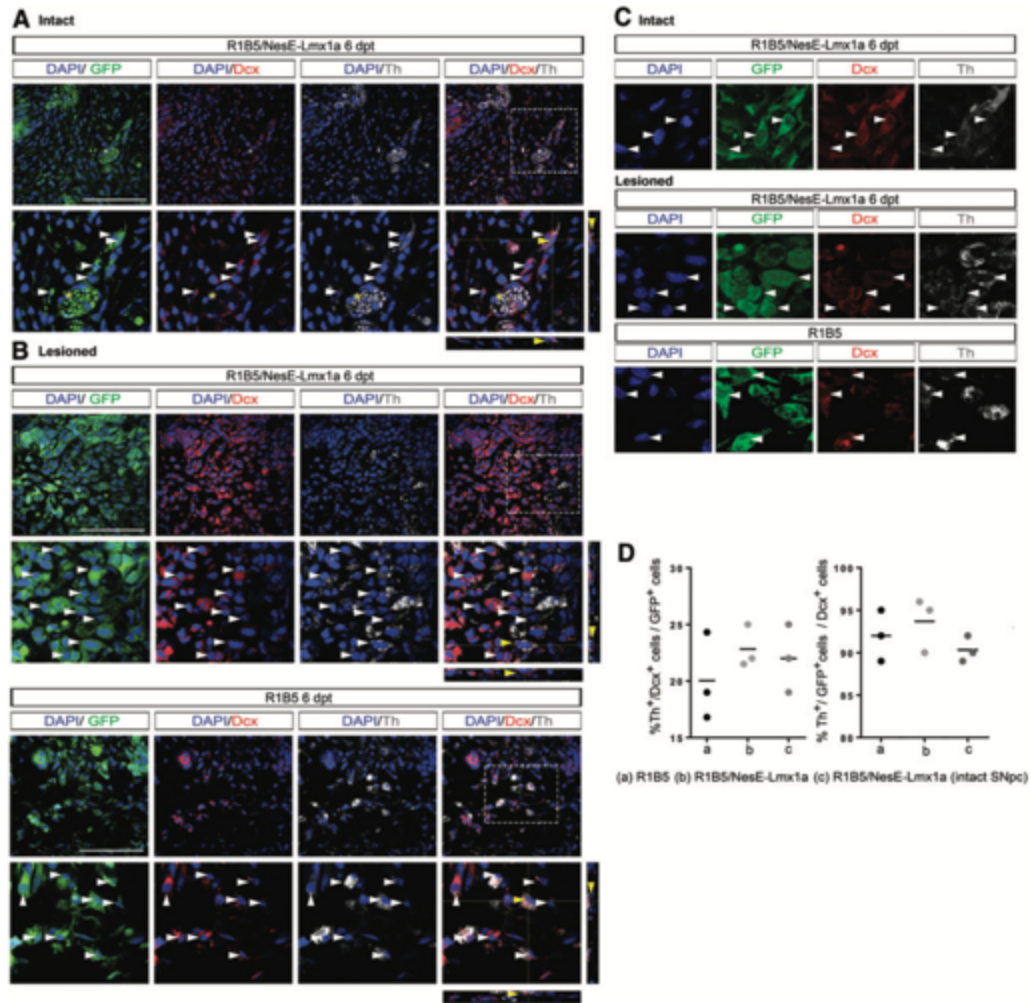


FIG. 5. Differentiation of transplanted EBCs into DA neuroblasts. The Dcx neuroblast marker was immunodetected in Th⁺ cells derived from transplanted R1B5 or R1B5/NesE-Lmx1a EBCs in the intact (A) or lesioned (B) SNpc. Dashed squares in upper panels delimit the magnified area shown in lower panels. White arrowheads indicate transplanted cells coexpressing Th and Dcx, whereas yellow arrowheads indicate those cells analyzed in orthogonal views. The asterisk indicates a group of Th⁺/Dcx⁻ cells that might represent chromaffin-like cells. Scale bars: 100 μ m. (C) Higher magnifications of transplanted Th⁺/Dcx⁺ cells (indicated by white arrowheads). (D) Quantification of EBC-derived DA neuroblasts in the intact and lesioned SNpc. GFP⁺ cells positive for Th were manually counted; each point in graph represents the average differentiation efficiency of EBCs derived from an independent culture and transplanted to the brain of three rats. Note that most Th⁺ cells derived from both lines were neuroblasts as indicated by the presence of Dcx. Color images are available online.

releasing dopamine without requiring the extension of long axons. In contrast, an approach based on transplantation to the SNpc requires cells for transplantation that not only produce dopamine but also are able to direct axons to the specific target neurons in the striatum.

We previously demonstrated that the intact adult SNpc can support efficient neuronal differentiation of non-neuralized

EBCs, but DA neurons are not within the EBC-derived neurons [15]. Here we looked to find whether the inability of EBCs to derive DA neurons in the SNpc is limited by the capacity of transplanted cells or by the SNpc host environment that prevents specific differentiation or neuronal survival. For this purpose, we developed a traceable ESC line prompted to differentiate into DA neurons and

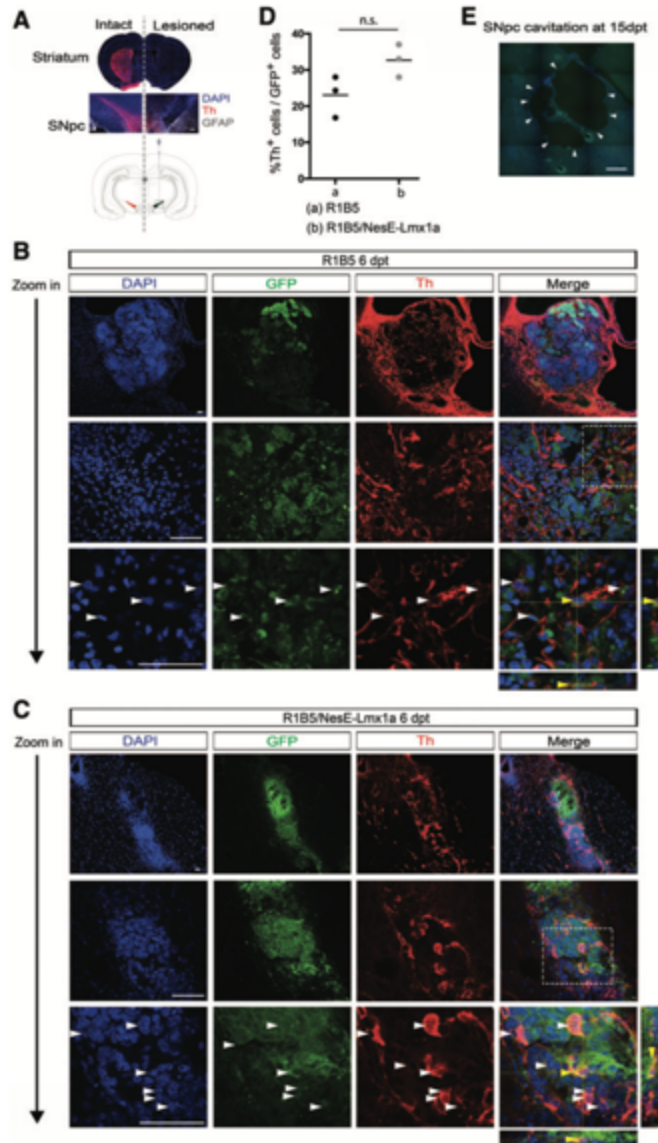


FIG. 4. Effect of lesioned SNpc on EBC DA differentiation. **(A)** Schematic representation of EBC transplantation to the lesioned adult SNpc. Representative images revealing the lack of Th (red) in coronal sections containing the SNpc-innervating striatum (upper image) or the SNpc (lower image) 2 weeks after unilaterally inducing DA neuron depletion are shown; EBCs were transplanted at this stage. Scale bar: 200 μ m. **(B, C)** Detection of putative DA EBC-derived cells in the lesioned SNpc. Th was immunodetected at 6 dpt in cells from R1B5 **(B)** and from R1B5/NesE-Lmx1a **(C)** after EBCs were transplanted to lesioned animals. Dashed squares delimit the magnified area shown in the lower panels; white arrowheads indicate Th⁺ cells derived from transplanted EBCs, whereas yellow arrowheads indicate those cells analyzed in orthogonal views. Scale bars: 50 μ m. **(D)** Quantification of EBC DA differentiation in the lesioned SNpc. GFP⁺ cells presenting Th were manually counted; each point in graph represents the average differentiation efficiency of EBCs derived from an independent culture and transplanted to the brain of three rats; n.s., no significant difference found. Note that, in contrast with the results in the intact SNpc, R1B5 and R1B5/NesE-Lmx1a EBCs differentiated into Th⁺ cells in the lesioned region. **(E)** X-Y reconstruction of the lesioned SNpc at 15 dpt. Image is composed of 3 (x axis) \times 4 (y axis) images. Arrowheads indicate the cavitated zone. Scale bar: 200 μ m. It was apparent that cavitation continued growing after transplantation and no EBCs was found at 15 dpt. Color images are available online.

In contrast with the outcome of transplanted EBCs in the intact SNpc (at least 30 days survival) [15], the lesioned condition did not allow long-term survival of the *in vivo*-derived EBCs progeny, possibly because of the cavitation of the host tissue resulting from the 6-OHDA-induced neurodegeneration (Fig. 4E). These results suggest that the lesioned SNpc retains a neurogenic environment but, in addition, gains inductive properties that direct differentiation toward a DA phenotype.

Discussion

The common cell transplantation approach to test the dopamine releasing capacity of grafted cells in a PD animal model is to place them within the target striatal region [26]. For successful therapeutic effectiveness, this strategy does not need cells for transplantation with the capacity for nigrostriatal circuit integration; in this case, rather, grafted cells stimulate the host striatum and rescue from dopamine deficiency by

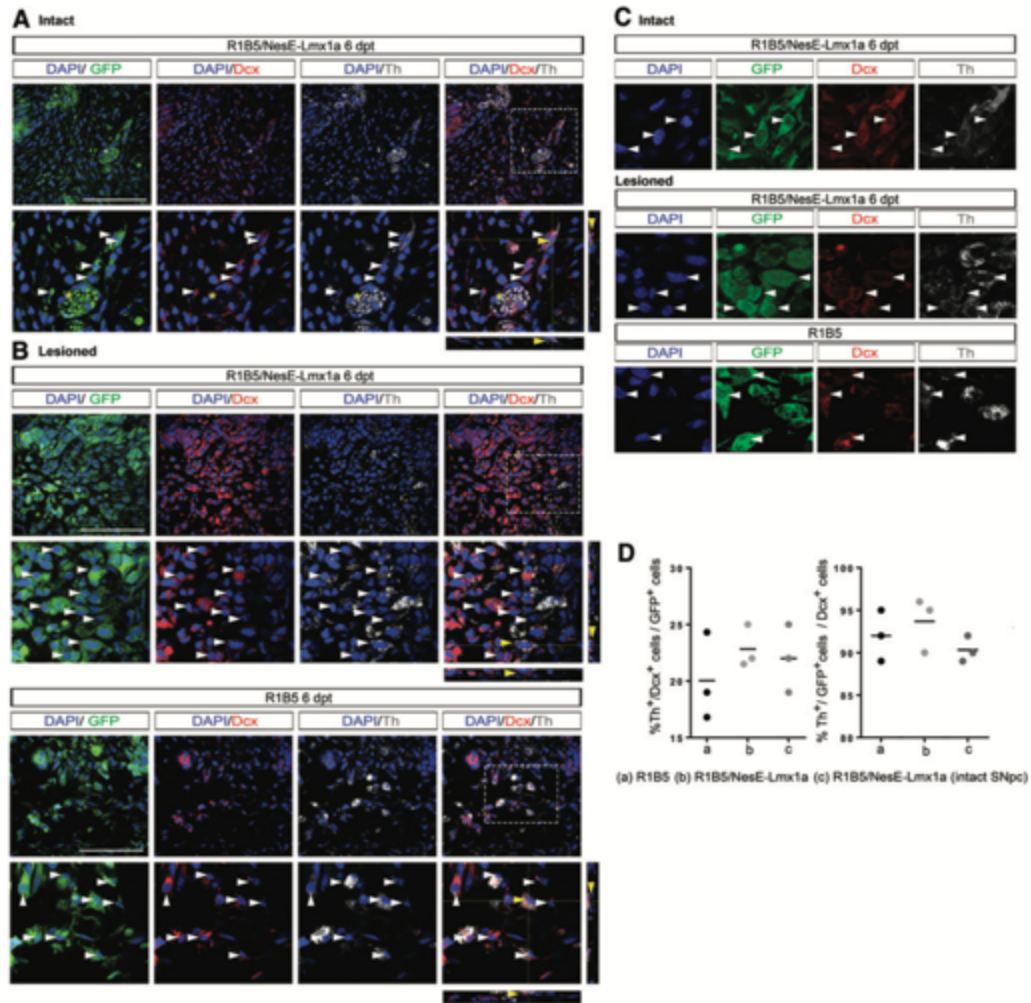


FIG. 5. Differentiation of transplanted EBCs into DA neuroblasts. The Dcx neuroblast marker was immunodetected in Th⁺ cells derived from transplanted R1B5 or R1B5/NesE-Lmx1a EBCs in the intact (A) or lesioned (B) SNpc. Dashed squares in upper panels delimit the magnified area shown in lower panels. White arrowheads indicate transplanted cells coexpressing Th and Dcx, whereas yellow arrowheads indicate those cells analyzed in orthogonal views. The asterisk indicates a group of Th⁺/Dcx⁻ cells that might represent chromaffin-like cells. Scale bars: 100 μ m. (C) Higher magnifications of transplanted Th⁺/Dcx⁺ cells (indicated by white arrowheads). (D) Quantification of EBC-derived DA neuroblasts in the intact and lesioned SNpc. GFP⁺ cells positive for Th were manually counted; each point in graph represents the average differentiation efficiency of EBCs derived from an independent culture and transplanted to the brain of three rats. Note that most Th⁺ cells derived from both lines were neuroblasts as indicated by the presence of Dcx. Color images are available online.

releasing dopamine without requiring the extension of long axons. In contrast, an approach based on transplantation to the SNpc requires cells for transplantation that not only produce dopamine but also are able to direct axons to the specific target neurons in the striatum.

We previously demonstrated that the intact adult SNpc can support efficient neuronal differentiation of non-neuralized

EBCs, but DA neurons are not within the EBC-derived neurons [15]. Here we looked to find whether the inability of EBCs to derive DA neurons in the SNpc is limited by the capacity of transplanted cells or by the SNpc host environment that prevents specific differentiation or neuronal survival. For this purpose, we developed a traceable ESC line prompted to differentiate into DA neurons and

evaluate its capacity to derive DA neurons in the intact and 6-OHDA-lesioned SNpc.

We confirmed that the introduction of *pNesE-Lmx1a* transgene into ESCs increases the production of DA neurons following the five-stage differentiation protocol in the presence of Shh and Fgf8 [19]. The analysis of these data allows to propose that *Lmx1a* increases DA differentiation by acting at two different steps of differentiation. Specifically, the higher number of groups containing Th⁺ cells can be considered an indication of *Lmx1a* contribution to the initial specification of DA NPCs, whereas a larger number of Th⁺ cells within a group might imply that, after the initial specification, *Lmx1a* also contributes to DA differentiation. In the context of the intact adult SNpc, Th⁺ neuroblasts emerged only in the presence of exogenous *Lmx1a* and were detected since 6 dpt, but none remained by 15 dpt. Considering the above DA differentiation capacity of EBCs in vitro, this might indicate that the initial *Lmx1a*-induced specification is occurring in vivo but differentiation could not continue and neuroblasts lose DA identity or died.

Undifferentiated EBCs own the capacity to differentiate into neurons within certain regions of the adult brain. This neuronal differentiation capacity, rather than being a preferred default fate, is likely because of the presence of a permissive or an inductive neurogenic environment [15]. Accordingly, differentiation into neurons was poor in the striatum, although other neural cells (ie, astrocytes) were still among the major cell types derived. In particular, efficient neuronal differentiation of EBCs occurred in the adult SNpc, but DA neurons were not detected. Because EBCs are responsive to DA specification signals, these data are in agreement with the expected absence of specification signals in the intact adult SNpc, a deficit that was at least partially overcome by EBCs expressing an exogenous *Lmx1a* (ie, those derived from the RIB5/NesE-*Lmx1a* ESC line).

Brain damage creates a local condition that can critically determine the incorporation of new neurons into specific neuronal circuits. When NPCs are transplanted, not only it is necessary that they survive within the damaged area but also that the environment is proper for specific neurogenesis. Neurogenesis or a neurogenic environment sometimes arises upon damage [22–24]. In the 6-OHDA-lesioned SNpc, EBCs can still detect the preexisting neurogenic environment, but in contrast with the observations in the intact SNpc, exogenous *Lmx1a* for DA specification appeared superfluous and DA neuroblasts were also derived from wild-type EBCs. These data suggest that the lesion by 6-OHDA did not affect the neurogenic capacity of the SNpc and, rather generates a condition that favors DA differentiation. The possible specification molecules involved remain to be identified.

In contrast with the results presented here, significant survival and/or integration of DA neurons in the lesioned SNpc has been previously achieved with differentiating DA NPCs. For example, NPCs from mouse E12.5 developing mesencephalons transplanted to the lesioned SNpc produce a large number of DA neurons, in some cases showing the ability to project to the striatum [12,13]. However, it is relevant to mention that the NPCs transplanted in these cases include many NPCs already committed to differentiate into DA neurons, such that specific differentiation factors are no longer required. Accordingly, in a study in which

NPCs at different stages of differentiation were selected and transplanted to the nonlesioned SNpc or lesioned striatum, DA neurons derived mainly from Neurog2⁺ NPCs which, in the ventral mesencephalon, represent neuroblasts committed to become DA neurons [22,27].

Committed DA NPCs derived from human ESC in vitro might also be the source of projecting DA neurons emerging in the lesioned SNpc after transplantation [14]. Therefore, the inefficient differentiation and/or survival of DA neuroblasts in our study may be because of the inability of EBC-derived NPCs to reach the committed stage. In the lesioned SNpc this could not be determined because of the few cells surviving after 6 dpt, probably because of the adverse conditions within the damaged area. It will be interesting, however, to determine whether the addition of factors, such as Shh and Fgf8, needed for the progression of DA differentiation and absent in the unlesioned or lesioned SNpc can increase the differentiation efficiency of EBC into DA neurons after transplantation.

To increase the grafting efficiency, allotransplants and xenotransplants are commonly performed with immunosuppressed host animals. Here mouse EBCs were transplanted to the brain of immunocompetent rats, and the use of immunosuppressors such as cyclosporine and tacrolimus was avoided. This latter condition was taken because we noted that EBC growth and neurogenesis is reduced in the presence of these immunosuppressors (unpublished data), an effect that appears to be related to their antiangiogenic activity [28,29]. Although active immune response could affect grafting, this did not appear to be evident up to 15 dpt in the intact SNpc [15]. At 15 dpt, although DA neuroblasts were not detected, many neuroblasts derived from transplanted EBCs remained (Fig. 3D). Therefore, it is unlikely that a specific immune rejection is the cause of lack of EBC-derived DA neurons and, rather factors required for the establishment of committed DA NPC are missing in the SNpc, as mentioned previously.

Transplantation of undifferentiated NPCs for cell replacement therapies may favor their integration into specific neuronal circuits. Although the SNpc holds a strong neurogenic environment that, as shown here, was retained after 6-OHDA lesion, this was not sufficient to direct DA neuronal differentiation. *Lmx1a* and the 6-OHDA lesion contributed to promote the early DA specification stage of EBCs, but according to the observations presented, additional factors were required to reach terminal differentiation. Optimization of in vivo DA neuronal differentiation from non-neuralized EBCs will require the addition of intrinsic factors (eg, *Foxa2*) and/or extrinsic factors (eg, Shh and Fgf8), a protocol that needs to ponder also the tumorigenic potential of remaining undifferentiated EBCs.

Acknowledgments

The authors are grateful to Dr. Elisabet Andersson for the generous gift of pNesE-*Lmx1a* vector. The authors are also grateful to Claudia Rivera for the animal supply. The authors thank to Dr. Andrés Saralegui and Dr. Arturo Pimentel at the Laboratorio Nacional de Microscopía Avanzada, and Dr. Miguel Tapia at the Unidad de Microscopía (Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM) for their technical assistance in confocal images capturing. The authors also

thank to Marcela Palomero-Rivero, Concepción Valencia, Dr. Salvador Valencia-Sánchez, Francisco Pérez-Eugenio and Maria Escalante for their technical assistance along the present work. The authors are also grateful to Karla Cordova-Flores at Laboratorio Nacional de Recursos Genómicos for her assistance in the elaboration of this article. This study is a part of the requirements for the PhD degree in biomedical research at Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas of O.C.-N. at Universidad Nacional Autónoma de México supported by a fellowship from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT; No. 263466). This project was supported by grants from CONACyT CB-131031 and FOINS-1723, and from DGAPA-PAPIIT IN207116.

Author Disclosure Statement

No competing financial interests exist declared by authors.

Supplementary Material

Supplementary Figure S1
Supplementary Figure S2
Supplementary Table S1
Supplementary Table S2

References

- Elbaz A, L Carcaillon, S Kab and F Moisan. (2016). Epidemiology of Parkinson's disease. *Rev Neurol (Paris)* 172: 14–26.
- Cenci MA. (2017). Molecular mechanisms of L-DOPA-induced dyskinesia. In: *Handbook of Basal Ganglia Structure and Function*. H Steiner and KY Tseng, eds. Elsevier, Amsterdam, pp 857–871.
- Kriks S, J-W Shim, J Piao, YM Ganat, DR Wakeman, Z Xie, L Carrillo-Reid, G Auyeung, C Antonacci, et al. (2011). Dopamine neurons derived from human ES cells efficiently engraft in animal models of Parkinson's disease. *Nature* 480:547–551.
- Li W, E Englund, H Widner, B Mattsson, D van Westen, J Lätt, S Rehneron, P Brundin, A Björklund, O Lindvall and J-Y Li. (2016). Extensive graft-derived dopaminergic innervation is maintained 24 years after transplantation in the degenerating parkinsonian brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113:6544–6549.
- Müller J, C Ossig, JFW Greiner, S Hauser, M Fauser, D Widera, C Kaltschmidt, A Storch and B Kaltschmidt. (2015). Intrastriatal transplantation of adult human neural crest-derived stem cells improves functional outcome in parkinsonian rats. *Stem Cells Transl Med* 4:31–43.
- Meyer AK, M Maisel, A Hermann, K Stirl and A Storch. (2010). Restorative approaches in Parkinson's disease: which cell type wins the race? *J Neurol Sci* 289:93–103.
- Lee SH, N Lumelsky, L Studer, JM Auerbach and RD McKay. (2000). Efficient generation of midbrain and hindbrain neurons from mouse embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 18:675–679.
- Engel M, D Do-Ha, SS Muñoz and L Ooi. (2016). Common pitfalls of stem cell differentiation: a guide to improving protocols for neurodegenerative disease models and research. *Cell Mol Life Sci* 73:3693–3709.
- Ying Q-L, M Stavridis, D Griffiths, M Li and A Smith. (2003). Conversion of embryonic stem cells into neuroectodermal precursors in adherent monoculture. *Nat Biotechnol* 21:183–186.
- Kawasaki H, K Mizuseki, S Nishikawa, S Kaneko, Y Kuwana, S Nakanishi, SI Nishikawa and Y Sasai. (2000). Induction of midbrain dopaminergic neurons from ES cells by stromal cell-derived inducing activity. *Neuron* 28: 31–40.
- Baizabal J-M and L Covarrubias. (2009). The embryonic midbrain directs neuronal specification of embryonic stem cells at early stages of differentiation. *Dev Biol* 325:49–59.
- Gaillard A, M Decressac, I Frappé, PO Fernagut, L Prestoz, S Besnard and M Jaber. (2009). Anatomical and functional reconstruction of the nigrostriatal pathway by intranigral transplants. *Neurobiol Dis* 35:477–488.
- Thompson LH, S Grealish, D Kirik and A Björklund. (2009). Reconstruction of the nigrostriatal dopamine pathway in the adult mouse brain. *Eur J Neurosci* 30: 625–638.
- Grealish S, E Diguët, A Kirkeby, B Mattsson, A Heuer, Y Bramouille, N Van Camp, AL Perrier, P Hantraye, A Björklund and M Parmar. (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.
- Maya-Espinosa G, O Collazo-Navarrete, D Millán-Aldaco, M Palomero-Rivero, G Guerrero-Flores, R Drucker-Colín, L Covarrubias and M Guerra-Crespo. (2014). Mouse embryonic stem cell-derived cells reveal niches that support neuronal differentiation in the adult rat brain. *Stem Cells* 33:491–502.
- Paxinos G and C Watson. (2005). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, 5th edn. Elsevier Academic Press, Amsterdam; Boston, MA.
- Boronat-García A, M Palomero-Rivero, M Guerra-Crespo, D Millán-Aldaco and R Drucker-Colín. (2016). Intrastriatal grafting of chromospheres: survival and functional effects in the 6-OHDA rat model of Parkinson's disease. *PLoS One* 11:1–26.
- Andersson E, U Tryggvason, Q Deng, S Friling, Z Alekseenko, B Robert, T Perlmann and J Ericson. (2006). Identification of intrinsic determinants of midbrain dopamine neurons. *Cell* 124:393–405.
- Friling S, E Andersson, LH Thompson, ME Jönsson, JB Hebsgaard, E Nanou, Z Alekseenko, U Marklund, S Kjellander, et al. (2009). Efficient production of mesencephalic dopamine neurons by Lmx1a expression in embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 7613–7618.
- Sánchez-Danés A, A Consiglio, Y Richaud, I Rodríguez-Pizà, B Dehay, M Edel, J Bové, M Memo, M Vila, A Raya and JC Izpisua Belmonte. (2012). Efficient generation of A9 midbrain dopaminergic neurons by lentiviral delivery of LMX1A in human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells. *Hum Gene Ther* 23: 56–69.
- Bayer SA, KV Wills, LC Triarhou and B Ghetti. (1995). Time of neuron origin and gradients of neurogenesis in midbrain dopaminergic neurons in the mouse. *Exp Brain Res* 105:191–199.
- Guerrero-Flores G, A Bastidas-Ponce, O Collazo-Navarrete, M Guerra-Crespo and L Covarrubias. (2017). Functional determination of the differentiation potential of ventral

- mesencephalic neural precursor cells during dopaminergic neurogenesis. *Dev Biol* 429:56–70.
23. Arvidsson A, T Collin, D Kirik, Z Kokaia and O Lindvall. (2002). Neuronal replacement from endogenous precursors in the adult brain after stroke. *Nat Med* 8:963–970.
 24. Jones KS and BJ Connor. (2016). The effect of pro-neurogenic gene expression on adult subventricular zone precursor cell recruitment and fate determination after excitotoxic brain injury. *J Stem Cells Regen Med* 12: P25–P35.
 25. Saha B, S Peron, K Murray, M Jaber and A Gaillard. (2013). Cortical lesion stimulates adult subventricular zone neural progenitor cell proliferation and migration to the site of injury. *Stem Cell Res* 11:965–977.
 26. Boronat-García A, M Guerra-Crespo and R Drucker-Colín. (2017). Historical perspective of cell transplantation in Parkinson's disease. *World J Transplant* 7:179–192.
 27. Jönsson ME, Y Ono, A Björklund and LH Thompson. (2009). Identification of transplantable dopamine neuron precursors at different stages of midbrain neurogenesis. *Exp Neurol* 219:341–354.
 28. Siamakpour-Reihani S, J Caster, DB Nepal, A Courtwright, E Hilliard, J Usary, D Ketelsen, D Darr, XJ Shen, C Patterson and N Klauber-DeMore. (2011). The role of calcineurin/NFAT in SFRP2 induced angiogenesis—a rationale for breast cancer treatment with the calcineurin inhibitor Tacrolimus. *PLoS One* 6(6):e20412.
 29. Rafiee P, J Heidemann, H Ogawa, NA Johnson, PJ Fisher, MS Li, MF Ottersen, CP Johnson and DG Binion. (2004). Cyclosporin A differentially inhibits multiple steps in

VEGF induced angiogenesis in human microvascular endothelial cells through altered intracellular signaling. *Cell Commun Signal* 2(1), 3.

Address correspondence to:

*Dr. Luis Covarrubias
Department of Developmental Genetics
and Molecular Physiology
Instituto de Biotecnología
Universidad Nacional Autónoma de México
Av. Universidad 2001
Cuernavaca Mor. 62210
México*

E-mail: covs@ibt.unam.mx

*Dr. Magdalena Guerra-Crespo
Facultad de Medicina
Universidad Nacional Autónoma de México
Av. Universidad 3000, Coyoacán
Ciudad de México 04510
México*

E-mail: magdagmx@hotmail.com

Received for publication November 8, 2018

Accepted after revision May 24, 2019

Prepublished on Liebert Instant Online May 29, 2019



Contents lists available at ScienceDirect

Developmental Biology

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

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



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

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

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

ARTICLE INFO

Keywords:
Mesencephalic neural precursor cells
Commitment
Dopaminergic differentiation
Neurogenesis
Astrogenesis

ABSTRACT

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

1. Introduction

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

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

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

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

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

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

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

Available online 18 July 2017

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

tation is a preferred assay for NPC commitment.

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

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

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

2. Materials and methods

2.1. Animals and tissue preparation

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

2.2. Collagen explant culture

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

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

2.3. Transplant-explant protocol

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

2.4. Cell aggregation

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

2.5. Transplantation into adult rats

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

2.6. Monolayer culture of mesencephalic NPCs

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

2.7. Tissue processing and Immunofluorescence staining

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

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

2.8. Cell quantification and statistical analysis

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

3. Results

3.1. Expansion of putative mDA NPCs anticipates DA differentiation

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

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

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

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

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

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

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

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

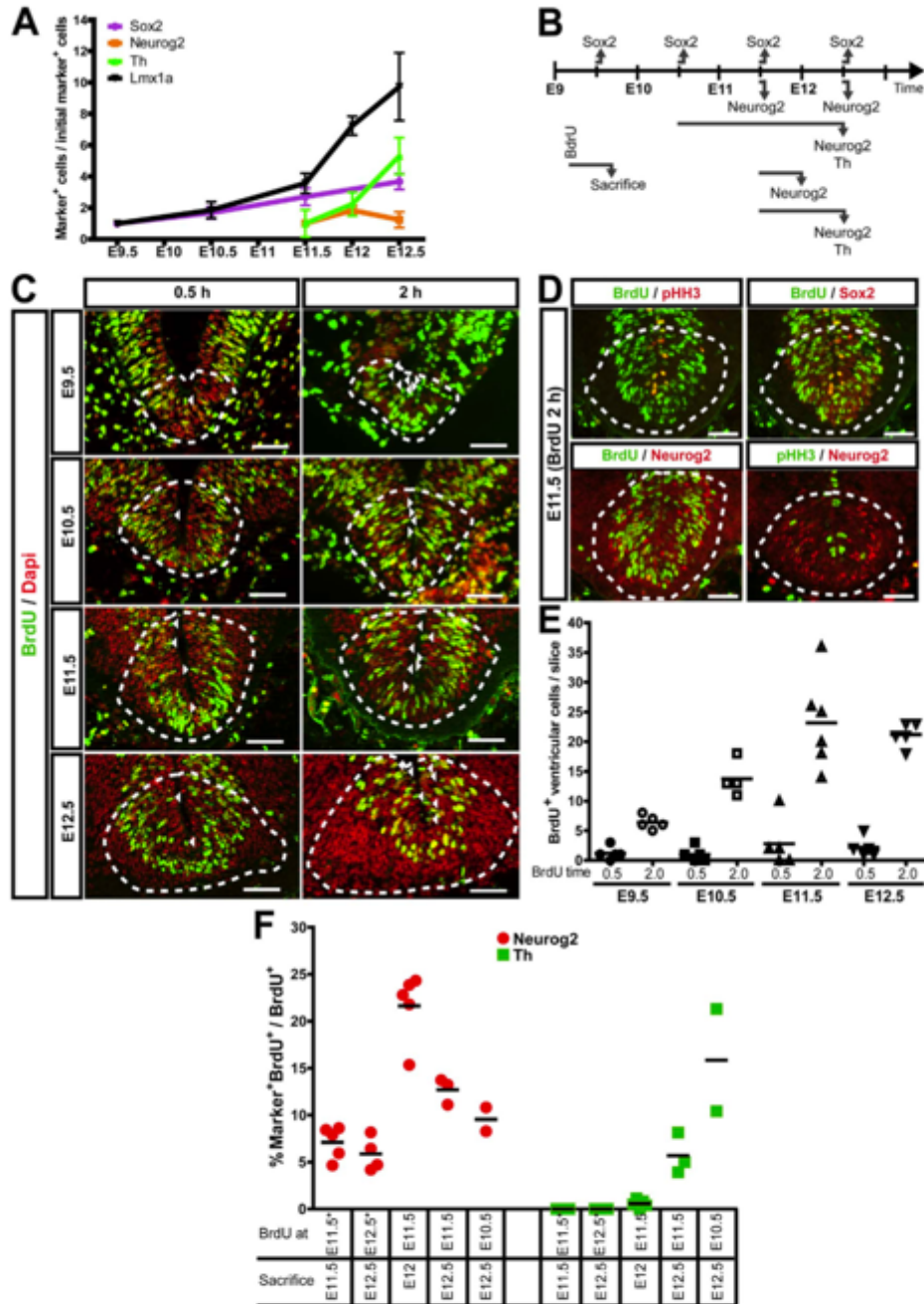


Fig. 1. Flux of mDA differentiation. (A) Differentiation of mDA NPCs was followed through development (E9.5–E12.5) by immunodetection of markers that identify the major cell stages: mDA precursors and neurons (Lmx1a), dividing ventricular NPCs (Sox2), progenitors (Neurog2), neurons (Th). The number of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

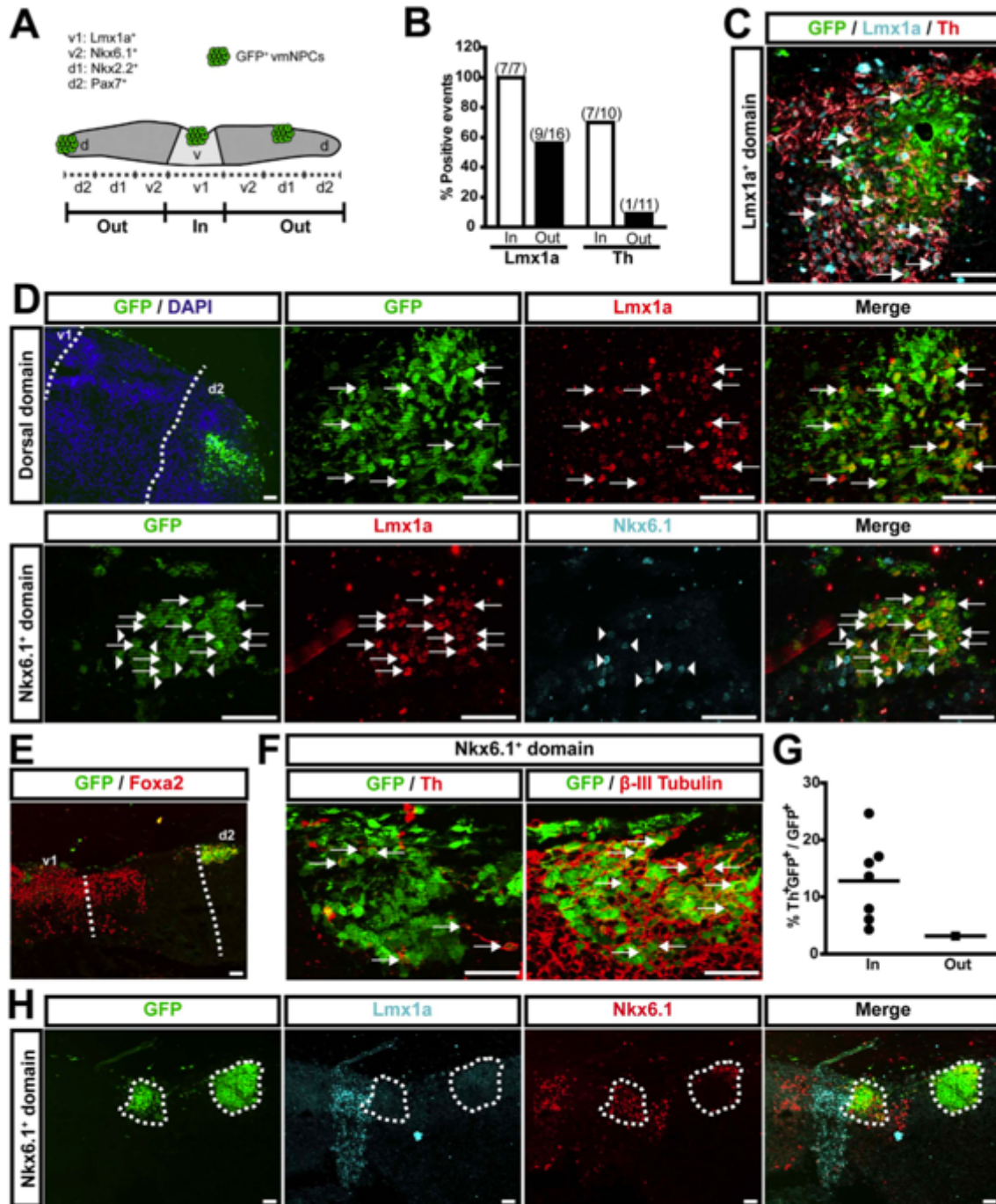


Fig. 2. E9.5 mDA NPCs remain as *Lmx1a*⁺ but do not generate mDA neurons outside their niche. A cell suspension from whole ventral E9.5 midbrains was transplanted to E10.5 midbrain explants. (A) Schematic representation of midbrain explant domains where transplanted cells can implant; "In" refers to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

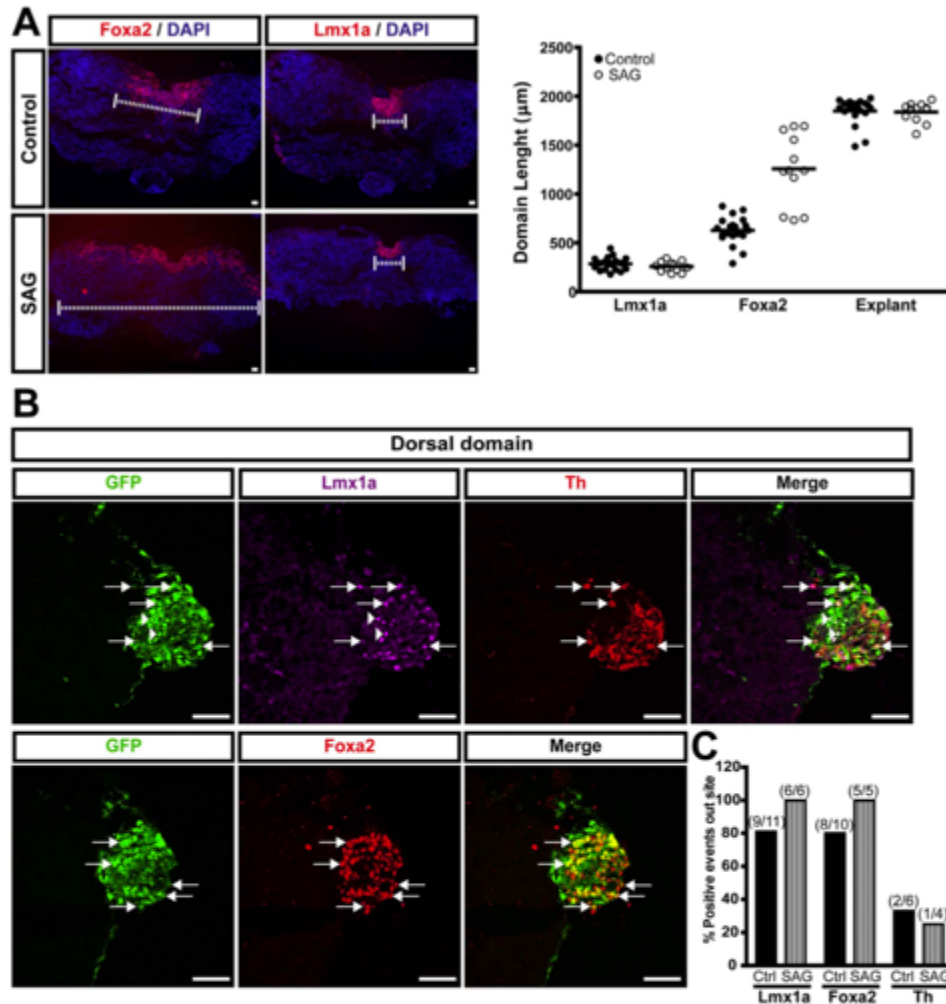


Fig. 3. Shh cannot induced differentiation to mDA neurons of E9.5 vmNPCs. (A) E10.5 midbrain explants were treated with SAG and cultured for 7 days. SAG induced an expansion of the Foxa2 domain without changing the size of the Lmx1a domain; dotted lines indicate the length measured whose determination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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

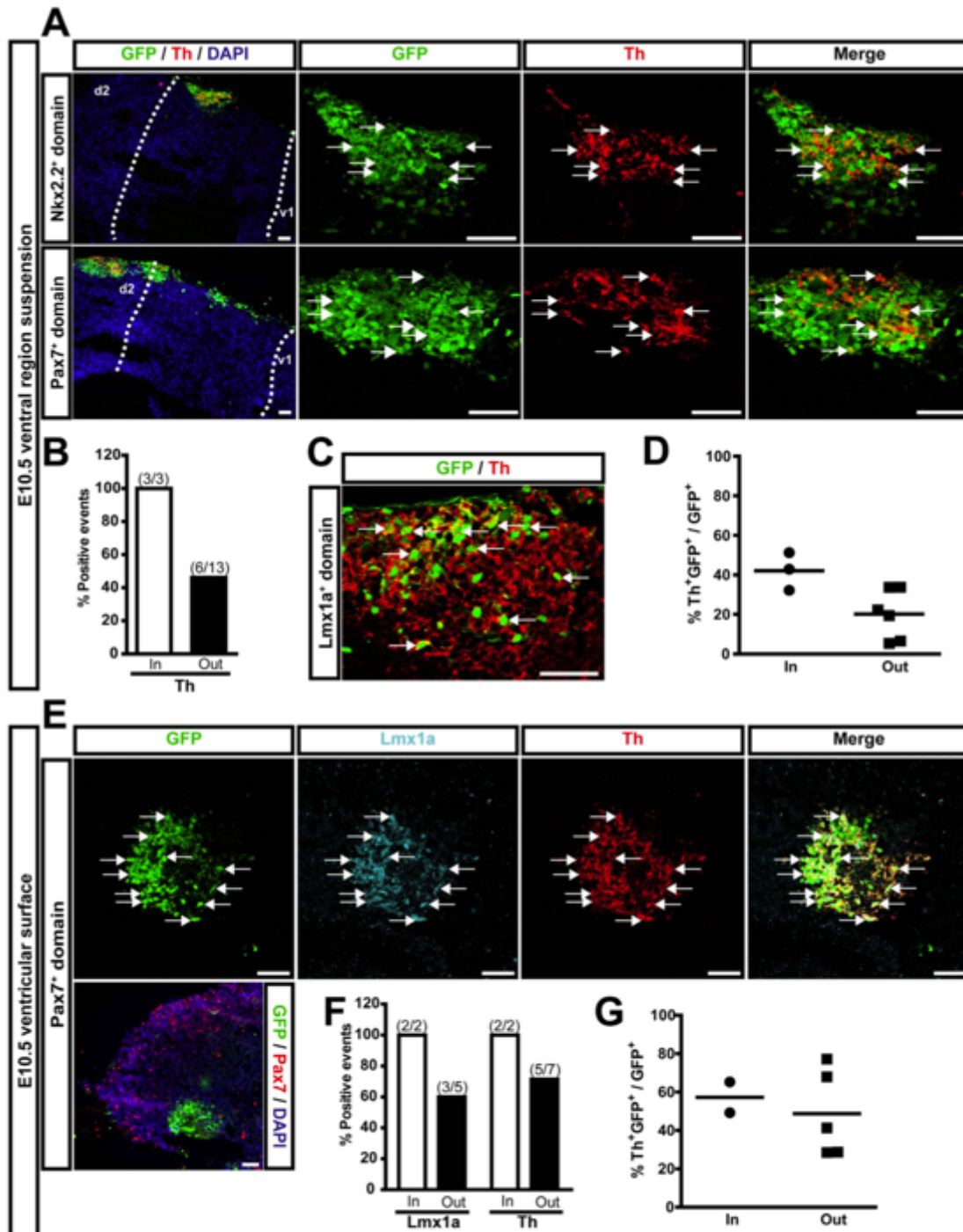


Fig. 4. A population of committed mDA NPCs appeared at around E10.5. A suspension of whole ventral E10.5 midbrains was implanted in dorsal regions of midbrain explants. (A) Implanted cells differentiated into Th⁺ neurons in Nkx2.2⁺ (arrows, upper panel) and Pax7⁺ (arrows, lower panel) domains. Dotted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

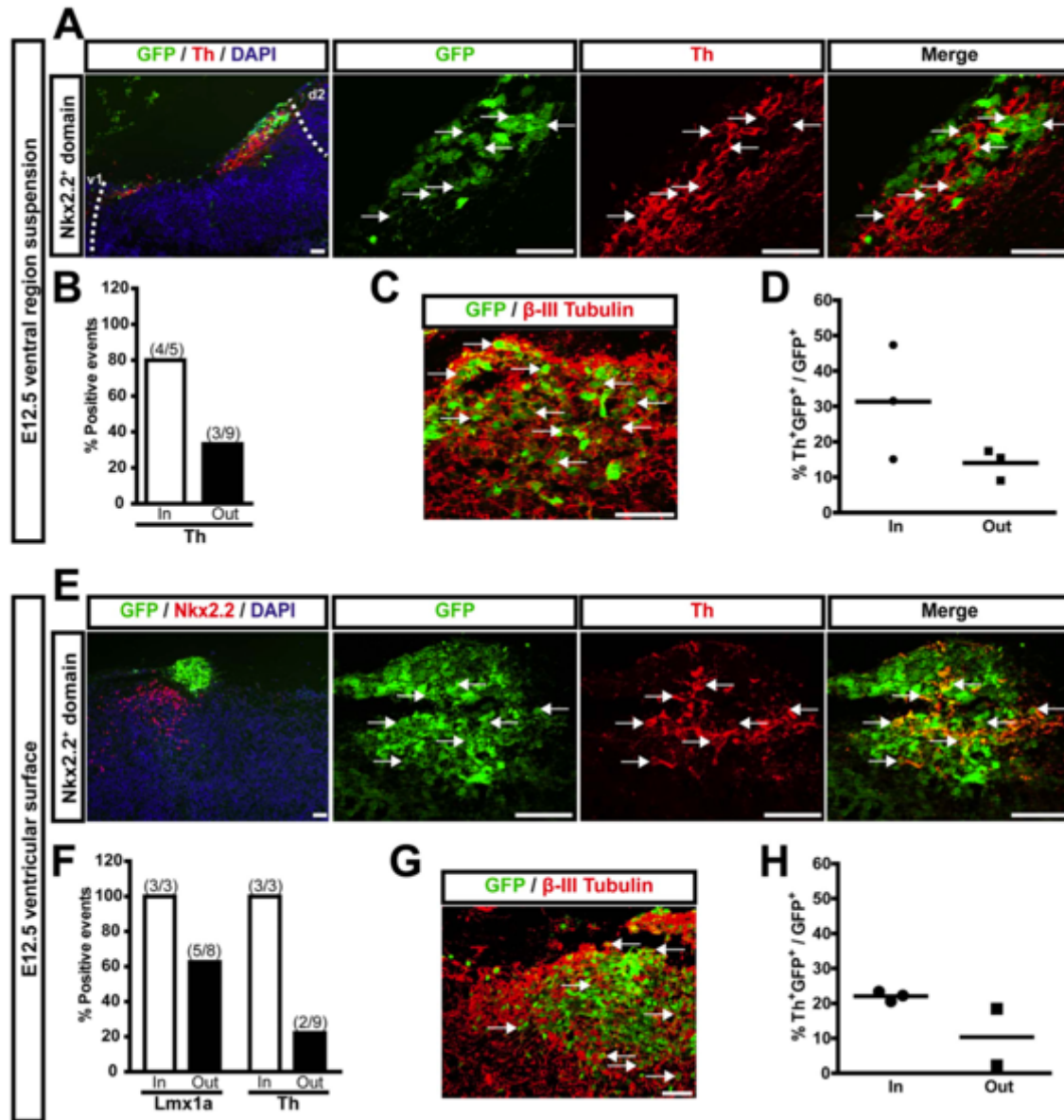


Fig. 5. The population of mDANPCs committed diminish around E12.5. A suspension of whole ventral E12.5 midbrains was implanted in dorsal regions of midbrain explants. (A) Few implanted cells differentiated into Th⁺ neurons in Nkx2.2⁺ domain (arrows). Dotted lines mark border of v1 and d2 domains. (B)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

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

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

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

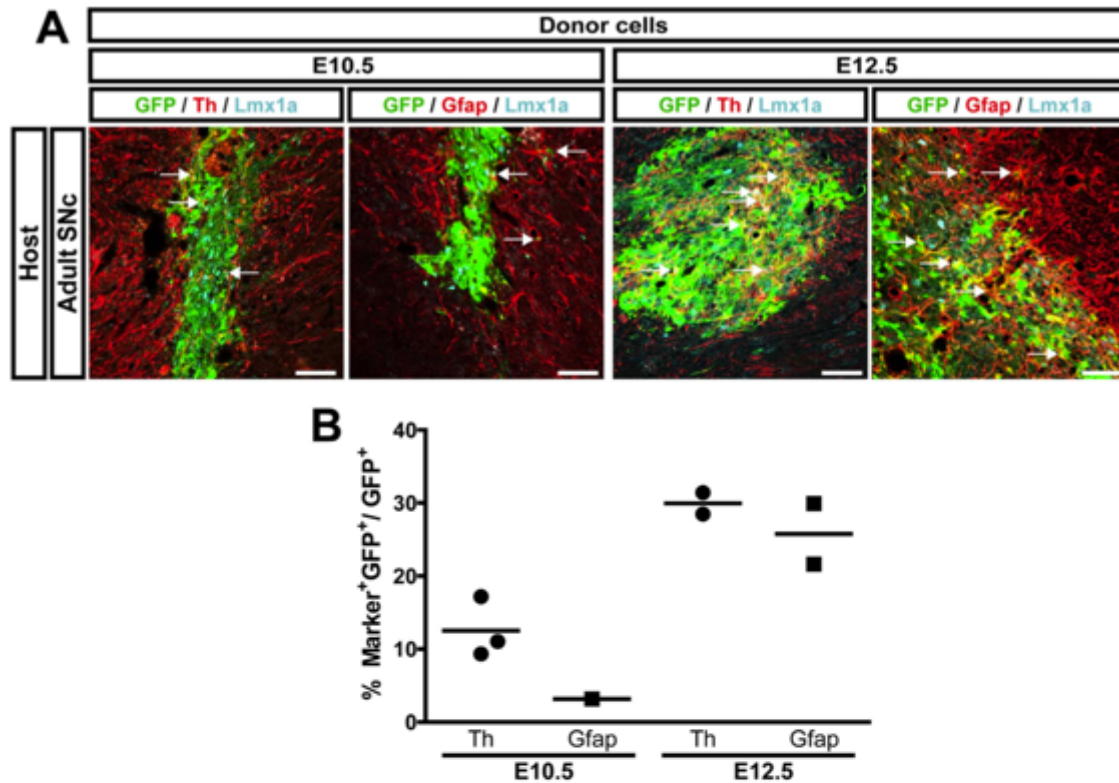


Fig. 6. mDA NPCs differentiate and immature neurons survive in the adult substantia nigra. (A) A suspension of whole ventral midbrains from E10.5 or E12.5 embryos (donor cells) was transplanted to the adult rat substantia nigra (SN; host). After six days, many cells showed *Lmx1a* presence and several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

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

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

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

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

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

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

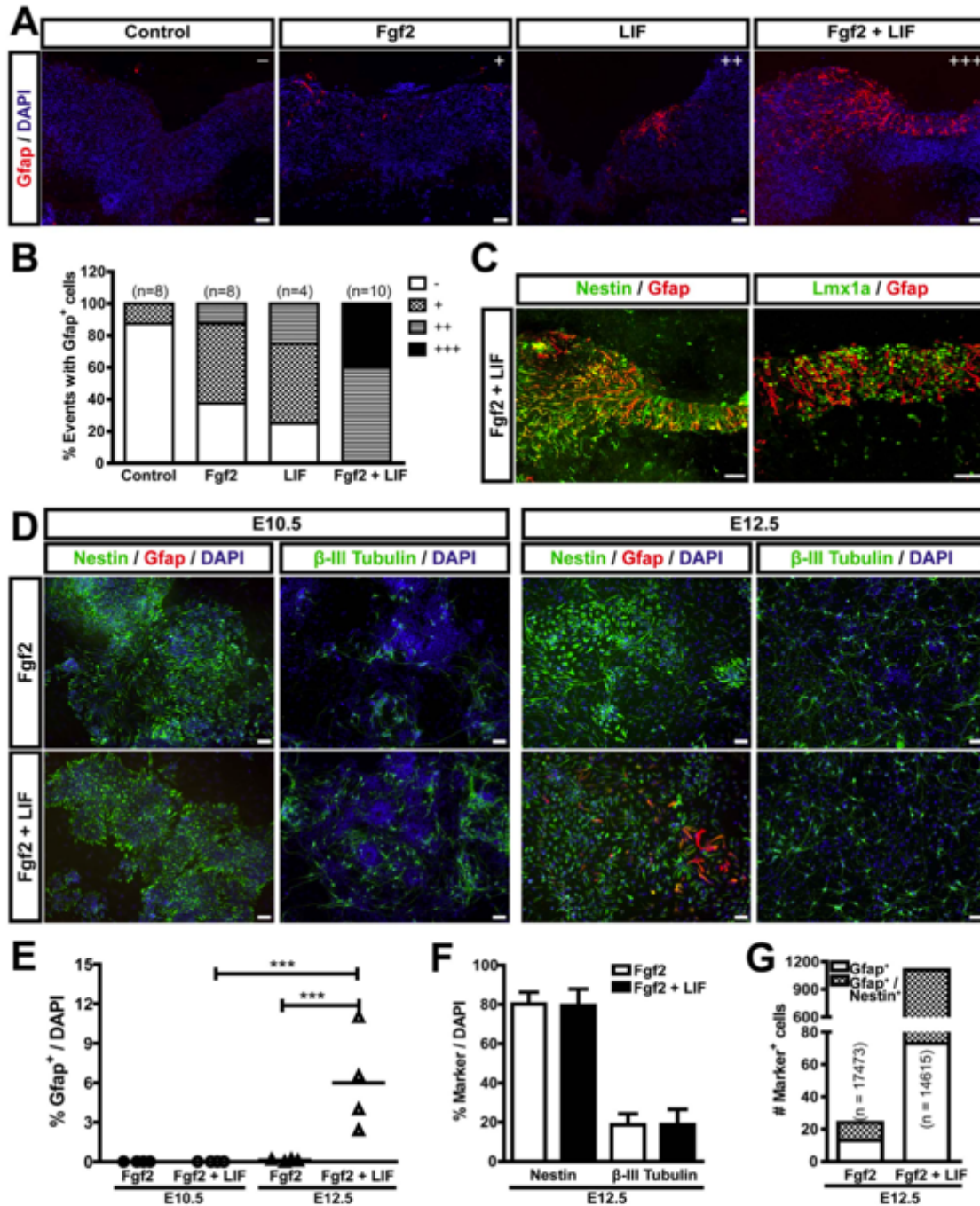


Fig. 7. "Late" mDA NPCs show capacity to differentiate into astrocytes in contrast with "early" NPCs. (A) E11.5 midbrain explants were cultured with Fgf2, LIF or both for 6 days. Different degrees of astrogenic induction were observed (-, no Gfap⁺ cells; +, very few Gfap⁺ cells; ++, few Gfap⁺ cells mostly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

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

4. Discussion

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

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

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

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

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

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

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

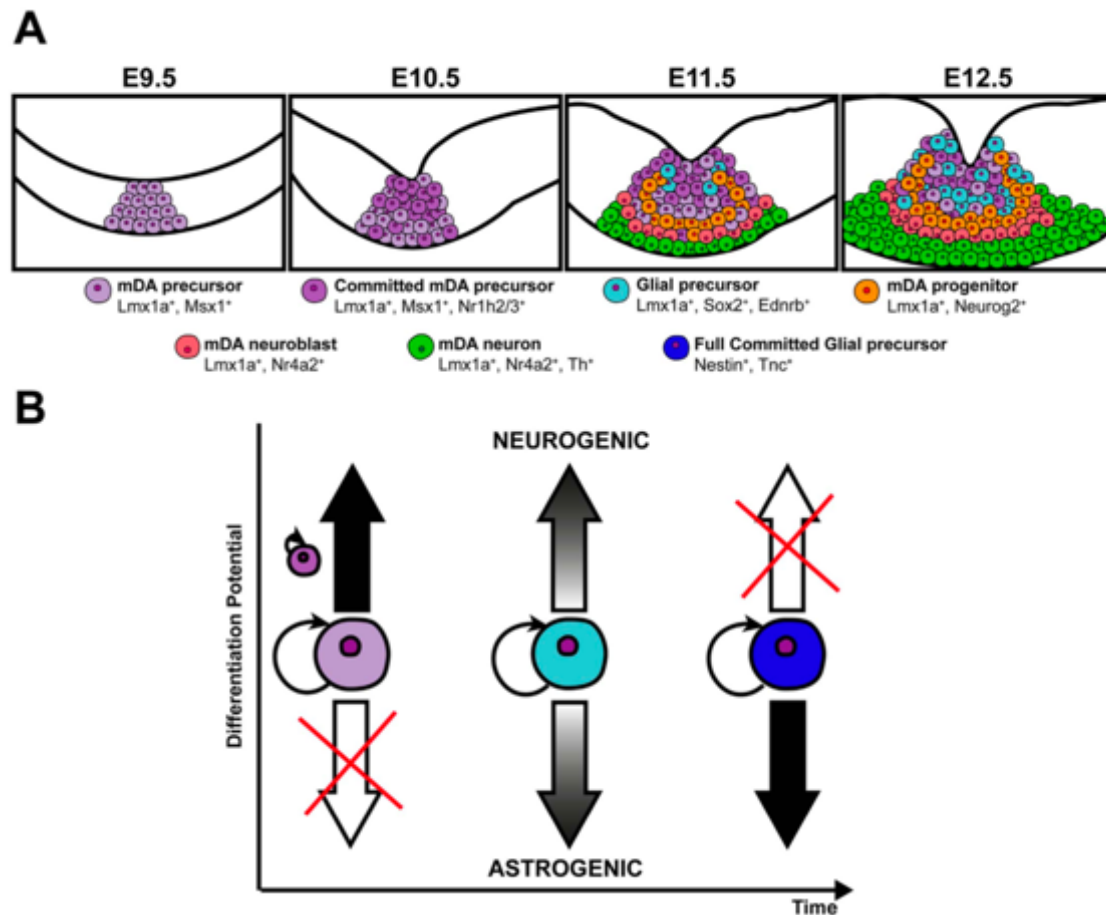


Fig. 8. Model of NPCs commitment during mDA differentiation. (A) At E9.5 mDA niche is composed of specified NPCs ($Lmx1a^+Msx1^+$) actively proliferating. By E10.5 most NPCs are transiting to the committed mDA fate and some start to be detected ($Lmx1a^+Msx1^+Nr1h2/3^+$). Consequently, at E11.5 the mDA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

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

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

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

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

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

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

Acknowledgements

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

Appendix A. Supporting information

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

References

Alvarado-Mallart, R.M., Martínez, S., Lance-Jones, C.C., 1990. Pluripotentiality of the 2-day-old avian germinative neuroepithelium. *Dev. Biol.* 139, 75–88.

Anderson, L., Burnstein, R.M., He, X., Luce, R., Furlong, R., Foltysie, T., Sykacek, P., Menon, D.K., Caldwell, M.A., 2007. Gene expression changes in long term expanded human neural progenitor cells passaged by chopping lead to loss of neurogenic potential in vivo. *Exp. Neurol.* 204, 512–524.

Andersson, E., Jensen, J.B., Parmar, M., Guillemot, F., Björklund, A., 2006a. Development of the mesencephalic dopaminergic neuron system is compromised in the absence of neurogenin 2. *Development* 133, 507–516.

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

Baizabal, J.M., Covarrubias, L., 2009. The embryonic midbrain directs neuronal specification of embryonic stem cells at early stages of differentiation. *Dev. Biol.* 325, 49–59.

Baizabal, J.M., Valencia, C., Guerrero-Flores, G., Covarrubias, L., 2010. Telencephalic neural precursor cells show transient competence to interpret the dopaminergic niche of the embryonic midbrain. *Dev. Biol.* 349, 192–203.

Baizabal, J.M., Cano-Martínez, A., Valencia, C., Santa-Olalla, J., Young, K.M., Rietze, R.L., Bartlett, P.F., Covarrubias, L., 2012. Glial commitment of mesencephalic neural precursor cells expanded as neurospheres precludes their engagement in niche-dependent dopaminergic neurogenesis. *Stem Cells Dev.* 21, 1047–1058.

Bang, A.G., Goulding, M.D., 1996. Regulation of vertebrate neural cell fate by transcription factors. *Curr. Opin. Neurobiol.* 6, 25–32.

Bang, S.Y., Kwon, S.H., Yi, S.H., Yi, S.A., Park, E.K., Lee, J.C., Jang, C.G., You, J.S., Lee, S.H., Han, J.W., 2015. Epigenetic activation of the Foxa2 gene is required for maintaining the potential of neural precursor cells to differentiate into dopaminergic neurons after expansion. *Stem Cells Dev.* 24, 520–533.

Campbell, K., Olsson, M., Björklund, A., 1995. Regional incorporation and site-specific differentiation of striatal precursors transplanted to the embryonic forebrain ventricle. *Neuron* 15, 1259–1273.

Cattaneo, E., Magrassi, L., Butti, G., Santi, L., Giavazzi, A., Pezzotta, S., 1994. A short term analysis of the behaviour of conditionally immortalized neuronal progenitors and primary neuroepithelial cells implanted into the fetal rat brain. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 83, 197–208.

Chang, M.Y., Park, C.H., Lee, S.Y., Lee, S.H., 2004. Properties of cortical precursor cells cultured long term are similar to those of precursors at later developmental stages. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 153, 89–96.

Chen, J.K., Taipale, J., Young, K.E., Maiti, T., Beachy, P.A., 2002. Small molecule modulation of Smoothened activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 14071–14076.

Chung, S., Shin, B.S., Hwang, M., Lardaro, T., Kang, U.J., Isaacson, O., Kim, K.S., 2006. Neural precursors derived from embryonic stem cells, but not those from fetal ventral mesencephalon, maintain the potential to differentiate into dopaminergic neurons after expansion in vitro. *Stem Cells* 24, 1583–1593.

Chung, S., Leung, A., Han, B.S., Chang, M.Y., Moon, J.I., Kim, C.H., Hong, S., Pruszkak, J., Isaacson, O., Kim, K.S., 2009. Wnt1-lmx1a forms a novel autoregulatory loop and controls midbrain dopaminergic differentiation synergistically with the SHH-FoxA2 pathway. *Cell Stem Cell* 5, 646–658.

Fan, G., Martinovich, K., Chin, M.H., He, F., Fouse, S.D., Hutnick, L., Hattori, D., Ge, W., Shen, Y., Wu, H., ten Hoeve, J., Shuai, K., Sun, Y.E., 2005. DNA methylation controls the timing of astrogliogenesis through regulation of JAK-STAT signaling. *Development* 132, 3345–3356.

Ferri, A.L., Lin, W., Mavromatakis, Y.E., Wang, J.C., Sasaki, H., Whitsett, J.A., Ang, S.L., 2007. Foxa1 and Foxa2 regulate multiple phases of midbrain dopaminergic neuron development in a dosage-dependent manner. *Development* 134, 2761–2769.

Fishell, G., 1995. Striatal precursors adopt cortical identities in response to local cues. *Development* 121, 803–812.

Frank-Kamenetsky, M., Zhang, X.M., Bottega, S., Guicherit, O., Wichterle, H., Dudek, H., Bumcrot, D., Wang, F.Y., Jones, S., Shulok, J., Rubin, L.L., Porter, J.A., 2002. Small-molecule modulators of Hedgehog signaling: identification and characterization of Smoothened agonists and antagonists. *J. Biol. Chem.* 277, 1010–1019.

Gardner, C.A., Barald, K.F., 1991. The cellular environment controls the expression of engrailed-like protein in the cranial neuroepithelium of quail-chick chimeric embryos. *Development* 113, 1037–1048.

Gennet, N., Gale, E., Nan, X., Farley, E., Takacs, K., Oberwallner, B., Chambers, D., Li, M., 2011. Doublesex and mab-3-related transcription factor 5 promotes midbrain dopaminergic identity in pluripotent stem cells by enforcing a ventral-medial progenitor fate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108, 9131–9136.

Grapin-Botton, A., Bonnin, M.A., Le Douarin, N.M., 1997. Hox gene induction in the neural tube depends on three parameters: competence, signal supply and paralogue group. *Development* 124, 849–859.

Hirabayashi, Y., Gotob, Y., 2010. Epigenetic control of neural precursor cell fate during development. *Nat. Rev. Neurosci.* 11, 377–388.

Hynes, M., Porter, J.A., Chiang, C., Chang, D., Tessier-Lavigne, M., Beachy, P.A., Rosenthal, A., 1995. Induction of midbrain dopaminergic neurons by Sonic hedgehog. *Neuron* 15, 35–44.

Itsaki, N., Sharpe, J., Morrison, A., Krumlauf, R., 1996. Reprogramming Hox expression in the vertebrate hindbrain: influence of paraxial mesoderm and rhombomere transposition. *Neuron* 16, 487–500.

Jobe, K.K., Hazel, T.G., Muller, T., Dugich-Djordjevic, M.M., McKay, R.D., 1996. Single factors direct the differentiation of stem cells from the fetal and adult central nervous system. *Genes Dev.* 10, 3129–3140.

Jonsson, M.E., Ono, Y., Björklund, A., Thompson, L.H., 2009. Identification of transplantable dopamine neuron precursors at different stages of midbrain neurogenesis. *Exp. Neurol.* 219, 341–354.

Kee, N., Volakakis, N., Kirkeby, A., Dahl, L., Storrall, H., Nölbrand, S., Lahti, L., Björklund, A.K., Gillberg, L., Joodmardi, E., Sandberg, R., Parmar, M., Perlmann, T., 2017. Single-cell analysis reveals a close relationship between differentiating dopamine and subthalamic nucleus neuronal lineages. *Cell Stem Cell* 20, 29–40.

Kele, J., Simplicio, N., Ferri, A.L., Mira, H., Guillemot, F., Arenas, E., Ang, S.L., 2006. Neurogenin 2 is required for the development of ventral midbrain dopaminergic neurons. *Development* 133, 495–505.

La Manno, G., Gyllborg, D., Codeluppi, S., Nishimura, K., Salto, C., Zeisel, A., Borm, L.E., Stott, S.R., Toledo, E.M., Villaescusa, J.C., Lönnerberg, P., Ryge, J., Barker, R.A., Arenas, E., Linnarsson, S., 2016. Molecular diversity of midbrain development in mouse, human, and stem cells. *Cell* 167, 566–580, (e519).

Lacomme, M., Lisabet, L., Pituello, F., Bel-Visal, S., 2012. NEUROG2 drives cell cycle exit of neuronal precursors by specifically repressing a subset of cyclins acting at the G1 and S phases of the cell cycle. *Mol. Cell. Biol.* 32, 2596–2607.

Maya-Espinosa, G., Collazo-Navarrete, O., Millán-Aldaco, D., Palomero-Rivero, M., Guerrero-Flores, G., Drucker-Colin, R., Covarrubias, L., Guerra-Crespo, M., 2015. Mouse embryonic stem cell-derived cells reveal niches that support neuronal differentiation in the adult rat brain. *Stem Cells* 33, 491–502.

Meyer, A.K., Jarosch, A., Schurig, K., Nuesslein, I., Kissenlotter, S., Storch, A., 2012. Fetal mouse mesencephalic NPCs generate dopaminergic neurons from post-mitotic precursors and maintain long-term neural but not dopaminergic potential in vitro. *Brain Res.* 1474, 8–18.

Morrose, T., Song, M.R., Ghosh, A., 2001. Sequential specification of neurons and glia by developmentally regulated extracellular factors. *Development* 128, 3585–3594.

Nunes, I., Tosmasian, L.T., Silva, R.M., Burke, R.E., Goff, S.P., 2003. Pitx3 is required for

- development of substantia nigra dopaminergic neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 4245–4250.
- Olsson, M., Campbell, K., Turnbull, D.H., 1997. Specification of mouse telencephalic and mid-hindbrain progenitors following heterotopic ultrasound-guided embryonic transplantation. *Neuron* 19, 761–772.
- Olsson, M., Bjerregaard, K., Winkler, C., Gates, M., Björklund, A., Campbell, K., 1998. Incorporation of mouse neural progenitors transplanted into the rat embryonic forebrain is developmentally regulated and dependent on regional and adhesive properties. *Eur. J. Neurosci.* 10, 71–85.
- Omodei, D., Acampora, D., Mancuso, P., Prakash, N., Di Giovanniantonio, L.G., Wurst, W., Simeone, A., 2008. Anterior-posterior graded response to *Otx2* controls proliferation and differentiation of dopaminergic progenitors in the ventral mesencephalon. *Development* 135, 3459–3470.
- Ono, Y., Nakatani, T., Sakamoto, Y., Mizuhara, E., Minaki, Y., Kumai, M., Hamaguchi, A., Nishimura, M., Inoue, Y., Hayashi, H., Takahashi, J., Imai, T., 2007. Differences in neurogenic potential in floor plate cells along an anteroposterior location: midbrain dopaminergic neurons originate from mesencephalic floor plate cells. *Development* 134, 3213–3225.
- Ono, Y., Nakatani, T., Minaki, Y., Kumai, M., 2010. The basic helix-loop-helix transcription factor *Nato3* controls neurogenic activity in mesencephalic floor plate cells. *Development* 137, 1897–1906.
- Panichision, D.M., McKay, R.D., 2002. The control of neural stem cells by morphogenic signals. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 12, 478–487.
- Puelles, E., Annino, A., Tuorto, F., Uziel, A., Acampora, D., Czerny, T., Brodski, C., Ang, S.-L., Wurst, W., Simeone, A., 2004. *Otx2* regulates the extent, identity and fate of neural progenitor domains in the ventral midbrain. *Development* 131, 2037–2048.
- Qian, X., Shen, Q., Goderie, S.K., He, W., Capeta, A., Davis, A.A., Temple, S., 2000. Timing of CNS cell generation: a programmed sequence of neuron and glial cell production from isolated murine cortical stem cells. *Neuron* 28, 69–80.
- Rositch, D.H., Kriegstein, A.R., 2010. Developmental genetics of vertebrate glial-cell specification. *Nature* 468, 214–222.
- Sacchetti, P., Sousa, K.M., Hall, A.C., Liste, I., Steffensen, K.R., Theofilopoulos, S., Parish, C.L., Hazenberg, C., Richter, L.A., Hovatta, O., Gustafsson, J.A., Arenas, E., 2009. Liver X receptors and oxysterols promote ventral midbrain neurogenesis *in vivo* and in human embryonic stem cells. *Cell Stem Cell* 5, 409–419.
- Sasaki, H., Hui, C., Nakafuku, M., Kondoh, H., 1997. A binding site for Gli proteins is essential for HNF-3beta floor plate enhancer activity in transgenics and can respond to Shh *in vitro*. *Development* 124, 1313–1322.
- Saucedo-Cardenas, O., Quintana-Hau, J.D., Le, W.D., Smidt, M.P., Cox, J.J., De Mayo, F., Burbach, J.P., Conneely, O.M., 1998. *Nurr1* is essential for the induction of the dopaminergic phenotype and the survival of ventral mesencephalic late dopaminergic precursor neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 4013–4018.
- Smidt, M.P., Smits, S.M., Bouwmeester, H., Hanees, F.P., van der Linden, A.J., Hellemons, A.J., Graw, J., Burbach, J.P., 2004. Early developmental failure of substantia nigra dopamine neurons in mice lacking the homeodomain gene *Pitx3*. *Development* 131, 1145–1155.
- Smits, S.M., Ponnio, T., Conneely, O.M., Burbach, J.P., Smidt, M.P., 2003. Involvement of *Nurr1* in specifying the neurotransmitter identity of ventral midbrain dopaminergic neurons. *Eur. J. Neurosci.* 18, 1731–1738.
- Song, M.R., Ghosh, A., 2004. FGF2-induced chromatin remodeling regulates CNTF-mediated gene expression and astrocyte differentiation. *Nat. Neurosci.* 7, 229–235.
- Studer, L., Tabar, V., McKay, R.D., 1998. Transplantation of expanded mesencephalic precursors leads to recovery in parkinsonian rats. *Nat. Neurosci.* 1, 290–295.
- Takahashi, T., Nowakowski, R.S., Caviness, V.S., Jr., 1993. Cell cycle parameters and patterns of nuclear movement in the neocortical proliferative zone of the fetal mouse. *J. Neurosci.* 13, 820–833.
- Takizawa, T., Nakashima, K., Namihira, M., Ochiai, W., Uemura, A., Yanagisawa, M., Fujita, N., Nakao, M., Taga, T., 2001. DNA methylation is a critical cell-intrinsic determinant of astrocyte differentiation in the fetal brain. *Dev. Cell* 1, 749–758.
- Thompson, L.H., Andersson, E., Jensen, J.B., Barraud, P., Guillemot, F., Parmar, M., Björklund, A., 2006. Neurogenin2 identifies a transplantable dopamine neuron precursor in the developing ventral mesencephalon. *Exp. Neurol.* 198, 183–198.
- Trujillo-Paredes, N., Valencia, C., Guerrero-Flores, G., Arzate, D.M., Baizabal, J.M., Guerra-Crespo, M., Fuentes-Hernandez, A., Zea-Armenta, I., Covarrubias, L., 2016. Regulation of differentiation flux by Notch signalling influences the number of dopaminergic neurons in the adult brain. *Biol. Open* 5, 336–347.
- Yan, J., Studer, L., McKay, R.D., 2001. Ascorbic acid increases the yield of dopaminergic neurons derived from basic fibroblast growth factor expanded mesencephalic precursors. *J. Neurochem.* 76, 307–311.
- Ye, W., Shimamura, K., Rubenstein, J.L., Hynes, M.A., Rosenthal, A., 1998. FGF and Shh signals control dopaminergic and serotonergic cell fate in the anterior neural plate. *Cell* 93, 755–766.
- Yun, K., Fischman, S., Johnson, J., Hrabec de Angelis, M., Weinmaster, G., Rubenstein, J.L., 2002. Modulation of the notch signaling by *Mash1* and *Dlx1/2* regulates sequential specification and differentiation of progenitor cell types in the subcortical telencephalon. *Development* 129, 5029–5040.

¹ Department of Molecular Neuro-pathology, Instituto de Fisiología Celular, and ²Department of Developmental Genetics and Molecular Physiology, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México.

*Corresponding authors: Luis Covarrubias, Magdalena Guerra-Crespo

Received January 21, 2014; accepted for publication July 23, 2014;

©AlphaMed Press

1066-5099/2014/\$30.00/0

This article has been accepted for publication and undergone full peer review but has not been through the copyediting, typesetting, pagination and proofreading process which may lead to differences between this version and the Version of Record. Please cite this article as doi: 10.1002/stem.1856

Mouse Embryonic Stem Cell-Derived Cells Reveal Niches that Support Neuronal Differentiation in the Adult Rat Brain

Guadalupe Maya-Espinosa¹, Omar Collazo-Navarrete¹, Diana Millán-Aldaco¹, Marcela Palomero-Rivero¹, Gilda Guerrero-Flores², René Drucker-Colín¹, Luis Covarrubias^{2,*}, Magdalena Guerra-Crespo^{1,*}

ABSTRACT

A neurogenic niche can be identified by the proliferation and differentiation of its naturally residing neural stem cells. However, it remains unclear whether 'silent' neurogenic niches or regions suitable for neural differentiation, other than the areas of active neurogenesis, exist in the adult brain. Embryoid body (EB) cells derived from embryonic stem cells (ESCs) are endowed with a high potential to respond to specification and neuralization signals of the embryo. Hence, to identify microenvironments in the postnatal and adult rat brain with the capacity to support neuronal differentiation, we transplanted dissociated EB cells to conventional neurogenic and non-neurogenic regions. Our results show a neuronal differentiation pattern of EB cells that was dependent on the host region. Efficient neuronal differentiation of EB cells occurred within an adjacent region to the rostral migratory stream. EB cell differentiation was initially patchy and progressed towards an even distribution along the graft by 15-21 days post-transplantation, giving rise mostly to GABAergic neurons. EB cells in the striatum displayed a lower level of neuronal differentiation and derived into a significant number of astrocytes. Remarkably, when EB cells were transplanted to the striatum of adult rats after a local ischemic stroke, increased number of neuroblasts and neurons were observed. Unexpectedly, we determined that the adult substantia nigra pars compacta, considered a non-neurogenic area, harbors a robust neurogenic environment. Therefore, neurally uncommitted cells derived from ESCs can detect regions that support neuronal differentiation within the adult brain, a fundamental step for the development of stem cell-based replacement therapies. *STEM CELLS* 2014; 00:000-000

INTRODUCTION

Neurogenic niches in the adult brain provide the cues for maintenance, proliferation and differentiation of neural stem cells (NSCs), such that different subtypes of neurons are generated in specific areas [1, 2]. Neurogenesis occurs throughout lifespan in two regions of the adult mammalian brain: the subgranular zone of the hippocampus, and the subventricular zone (SVZ) of the lateral ventricles (LV) and its prolonging rostral migratory stream (RMS) [3]. Furthermore, experimental evidence indicates that a brain injury can induces the proli-

feration of neural precursor cells (NPCs) of the SVZ and their migration towards the damaged neostriatum; this damage apparently allows differentiation with regional specificity of some arriving neuroblasts [4, 5]. Thus, neurogenesis in the adult brain is a continuous process in few areas, but could be regulated in other regions where alterations of the microenvironment might modify their capability to support neurogenesis.

Neurorepair through stem cell transplantation has been envisaged as a promising approach to treat the damaged central nervous system (CNS). Despite the extensive progress in the field, the cellular source most ap-

appropriate to restore neuronal losses remains uncertain. One option is to transplant the lacking neuron type, in which case, functional interactions with the host circuits are desirable rather than transplanted neurons acting only as a source of the deficient neurotransmitter [6, 7]. Alternatively, transplantation of NPCs may allow better interaction with the host as a result of *in situ* neuronal differentiation. However, transplantation of expanded NPCs commonly have shown astrocytic differentiation with little or no neuronal differentiation detected [8, 9]. Recent data suggest that this differentiation outcome is due to an intrinsic property of transplanted NPCs [10], leaving open the question: what is the permissiveness of the adult brain for specific differentiation? Embryonic stem cells (ESCs) have been considered suitable for neuronal replacement, because extrinsic and/or intrinsic signals can direct specific neuronal differentiation [6, 11-15]. Embryoid body (EB) cells derived from ESCs undergo neural differentiation in the adult brain but, presently, it is not clear whether this differentiation is dependent on the transplantation site, brain damage, or result from a default mechanism with little or no influence of the host environment [16, 17]. Our previous studies demonstrated that neurally uncommitted cells in EBs exhibit high neurogenic potential and the ability to differentiate according to the site of implantation in the embryo [18]. In the present study, we transplanted EB cells to known neurogenic and non-neurogenic sites of the postnatal rat brain, as well as to an adult brain site after injury. We demonstrated that EB-derived cells possess the ability of sensing environmental cues in the postnatal/adult rat brain that allow or induce neural differentiation.

MATERIALS AND METHODS

Embryonic stem cells culture

The mouse ESC line R1B5, which constitutively expresses the green fluorescent protein (GFP) (gift from Andras Nagy), was used for all studies. To produce EBs [18], ESCs were propagated on gelatin-coated culture plates with feeder cells in ESC medium (M15). Before aggregation, trypsin-dissociated cells were seeded on 10 cm feeder-free gelatin-coated dishes and cultured in M15 medium supplemented with 1000 U/ml of leukemia inhibitory factor (LIF; Chemicon) for 3 days. To form EBs, 2×10^6 ESCs were seeded in non-adherent 10 cm bacterial culture dishes and cultivated during 3.5-4 days without LIF. Subsequently, EBs were rinsed with M15, disaggregated with 1 ml of 0.25% trypsin and centrifuged at 1000 rpm for 3 minutes. Finally, the cells were suspended in 50 μ l of Optimem medium (Gibco) for implantation.

Animals

Animals were housed under standard colony conditions: 12:12 light/dark cycle, controlled room temperature (22 ± 1 °C) and *ad libitum* access to food and water. All stu-

dies were conducted according with principles and procedures approved by the local bioethical committee of the Universidad Nacional Autónoma de México.

Transient middle cerebral artery occlusion

To induce ischemia by the middle cerebral artery occlusion procedure (MCAO; [19]), an incision was made in the neck of animals anesthetized with xylazine (8 mg/kg) and ketamine (100 mg/kg) (Pisa Agropecuaria) and, subsequently, the external carotid, the left occipital artery and the left pterygopalatine artery were cauterized. Later, a 4-0 nylon monofilament suture with silicon (Docol Co.) was introduced via the left external carotid artery stump into the lumen of the internal carotid artery until occluded the middle cerebral artery. After 90 minutes, the suture was withdrawn and the wound closed. For sham control animals, the same surgery procedure took place, except that the suture was not inserted.

Cell transplantation

Male Wistar rats of 75 or 250 g corresponding to postnatal day (PD) 24 or adult rats, respectively, were used for transplantation procedures. Stereotaxic coordinates for substantia nigra pars compacta (SNpc) and striatum of adult rats were obtained from Paxinos and Watson [20], whereas coordinates for PD24 rats were determined as follows: For RMS-Ctx region, 1.8 rostral, -1.1 lateral to bregma, 3.5 ventral; for the striatum, 1.0 rostral, 3 lateral to bregma, 5.0 ventral. Animals were transplanted under ketamine-xylazine anesthesia (10 and 1 mg/kg respectively) by injection of ≈ 1 μ l of cell suspension (150,000 cells) using a 5 μ l Hamilton syringe. Data presented are from rats surviving transplantation, which proportion (around 50% of manipulated rats) was independent of the site tested; rats for each stage and region indicated that showed a significant number of grafted EB-derived cells were selected for further analysis and quantifications ("n" in Results). In these samples, a marked difference in host response to injury, including the inflammatory reaction against the transplant, among all sites tested was not observed (Supplementary Fig. S1).

Real-time RT-PCR procedures

Total RNA was extracted from EB cells with TRIzol® (Invitrogen) following the manufacturer's instructions. The purified RNA was used as template for cDNA synthesis using AMV Reverse Transcriptase (Invitrogen) and oligo-dT₁₆ primer. The qPCR reaction was performed with KAPA SYBR® FAST kit (KAPA Biosystems) in the Rotor-Gene 3000 thermocycler (Corbett Research). All oligonucleotides used are listed in Supplementary Table 1. To evaluate gene expression, a comparative Ct ($\Delta\Delta$ Ct) method was used.

Histological procedures and immunofluorescence

For post-transplantation analysis, rats were deeply anesthetized with pentobarbital and perfused intracardially with 100 ml of 0.1 M phosphate-buffered-saline (PBS) followed by 100 ml of 4% paraformaldehyde (PFA). Brains were post-fixed in 4% PFA and cryoprotected by sequential 24-h washes in 10%, 20% and 30% sucrose (in PBS). Afterward, brains were sliced with a cryostat at 40 μ m in coronal or sagittal plane and collected in PBS. Standard procedures for hematoxylin and eosin (H&E) staining and cell death detection (In Situ Cell Death Detection Kit; Roche) were performed for general characterization of tissues (see Supplementary Fig. S1 and S2). For immunofluorescence, brain slices were rinsed three times in PBS/0.3% Triton X-100, treated with 1X immuno DNA-Retriever in citrate buffer (Bio SB) at 65 $^{\circ}$ C for 30 min, washed three times and incubated with the primary antibodies (listed in Supplementary Table 2) in the blocking solution [0.1 M PBS/0.3% donkey serum (Gibco)/0.3% BSA (Sigma)] overnight at 4 $^{\circ}$ C. After rinsing in PBS, slices were incubated for 2 h at room temperature with the corresponding secondary antibody (listed in Supplementary Table 2). Finally, the sections were rinsed with PBS and the far-red emitting fluorescent DNA dye DRAQ5 (1:5000; Biostatus Limited) was added to the final rinse to counterstain cell nuclei. The tissue was mounted in Superfrost slides (Fisher Scientific) with Dako fluorescent mounting medium.

Microscopy and cell counting

We used images acquired in Olympus FV1000 or ZEISS LSM 510 confocal microscopes. For cell counting, 3 images in Z stack from the graft were obtained at 40X magnification. We used one brain slice from 3-6 different animals (corresponding to "n" rats in Results) to count each differentiation marker. GFP+/differentiation marker+ cells were counted manually using the image analysis software ImageJ or the one linked to the corresponding microscope used. In some instances, pseudo-colors were assigned to some signals to improve image appreciation. Data are presented as the average percentage \pm standard deviation.

RESULTS

Neuronal differentiation of EB cells transplanted to a neurogenic area of the postnatal brain

In order to determine whether the postnatal rat brain provides a favorable environment for neuronal differentiation, EB cells at a stage where they are not committed to become neural cells were transplanted. Most transplantation studies have used differentiated neurons or NPCs [8, 9], limiting the evaluation of microenvironment influence on cell differentiation. EB cells to be

transplanted expressed more than 30-fold higher levels of the epiblast marker *Fgf5* in comparison with undifferentiated ESC (Fig. 1A). The majority (at least 70%; Supplementary Fig. S3) of these EBs were not cavitated and composed of epiblastic cells, as indicated by the co-expression of *Oct4* and *Fgf5* (Fig. 1B). Importantly, we detected very low expression levels of neural marker genes in EBs as in ESCs (Fig. 1C), but expression of *Zfmx1b*, which has been associated with a preneuralization stage [21], increased up to 20-fold in EBs in comparison with ESC (Fig. 1C). Nonetheless, cells of EBs at this stage can differentiate into cell lineages of the three germ layers, and when cultured (within floating EBs) in a neural medium without growth factors did not differentiate into neural cells ([11, 18] and data not shown).

Dissociated EB cells were transplanted adjacent to the known neurogenic area covering the anterior region of the LV and the proximal RMS (Figure 1D). EB-derived cells were able to survive and initiate neural differentiation at the anterior LV (data not shown) as well as near the RMS with similar efficiency. In the latter region, the graft covered an area comprised between the RMS and the cortex (hereinafter referred as RMS-Ctx area) and the fate of the transplanted cells was analyzed in more detail. Very few and small group of cells throughout the graft at 6 days post-transplantation (dpt) were detected positive for the mitotic marker phospho-Histone-H3 (pHH3) (Figure 1E and Supplementary Fig. S4) and the pluripotency marker *Oct4* (Figure 1H), which number rapidly decreased at a later time (Figure 1E-J; Supplementary Fig. S4). These data indicate that, at least from 15 dpt, the majority of implanted EB-derived cells have reached the postmitotic stage and lost pluripotency, supporting that transplanted cells are undergoing differentiation and are not prompt to initiate tumorigenesis. Abundant cell death occurred at early stages (i.e., up to 3 dpt) around the graft and, then, only scattered apoptotic cells were found; interestingly, most dying cells detected were associated with the host (Supplementary Fig. S2).

At 6 dpt, most EB-derived cells were aggregated and showed round shape morphology (green cells in Figure 1E, H, K-M). At this early stage, a significant graft survival was observed (Supplementary Fig. S1 and S2) and a consistent (6 out of 6 successful transplantation events) high proportion of implanted cells became NPCs as indicated by the number of *Sox1+* cells (an estimate of at least 50%, n=6) (Figure 1K), but few cells were positive for Doublecortin (DCX), a marker of neuroblasts and immature neurons (Figure 1L,M). Initial interactions with the host environment was indicated by some patchy areas of cells, mostly positive for DCX, with leading processes on the border of the graft (Figure 1M). By 15 dpt, surviving implanted cells were observed throughout the graft with a more even distribution and differentiated morphology (Figure 2). Apparently, the proportion of *Sox1+* NPCs was reduced (26.56 \pm 5.22% of grafted cells, n=6; Figure 2A,I), whereas the number of

cells immunoreactive for DCX markedly increased ($59.55 \pm 12.22\%$ of grafted cells, $n=6$; Figure 2B,I). Notably, many implanted cells already reached neuronal maturity as demonstrated by their NeuN nucleus staining ($33.98 \pm 4.89\%$ of grafted cells, $n=6$; Figure 2C,I). These data indicate that 15 dpt was sufficient for most of the surviving EB-derived cells to get committed into the neural phenotype within the postnatal brain environment, though many cells were still in transition to become terminal differentiated neurons. We also noted that many GFP-/DCX+ cells intermingled throughout the graft at 15 dpt (Figure 2J); the origin of these GFP-/DCX+ cells needs further investigation. Only occasionally, DCX+/GFP+ cells acquiring a similar shape and chain migration alignment of endogenous neuroblasts migrating towards the olfactory bulb (OB) were observed (Figure 2K).

At 21 dpt, the majority of the EB-derived cells displayed leading processes, in contrast with the characteristic spherical shape of cells at the initial post-transplant phases. Concomitantly, the number of Sox1+ ($25.76 \pm 5.94\%$, $n=6$; Figure 2E) and DCX+ ($52.82 \pm 11.85\%$, $n=6$; Figure 2F) cells remained within a similar proportion compared to that determined a week earlier, but an increase in NeuN+ grafted cells ($44.73 \pm 9.98\%$, $n=6$; Figure 2G) was detected. Importantly, while at 15 dpt scarce grafted cells displayed the glial phenotype indicated by the expression of the glial fibrillary acidic protein (GFAP; Figure 2D), the number of these cells clearly increased ($12.48 \pm 11.42\%$, $n=6$; Figure 2H) at 21 dpt. The number of cells with the neuronal differentiation markers, DCX and NeuN, at both time points analyzed appeared relatively consistent throughout the graft (Figure 2). Since Sox1 and NeuN are non-overlapping markers, it is estimated that at least 70% of EB-derived cells have acquired a neural phenotype; among those, most cells are undergoing neuronal differentiation. All these data together suggest that the RMS-Ctx area of the postnatal brain is permissive and possibly instructive for neuronal and glial differentiation, though neuronal appears to be the favored fate.

Interneuronal fate of EB cells transplanted to the RMS-Ctx

Around 50% of grafted cells reached the neuronal fate 3 weeks after transplantation; thus, we decided to analyze whether these EB-derived neurons showed any specific phenotype. We were particularly interested in the neuronal fates typical of neuroblasts of the SVZ/RMS, which provide most of the periglomerular neurons (PGN) forming the glomerular layer of the OB [22]. The major phenotype found in PGN cells is the GABAergic, which can be detected by the presence of the GABA synthesizing enzyme GAD67. Moreover, distinct GABAergic interneuronal subpopulations differentially express tyrosine hydroxylase (TH), a marker of dopaminergic neurons, and two calcium-binding proteins, calretinin (Calr) and calbindin (Calb) [23]. Three-weeks after transplantation, $33.71 \pm 10.61\%$ of cells were

GAD67+ ($n=6$; Figure 3A,F). Among the implanted cells, $11.41 \pm 4.99\%$ and $14.06 \pm 5.89\%$ were TH+ and Calr+, respectively ($n=6$; Figure 3B,D,F), whereas Calb+ cells were consistently detected throughout the graft but in a low proportion (Figure 3E). In addition, $12.48 \pm 5.8\%$ of differentiated EB cells were 5HT+ serotonergic neurons ($n=6$; Figure 3C,F). The groups of GABAergic cells or any other analyzed phenotype appeared distributed throughout the transplant and were not confined to a particular region (e.g., close or far from the RMS). Therefore, although some neurons (near 40-60%) derived from the transplanted EB cells shared markers with those generated during postnatal neurogenesis in the RMS pathway, the terminal phenotypes that can arise appeared to be wider.

The differentiation into specific neuron types is determined by transcription factors that specify NSCs into particular lineages. In order to distinguish among the large diversity of interneuron subtypes existing in the adult brain, we estimated their putative lineage identity by detecting markers before terminal differentiation, particularly those present in precursors of OB subtypes. Pax6 in cooperation with Dlx2 specify the dopaminergic identity of PGN in the adult OB [22, 24]; during differentiation, the majority of DCX+ neuroblasts of the PGN lineage express Dlx2+. A substantial proportion of transplanted cells were detected with the PanDlx antibody [25] at 6 dpt (Figure 4A), but afterwards, grafted cells were rarely positive for any Dlx protein ($n=6$; Figure 4B,C). On the other hand, transplanted cells occasionally expressed Pax6 since early-stages of EB cell differentiation ($n=6$; Figure 4D-F). We analyzed also the expression of Trb1, a T-box transcriptional factor found in GAD67- and Dlx- postmitotic neuroblasts of the proximal RMS that derive into OB glutamatergic neurons [24]. The scarce number of Trb1+ cells observed indicates that grafted cells did not acquire the glutamatergic neuron identity (data not shown). Therefore, apparently, most EB-derived cells acquire an interneuronal GABAergic phenotype that is not specific of the RMS-OB system, suggesting that the RMS-Ctx area encloses neurogenic cues but lacks signals favoring EB cell specification within a particular lineage.

Neuronal differentiation of EB cells in a non-neurogenic region of the postnatal brain

In order to determine whether survival and neural differentiation pattern of EB cells in the postnatal brain occurs regardless of the graft region, we assessed the fate of transplanted EB cells in the postnatal striatum, a considered non-neurogenic region. In general, neural differentiation in this area was uneven throughout the graft and variable among transplanted animals (Supplementary Table 3). At 15 dpt, only some areas of the graft showed a significant proportion of GFP+ cells expressing Sox1 or DCX ($n=4$), which remained low by 21 dpt, except for an apparent discrete increase in DCX+ cells ($n=4$; Figure 5A-B, E-F and Supplementary Table 2). Of note is that NeuN was rarely detected at 15 dpt but, at

21 dpt, NeuN+ cells were evident but only in few areas throughout the graft (n=4; Figure 5C,G and Supplementary Table 3). Remarkably, some patches of transplanted cells expressing GFAP were observed since 15 dpt, and the proportion of GFAP+ cells reached up to 50% in patches at 21 dpt (n=4; Figure 5D,H and Supplementary Table 3), indicating efficient EB cell differentiation into astrocytes, a fate that was rare in cells grafted in the RMS-Ctx region. Together, our data indicate that the postnatal striatum appears to be a less favorable region for neuronal differentiation and, in contrast to the RMS-Ctx area, is more permissive and/or instructive for astrocyte differentiation.

Given that neurogenic conditions might be associated with juvenile brains, we were prompted to determine whether EB cells are also able to detect microenvironments permissive for neuronal differentiation in the adult rat brain. We used MCAO lesion model to assess whether EB cells can sense the transition of the striatum, from the poor neurogenic condition observed in the undamaged brain (Figure 5), to a potentially neurogenic condition after injury [4, 5]. Interestingly, transplantation at the sub-acute phase of injury (8 days after the MCAO) gave rise to a proportion of grafted EB cells with Sox1 or DCX neural markers. At 15 dpt, although fewer than in brains of rats at the early postnatal age tested, the proportion of Sox1+ cells reached $39 \pm 4.6\%$ (n=3; Figure 6A,E,I), whereas that of DCX+ cells increased up to $45 \pm 5.23\%$ (n=3; Figure 6B,I); the latter contrast with the $3.9 \pm 0.36\%$ observed in the non-damaged striatum (n=3; Figure 6F,I). NeuN was detected in $12 \pm 6.1\%$ of grafted cells at 15 dpt (n=3; Figure 6C,I), whereas in the intact striatum very few NeuN+ cells were found (Figure 6G). Additionally, EB-derived GFAP+ cells in the injured striatum were detected in a similar proportion (1-3%) when compared to grafts in the intact striatum (Figure 5D and H). Therefore, it appears that injury promotes the onset of a condition that favors neurogenesis and EB cells can detect this transition. Noteworthy, in the normal or damaged-adult striatum no GAD67+ cells were detected, suggesting that differentiation into this phenotype might be regulated/facilitated by the RMS-Ctx microenvironment.

Differentiation of EB cells in the adult SNpc

Taken into account that the incidence of neurogenesis in the adult SNpc has been detected at a very low level *in vivo* [26], but putative resident NPCs with neurogenic potential have been detected *in vitro* [27], we were interested in using EB cells to detect whether the environment in this region prevents neurogenesis. Strikingly, when EB cells were transplanted to the SNpc, many cells survived and distributed all along the graft (Figure 7). In contrast to the striatum, at 6 dpt, small cell clusters expressed Sox1 (n=3; Figure 7A) and $32 \pm 1.9\%$ of grafted EB cells were DCX+ (n=5; Figure 7B,M). This latter percentage increased significantly up to $64 \pm 2.1\%$ at 15 dpt (n=5; Figure 7F,M), decreasing 15 days later (i.e.,

30 dpt) to less than 10% ($9 \pm 0.35\%$, n=5; Figure 7M). Terminal neuronal differentiation appeared to be delayed when compared with their emergence in grafts in the RMS-Ctx region of the early postnatal brain, since only few NeuN+ neurons were detected at 15 dpt (Figure 7C,G), and the number markedly increased up to $43 \pm 3.3\%$ of total grafted cells at 30 dpt (n=5; Figure 7L,M). In agreement with reduced glial differentiation, GFAP+ cells were not detected at 6 or 15 dpt (Figure 7D,H). Among the neurons derived from EB cells in this region, some were positive for calretinin (Figure 7I) but none expressed TH (Figure 7K) or GAD67 (Figure 7J). Therefore, the adult SNpc behaves as a neurogenic niche with very low activity.

DISCUSSION

The discovery of neurogenesis in the mammalian adult brain has held relevant implications in normal physiology, but also widened the limits that were considered for a long time restrict neuronal regeneration. The presence of NSCs is a sign of regions with the ability to carry out neurogenesis; this correlation applies to two specific regions of the adult brain, but no definitive evidence has been provided that discarded other potential neurogenic areas [28]. In the present study, we investigated regions of the adult rat brain that supported neuronal differentiation of EB cells. Our major findings indicate that neurally uncommitted EB cells can differentiate into glia, neural precursors and neurons in the postnatal and adult rat brain, not only in a well-defined neurogenic domain, but also in regions that are not considered typically neurogenic. Furthermore, we confirmed the lack of specification signals in the adult brain suggesting that specific neurogenesis requires pre-specified NSCs. Our findings show that neurogenesis in the adult brain may not be limited exclusively by the presence of NSC but also by the availability of a proper neurogenic environment.

Neuralization and neurogenesis of naïve stem cells

The fate of putative NPCs in the adult brain observed in several studies [29] is likely due to their intrinsic properties. In an interesting study, embryonic neuronal- and glial-restricted NPCs transplanted to the adult striatum and spinal cord differentiate and show long-term survival in the absence of an immunosuppressant [30]. In another example, NPCs expanded as neurospheres, which are prompted to become astrocytes within an embryonic neurogenic environment [10], also favor this fate in the adult brain [8, 9]. Therefore, evaluation of a milieu suitable for neurogenesis in the adult brain requires the use of uncommitted NPCs with strong neurogenic potential whose fate depends on extrinsic signals. EB cells appear to convey this requirement since transplanted cells in neurogenic environments of the embryo [18] or of the postnatal and adult brain (this study) give

rise to a high proportion (up to 70%) of neurons and neuronal precursors with a discrete proportion of astrocytes produced.

Neuronal differentiation in our postnatal conditions was a progressive process. Our data suggest that cell proliferation is not required for EB cell differentiation, but selective cell survival shortly after transplantation could contribute to the high neuralization efficiency. However, our previous transplant-explant experiments rather favor efficient responsiveness to neuralizing factors of competent EB cells [18]. The emergence of neural markers in transplanted cells suggests differentiation from neurally uncommitted ectodermal cells (Oct4+/Fgf5+) up to becoming mature neurons (NeuN+). Only few putative astrocytes (GFAP+ cells) were detected, thus, neuronal differentiation is the preferred fate of EB cells under the influence of neurogenic areas of the postnatal brain.

The sequence of appearance of neural markers determined here in differentiating transplanted EB cells did not resemble the features found in recent reports where cell fusion between grafted NPCs and specific hippocampal, striatal or cortical mature neurons has been proposed as the origin of neurons [31, 32]. In particular, instead of a gradual appearance of neuronal markers expected from cell differentiation, the terminal phenotype was detected as early as 6 dpt in the adult rodent brain. Additionally, the fact that neuron types detected (see below) did not correspond to those present at the transplantation site is not in agreement with cell fusion. Nonetheless, our experiments did not rule out the possibility of spontaneous cell fusion events that, at low frequency, contributed to the number of neurons and neuroblasts obtained from EB cells.

Non-site-specific neuronal differentiation of transplanted EB cells

In the past, it has been difficult to demonstrate site-specific differentiation of NSCs after grafting in the adult brain due to the lack of proven cells with a wide differentiation potential. Neuronal specific differentiation depends on signals that instruct precursor cells to follow a particular lineage, and signals that promote differentiation itself. EB cells are competent to respond to specification signals [18] and, therefore, the surrounding environment of the adult brain could guide their neuronal fate. The neuronal phenotype of differentiated EB cells in the RMS-Ctx region was coincident with the possibility of differentiation into the major subtypes of OB interneurons. However, cells transplanted next to the RMS only occasionally appeared attracted towards this structure, which contrast with the migration through the RMS and integration into the OB of cells from the embryonic lateral ganglionic eminence when grafted alongside the postnatal SVZ [33]. In addition, we found only few cells expressing a *Dlx* gene or *Pax6*, genes required for the generation of OB interneurons. Therefore, EB cells can sense neurogenic cues present in the postnatal brain, but the RMS-Ctx region is

not providing the instructive signals needed for NPCs specification. The lack of specification signals in the adult brain is not unexpected since most somatic stem cells behave as committed and, thus, do not require the specification signals present in the embryo to differentiate into specific cell types [33-35]. The higher proportion of GABAergic neurons in comparison with other neuronal phenotypes suggests that the RMS-Ctx environment is more suitable for EB cells to reach certain fates. We have not observed the same set of phenotypes or proportion of them in neurons derived from EB cells grafted in other areas of the postnatal brain, supporting the idea that EB cells have no bias to particular neuronal fates.

Neuronal differentiation in non-neurogenic areas of the adult brain

Presently, there is no doubt that the adult brain can produce neurons *de novo*, but the limits of this capacity are not defined yet. The postnatal age or environmental/physiological conditions could influence the neurogenic capacity of certain brain areas. In addition, it remains to be determined the repair capacity of the brain upon damage. In the postnatal striatum, the low number of neuroblasts (DCX+) disposed in some patches throughout the graft correlates with the few neurons (NeuN+) found, which considerably differs from the proportions of these cells determined in the RMS-Ctx region. Concurrently, a relatively high level of EB-derived GFAP+ cells was determined from the earliest post-transplant stage, and the progressive increase observed in these putative astrocytes was exclusive for this postnatal zone. Together, these results suggest that the postnatal striatum promotes astrocytic differentiation of EB cells, probably at the expense of neuronal differentiation.

In contrast with the striatum of a young brain, very few cells expressing neural markers were found in the adult striatum, indicating that conditions are not appropriate for neural differentiation. Interestingly, this differentiation pattern was drastically reversed after the MCAO treatment and now EB cells gave rise to some GFAP+ cells and many NeuN+ neurons, among which, few were TH+. These data suggest that, at least in the striatum, an ischemic damage generates an environment that promotes neuronal differentiation of EB cells and probably, also, of endogenous NPCs attracted to the injured region. Our results differ from those previously reported showing that EB cells transplanted to normal [16] or Parkinson's Disease (PD) damaged striatum [17] of immunosuppressed rats spontaneously differentiate into dopaminergic and serotonergic neurons. The results shown here were in the absence of immunosuppressants and, consequently, our transplantation experiments required more cells than in those reports. It is apparent that, under our conditions, resident factors in the adult brain influenced the final differentiation outcome, though we cannot discard the participation of factors from transplanted EB cells. Therefore, our data

suggest that EB cells can sense environmental changes after a brain injury, which improves the capacity to promote neurogenesis.

The ability of EB cells to differentiate into mature neurons in the intact SNpc was unexpected and intriguing. *In vivo* neurogenesis is controversial in this brain structure [26, 27]. In those studies that support neurogenesis in the SNpc, very few new neurons appears to be produced in both normal and PD brains, although putative NSCs after culture are able to differentiate into neuron-like cells in the hippocampus but not in the SNpc. Our results support that the SNpc holds a "silent" neurogenic niche, though remains to be conclusively determined whether NPCs exist and the conditions at which are activated to produce new neurons.

CONCLUSION

The efficient neurogenesis in the vicinity of the RMS-Ctx region is a proof of principle that EB cells can sense neurogenic areas in the adult brain. Under this basis we demonstrated that EB cell differentiation is dependent on the host brain region but modified upon injury. Our work contributes to the understanding of the mechanisms that control neurogenesis in the adult brain by showing that there is no direct correlation between the regions with high content of NSCs and those supporting neurogenesis. The development of proper cell therapies for the treatment of CNS diseases will depend, not only in identifying the right cell population to transplant, but also the right conditions in the host brain such that promote its specific differentiation and/or survival. The present work is one step in that direction.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank to Dr. Arturo Alvarez-Buylla and José Segovia for their critical comments and reading of the manuscript. We are grateful to Dr. Y.M. Morozov and P. Rakic at Yale University School of Medicine for the generous gift of the Dlx antibody. We are also grateful to Claudia Rivera (and her animal facility staff), Andres Saralegui (confocal microscopy), Ana Maria Escalante and Francisco Perez-Eugenio (computer facility) for their technical assistance along the present work. This study was performed in partial fulfillment of the requirements for the Ph.D. degree in Biomedical Sciences of Maya-Espinosa G. at UNAM, who received a fellowship from CONACyT (#228016). This work was supported by CONACyT grant 131031 and IMPULSA 02 to L. Covarrubias, by UNAM-DGAPA-PAPIIT grants IB202112-RR282112 to M. Guerra and IN204612 to R. Drucker, and by ICyTDF/170/2012 to M. Guerra.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

G.M.-E.: Collection and assembly of data, data analysis and interpretation, manuscript writing, O.C.-N.: Collection and assembly of data, D.M.-A.: Collection and assembly of data, M.P.-R.: Collection and assembly of data, G.G.-F.: Collection and assembly of data, R.D.-C.: Conception and design, manuscript writing, L.C.: Conception and design, data analysis and interpretation, manuscript writing, M.G.-C.: Conception and design, collection and assembly of data, data analysis and interpretation, manuscript writing

REFERENCES

- Mu Y, Lee SW, Gage FH. Signaling in adult neurogenesis. **CURRENT OPINION IN NEUROBIOLOGY** 2010;20(4):416–423.
- Alvarez-Buylla A, Lim DA. For the long run: maintaining germinal niches in the adult brain. **NEURON** 2004;41(5):683–686.
- Gritti A, Bonfanti L, Doetsch F, et al. Multipotent neural stem cells reside into the rostral extension and olfactory bulb of adult rodents. **JOURNAL OF NEUROSCIENCE** 2002;22(2):437–445.
- Arvidsson A, Collin T, Kirik D, et al. Neuronal replacement from endogenous precursors in the adult brain after stroke. **NATURE MEDICINE** 2002;8(9):963–970.
- Parent JM, Vexler ZS, Gong C, et al. Rat forebrain neurogenesis and striatal neuron replacement after focal stroke. **ANN. NEUROL.** 2002;52(6):802–813.
- Kim J-H, Auerbach JM, Rodríguez-Gómez JA, et al. Dopamine neurons derived from embryonic stem cells function in an animal model of Parkinson's disease. **NATURE** 2002;418(6893):50–56.
- O'Keefe FE, Scott SA, Tyers P, et al. Induction of A9 dopaminergic neurons from neural stem cells improves motor function in an animal model of Parkinson's disease. **BRAIN** 2008;131(Pt 3):630–641.
- Herrera DG, García-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. Adult-derived neural precursors transplanted into multiple regions in the adult brain. **ANN. NEUROL.** 1999;46(6):867–877.
- Barraud P, Thompson L, Kirik D, et al. Isolation and characterization of neural precursor cells from the Sox1-GFP reporter mouse. **EUR. J. NEUROSCI.** 2005;22(7):1555–1569.
- Baizabal J-M, Cano-Martínez A, Valencia C, et al. Glial commitment of mesencephalic neural precursor cells expanded as neurospheres precludes their engagement in niche-dependent dopaminergic neurogenesis. **STEM CELLS AND DEVELOPMENT** 2012;21(7):1047–1058.
- Wichterle H, Lieberam I, Porter JA, et al. Directed differentiation of embryonic stem cells into motor neurons. **CELL** 2002;110(3):385–397.
- Bibel M, Richter J, Schrenk K, et al. Differentiation of mouse embryonic stem cells into a defined neuronal lineage. **NAT NEUROSCI** 2004;7(9):1003–1009.
- Friling S, Andersson E, Thompson LH, et al. Efficient production of mesencephalic dopamine neurons by Lmx1a expression in embryonic stem cells. **PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES** 2009;106(18):7613–7618.
- Kirkeby A, Grealish S, Wolf DA, et al. Generation of regionally specified neural progenitors and functional neurons from human embryonic stem cells under defined conditions. **CELLREPORTS** 2012;1(6):703–714.
- Ma L, Hu B, Liu Y, et al. Human embryonic stem cell-derived GABA neurons correct locomotion deficits in quinolinic acid-lesioned mice. **CELL STEM CELL** 2012;10(4):455–464.
- Deacon T, Dinsmore J, Costantini LC, et al. Blastula-stage stem cells can differentiate into dopaminergic and serotonergic neurons after transplantation. **EXPERIMENTAL NEUROLOGY** 1998;149(1):28–41.
- Bjorklund LM, Sanchez-Pernaute R, Chung S, et al. Embryonic stem cells develop into functional dopaminergic neurons after transplantation in a Parkinson rat model.

- PROC. NATL. ACAD. SCI. U.S.A.** 2002;99(4):2344–2349.
- 18 Baizabal J-M, Covarrubias L. The embryonic midbrain directs neuronal specification of embryonic stem cells at early stages of differentiation. **DEVELOPMENTAL BIOLOGY** 2009;325(1):49–59.
- 19 Guerra-Crespo M, Gleason D, Sistos A, et al. Transforming growth factor- α induces neurogenesis and behavioral improvement in a chronic stroke model. **NEUROSCIENCE** 2009;160(2):470–483.
- 20 Paxinos G, Watson C, EBSCOhost. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. 5 ed. Amsterdam; Boston: Elsevier Academic Press; 2005.
- 21 Dang LTH, Wong L, Tropepe V. Zfx1b induces a definitive neural stem cell fate in mouse embryonic stem cells. **STEM CELLS AND DEVELOPMENT** 2012;21(15):2838–2851.
- 22 Hack MA, Saghatelian A, de Chevigny A, et al. Neuronal fate determinants of adult olfactory bulb neurogenesis. **NAT NEUROSCI** 2005.
- 23 Kosaka K, Toida K, Aika Y, et al. How simple is the organization of the olfactory glomerulus?: the heterogeneity of so-called periglomerular cells. **NEUROSCIENCE RESEARCH** 1998;30(2):101–110.
- 24 Brill MS, Snaypan M, Wohlfrom H, et al. A *dlx2*- and *pax6*-dependent transcriptional code for periglomerular neuron specification in the adult olfactory bulb. **JOURNAL OF NEUROSCIENCE** 2008;28(25):6439–6452.
- 25 Morozov YM, Torii M, Rakic P. Origin, early commitment, migratory routes, and destination of cannabinoid type 1 receptor-containing interneurons. **CEREB. CORTEX** 2009;19 Suppl 1:i78–89.
- 26 Zhao M, Momma S, Delfani K, et al. Evidence for neurogenesis in the adult mammalian substantia nigra. **PROC. NATL. ACAD. SCI. U.S.A.** 2003;100(13):7925–7930.
- 27 Lie DC, Dziejczapolski G, Willhoite AR, et al. The adult substantia nigra contains progenitor cells with neurogenic potential. **JOURNAL OF NEUROSCIENCE** 2002;22(15):6639–6649.
- 28 Gould E. How widespread is adult neurogenesis in mammals? **NAT REV NEUROSCI** 2007;8(6):481–488.
- 29 Fisher LJ. Neural precursor cells: applications for the study and repair of the central nervous system. **NEUROBIOL. DIS.** 1997;4(1):1–22.
- 30 Lepore AC, Neuhuber B, Connors TM, et al. Long-term fate of neural precursor cells following transplantation into developing and adult CNS. **NEUROSCIENCE** 2006;139(2):513–530.
- 31 Brilli E, Reitano E, Conti L, et al. Neural Stem Cells Engrafted in the Adult Brain Fuse with Endogenous Neurons. **STEM CELLS AND DEVELOPMENT** 2013;22(4):538–547.
- 32 Cusulin C, Monni E, Ahlenius H, et al. Embryonic stem cell-derived neural stem cells fuse with microglia and mature neurons. **STEM CELLS** 2012;30(12):2657–2671.
- 33 Kohwi M, Petryniak MA, Long JE, et al. A Subpopulation of Olfactory Bulb GABAergic Interneurons Is Derived from *Emx1*- and *Dlx5/6*-Expressing Progenitors. **JOURNAL OF NEUROSCIENCE** 2007;27(26):6878–6891.
- 34 De Marchis S, Bovetti S, Carletti B, et al. Generation of Distinct Types of Periglomerular Olfactory Bulb Interneurons during Development and in Adult Mice: Implication for Intrinsic Properties of the Subventricular Zone Progenitor Population. **JOURNAL OF NEUROSCIENCE** 2007;27(3):657–664.
- 35 Wagers AJ, Weissman IL. Plasticity of adult stem cells. **CELL** 2004;116(5):639–648.



See www.StemCells.com for supporting information available online. STEM CELLS ; 00:000–000