



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**“DETERMINACION DE LA CAPACIDAD
REGENERATIVA DEL MESENCEFALO
EMBRIONARIO”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A:

CARLOS RODRIGO OSORNO HERNANDEZ

TUTOR:

DR. LUIS FERNANDO COVARRUBIAS ROBLES



2007



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

FACULTAD DE CIENCIAS

División de Estudios Profesionales



ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ
Jefe de la División de Estudios Profesionales
Facultad de Ciencias
P r e s e n t e .

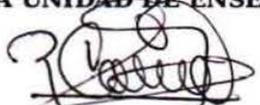
Por este medio hacemos de su conocimiento que hemos revisado el trabajo escrito titulado:

"Determinación de la capacidad regenerativa del mesencéfalo embrionario"

realizado por **Osorno Hernández Carlos Rodrigo**, con número de cuenta **401110115** quien opta por titularse en la opción de **Tesis** en la licenciatura en **Biología**. Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

- | | | | |
|-------------------------|--------|----------------------------------|---|
| Propietario | Dr. | Manuel Miranda Anaya |  |
| Propietario | Dr. | Jean Louis Charly Casalonga |  |
| Tutor(a) Propietario | Dr. | Luis Fernando Covarrubias Robles |  |
| Suplente | Dra. | Susana Castro Obregón |  |
| Suplente | Q.F.B. | José Manuel Baizabal Carballo |  |

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Ciudad Univeritaria, D. F., a 22 de mayo del 2007
COORDINADOR DE LA UNIDAD DE ENSEÑANZA DE BIOLOGÍA


DR. ZENON CANO SANTANA



Señor sinodal: antes de firmar este documento, solicite al estudiante que le muestre la versión digital de su trabajo y verifique que la misma incluya todas las observaciones y correcciones que usted hizo sobre el mismo.

| | |
|--|--|
| 1. Datos del alumno Apellido paterno Apellido materno Nombre(s) Teléfono Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de Ciencias Carrera Número de cuenta | 1. Datos del alumno Osorno Hernández Carlos Rodrigo 56885849 Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de Ciencias Biología 401110115 |
| 2. Datos del tutor Grado Nombre(s) Apellido paterno Apellido materno | 2. Datos del tutor Dr. Luis Fernando Covarrubias Robles |
| 3. Datos del sinodal 1 Grado Nombre(s) Apellido paterno Apellido materno | 3. Datos del sinodal 1 Dr Manuel Miranda Anaya |
| 4. Datos del sinodal 2 Grado Nombre(s) Apellido paterno Apellido materno | 4. Datos del sinodal 2 Dr Jean Louis Charly Casalonga |
| 5. Datos del sinodal 3 Grado Nombre(s) Apellido paterno Apellido materno | 5. Datos del sinodal 3 Dra Susana Castro Obregón |
| 6. Datos del sinodal 4 Grado Nombre(s) Apellido paterno Apellido materno | 6. Datos del sinodal 4 Q.F.B. José Manuel Baizabal Carballo |
| 7. Datos del trabajo escrito. Título Subtítulo Número de páginas Año | 7. Datos del trabajo escrito Determinación de la capacidad regenerativa del mesencéfalo embrionario Ninguno 2007 |

| INDICE | PAGINA |
|---|---------------|
| Lista de abreviaturas | 5 |
| Introducción | 6 |
| I. Proceso Regenerativo..... | 6 |
| II. Células troncales y regeneración del sistema nervioso central..... | 8 |
| III. Enfermedad del Parkinson..... | 15 |
| IV. Desarrollo del tubo neural..... | 15 |
| 4.1 Especificación del eje antero-posterior..... | 16 |
| 4.2 Especificación del eje dorso-ventral..... | 17 |
| V. Frontera mesencéfalo-metencéfalo: Organizador Istmico..... | 18 |
| VI. Neuronas dopaminérgicas del cerebro medio..... | 21 |
| 6.1 Especificación del linaje dopaminérgico..... | 23 |
| 6.2 Diferenciación post-mitótica..... | 26 |
| Antecedentes | 30 |
| VI. Cultivos de explantes..... | 30 |
| VII. 1-metil-4-fenilpiridina (MPP ⁺)..... | 30 |
| Justificación | 34 |
| Hipótesis | 35 |
| Objetivos | 35 |
| Materiales y métodos | 36 |
| VIII. Disección de embriones de E10 de ratón y cultivo de explantes..... | 36 |
| IX. Tratamientos con BrdU..... | 37 |
| X. Tratamientos con MPP ⁺ | 38 |
| XI. Fijación de los tejidos..... | 38 |
| XII. Cortes en el Crióstato..... | 39 |
| XIII. Inmunohistoquímica..... | 40 |
| XIV. TUNEL (Tdt-mediated dUTP nickend labeling)..... | 42 |
| XV. Análisis de resultados..... | 42 |
| Resultados | 43 |
| XVI. Selección de la concentración de MPP ⁺ | 43 |
| XVII. Degeneración de las neuronas dopaminérgicas..... | 45 |
| XVIII. Especificidad de la neurotoxina..... | 47 |
| XIX. Respuesta del mesencéfalo ante el tratamiento con MPP ⁺ | 49 |
| XX. La incorporación de BrdU no es resultado de la reparación del ADN..... | 52 |
| XXI. Proliferación de los precursores neurales..... | 54 |
| XXII. Proliferación de los precursores dopaminérgicos..... | 57 |

| | |
|---|----|
| Discusión | 59 |
| XXIII. Selección de la concentración de MPP ⁺ | 59 |
| XXIV. Degeneración de las neuronas dopaminérgicas..... | 59 |
| XXV. Especificidad de la neurotoxina..... | 60 |
| XXVI. Respuesta del mesencéfalo ante el tratamiento con MPP ⁺ | 61 |
| XXVII. La incorporación de BrdU no es resultado de la reparación del ADN..... | 63 |
| XXVIII.Proliferación de los precursores neurales..... | 64 |
| XXIX. Proliferación de los precursores dopaminérgicos..... | 64 |
| Conclusiones | 66 |
| XXX. Selección de la concentración de MPP ⁺ | 66 |
| XXXI. Degeneración de las neuronas dopaminérgicas..... | 66 |
| XXXII. Especificidad de la neurotoxina..... | 66 |
| XXXIII.Respuesta del mesencéfalo ante el tratamiento con MPP ⁺ | 66 |
| XXXIV. La incorporación de BrdU no es resultado de la reparación del ADN..... | 66 |
| XXXV.Proliferación de los precursores neurales..... | 67 |
| XXXVI.Proliferación de los precursores dopaminérgicos..... | 67 |
| Perspectivas | 68 |
| XXXVII.Efecto de la neurotoxina sobre la población dopaminérgica..... | 68 |
| XXXVIII.Caracterización del proceso regenerativo..... | 68 |
| XXXIX.Tratamiento de la enfermedad de Parkinson..... | 69 |
| Referencias | 71 |

LISTA DE ABREVIATURAS

AIF, Factor inductor de apoptosis
Aldh 1, Aldehído deshidrogenasa 1
A-P, eje antero-posterior
AR, ácido retinóico
Bax, proteína-X asociada a Bcl-2
Bcl-2, Linfoma-2 de las células-B
BMPs, “bone morphogenetic proteins”
BrdU, Bromodeoxiuridina
CNA, Cresta neural anterior
DA, dopamine
DAérgica, dopaminérgica
DAT, transportador de dopamina
DOPA, dihidroxifenilalanina
D-V, eje dorso-ventral
En, “engrailed”
ES, células troncales embrionarias
Fgfs, factores de crecimiento fibroblásticos
Gbx2, “gastrulation brain homologue-2”
GDNF, Glial-cell-derived neurotrophic factor
IsO, Organizador Istmico
JNK, “c-Jun amino-terminal kinase”
Mes, mesencéfalo
Mes-Met, frontera mesencéfalo-metencéfalo
Met, metencéfalo
MPP+, 1-metil-4-fenilpiridina
Msx1, “homeo box, msh-like 1”
Neu-N, neurofilamento
Nurr1, receptor nuclear huérfano 1
Otx2, “orthodenticle homologue 2”
Pax, “paired box”
Pitx3, “Paired-Like Homeodomain Transcription Factor 3”
Ptx1, “pituitary homeobox 1”
RA, ácido retinóico
ROS, especies reactivas de oxígeno
SNC, sistema nervioso central
SN, Substancia nigra
Shh, “sonic hedgehog”
Tgf-β, factor de crecimiento transformante-β
TH, tirosina hidroxilasa
Tub-βIII, tubulina-β-III
TUNEL, Tdt-mediated dUTP nickend labeling

INTRODUCCION

Proceso regenerativo

El proceso de regeneración fue reportado por primera vez por Spallanzani en 1768, autor que realizó estudios de regeneración de extremidades en el grupo de los Urodelos. *"La regeneración es un proceso que consiste en la reactivación del desarrollo en una etapa posterior a la embrionaria para restituir tejidos dañados o perdidos"* (Gilbert, 2003). Existen cuatro tipos de mecanismos por los cuales se puede llevar a cabo el proceso de regeneración. El primero es el observado en la regeneración de extremidades de los anfibios y consiste en la desdiferenciación celular. Este evento consiste en la regresión de un estado celular diferenciado a un estado con menor grado de diferenciación. Durante este proceso las células pierden los rasgos característicos de la diferenciación terminal, se reactiva el ciclo celular y finalmente las células vuelven a diferenciarse (Tanaka, 2003). Morgan (1907) denominó a este tipo de regeneración como **epimorfosis**. El segundo mecanismo por el cual se puede llevar a cabo el proceso de regeneración consiste en que las células diferenciadas comienzan a dividirse, pero mantienen su estado de diferenciación. Este tipo de regeneración es característico del hígado de los mamíferos y se ha denominado como **regeneración compensatoria**. El tercer mecanismo consiste en que las células del organismo mantienen su plasticidad, y la regeneración se lleva a cabo por una redistribución funcional del tejido presente. Este tipo de regeneración se ha denominado como **morfolaxis** y es característico de la hidra. El cuarto mecanismo se basa en la diferenciación de una célula hacia otro linaje distinto al de su origen. Este proceso se ha denominado como **transdiferenciación**. Un buen ejemplo de esto se puede observar en el proceso de regeneración de la cola de la salamandra, en el cual las células troncales¹ neurales de origen ectodérmico transdiferencian ha tejido mesodérmico formando músculo y cartílago (Echeverri y Tanaka, 2002).

La capacidad de regenerar tejidos u órganos se encuentra ampliamente distribuida en el reino animal (Metazoarios). Por ejemplo, los peces Teleosteos son capaces de regenerar sus aletas y la espina dorsal, los mamíferos pueden regenerar parcialmente el hígado, las hidras son capaces de regenerar a un individuo completo a partir de una muestra pequeña de tejido y los Urodelos son capaces de regenerar la cola, extremidades, espina dorsal, ventrículos cardíacos, retina, lentes oculares y las

¹ Células troncales: son las células que tienen una capacidad indefinida para dividirse y el potencial para diferenciarse en varios tipos celulares.

mandíbulas. El hecho de que este carácter se encuentre ampliamente distribuido en el reino animal nos sugiere que la regeneración es una característica ancestral y que en algún momento durante la evolución fue perdida en algunos linajes. Basándose en lo anterior se pueden formular varias hipótesis que podrían explicar la reducida capacidad regenerativa que presentan los mamíferos. Las principales hipótesis son las siguientes: (i) expresión inadecuada de los genes que participan en la regeneración (señalización), (ii) presencia de una cascada de señalización intracelular incompleta, (iii) expresión irreversible de los rasgos de diferenciación terminal, (iv) ausencia de una población de células troncales competentes y (vi) respuesta inmunológica que pueda imposibilitar el proceso de regeneración. Siguiendo esta línea de razonamiento, un estudio demostró que las células de mamíferos conservan la maquinaria de señalización intracelular necesaria para llevar a cabo la dediferenciación. Este estudio demostró que los miotubos de ratón son capaces de segregarse para dediferenciar y formar células mononucleadas, las cuales eran capaces de proliferar cuando fueron cultivadas en un extracto proveniente de una extremidad de ajolote que estaba en proceso de regeneración (McGann *et al.*, 2001).

Existe una marcada relación entre la capacidad regenerativa y el estado de desarrollo de los organismos. Los únicos vertebrados que en el estado adulto son capaces de llevar a cabo la regeneración son algunas especies del orden Caudata. Sin embargo, la mayoría de vertebrados son capaces de regenerar las extremidades exclusivamente durante las etapas tempranas del desarrollo. Esto podría deberse a que los tejidos embrionarios presentan un mayor número de células en estado indiferenciado que pueden participar en el proceso regenerativo. El tejido embrionario cuando es implantado en el cerebro adulto lesionado, es capaz de regenerar el tejido dañado. Por ejemplo, en un estudio se observó que el trasplante de neuronas embrionarias a la corteza somato-sensorial del cerebro adulto de ratón, que sufre de neurodegeneración, puede regenerar las proyecciones perdidas (Hernit-Grant *et al.*, 1996). La regeneración embrionaria ha sido bien caracterizada con estudios realizados en los renacuajos, en los cuales se demostró que la progresión en el desarrollo va acompañada de la pérdida de capacidad regenerativa (Endo *et al.*, 1997). La pérdida de la capacidad regenerativa durante el desarrollo también ha sido descrita en el ratón (Wanek *et al.* 1989) y en el pollo (Kostakopoulou *et al.* 1996).

Es posible que los genes que participan en la señalización e inducción del proceso regenerativo sólo se expresen en las etapas tempranas del desarrollo. Conboy *et al.* (2005) demostraron que factores que se encuentran en el sistema circulatorio de ratones jóvenes (2-3 meses de edad) son capaces de restituir la actividad regenerativa

de células progenitoras² presentes en ratones viejos. Más aún, demostraron que los ambientes jóvenes presentan factores sistémicos que son capaces de modular los mecanismos de señalización críticos para activar a las células progenitoras y promover la regeneración. Este estudio es de gran impacto porque también demuestra que los organismos adultos conservan células que son capaces de participar en un proceso regenerativo. Echeverri y Tanaka (2002) demostraron que las células troncales mantienen una gran plasticidad en las salamandras adultas. Las células troncales neurales de origen ectodérmico tienen la capacidad de transdiferenciar a células de músculo y cartílago de origen mesodérmico, durante la regeneración de la cola de la salamandra adulta.

La pérdida de la capacidad regenerativa en los organismos adultos podría deberse a la incapacidad para producir las señales inductoras de la regeneración. Estas señales posiblemente son necesarias para inducir el proceso de desdiferenciación y/o la activación de las células troncales para promover su participación en el proceso de regeneración. La desdiferenciación es el proceso responsable de la mayoría de la regeneración observada en los tejidos no-neurales (Echeverri et al., 2001; Kodama and Eguchi, 1995). En términos generales, la evidencia hasta el momento parece indicar que las células troncales participan en el proceso de regeneración de las extremidades, pero que por sí solas no son capaces de regenerar el tejido completo. Por otra parte, en el caso del sistema nervioso la regeneración parece estar mediada principalmente por las poblaciones de células troncales neurales y progenitoras; la transdiferenciación de las células troncales neurales y progenitoras contribuye al proceso regenerativo.

Células troncales y regeneración del SNC

En los vertebrados sólo los Teleósteos y los Urodelos son capaces de regenerar parcialmente algunas regiones del sistema nervioso central durante la etapa embrionaria. La rana sudafricana *Xenopus laevis* representa un caso excepcional, ya que se ha reportado que tiene la capacidad de regenerar el cerebelo (Filoni and Gilbertini, 1971), mesencéfalo (Srebro, 1957), telencéfalo y bulbo olfatorio (Yoshino and Tochinai, 2004) durante la etapa larvaria (figura 6).

² Células progenitoras: son células que tienen una limitada capacidad para dividirse. Las células progenitoras pueden generar varios tipos celulares dentro de un mismo linaje. Estas células por general se dividen un par de veces y posteriormente generan las células diferenciadas.

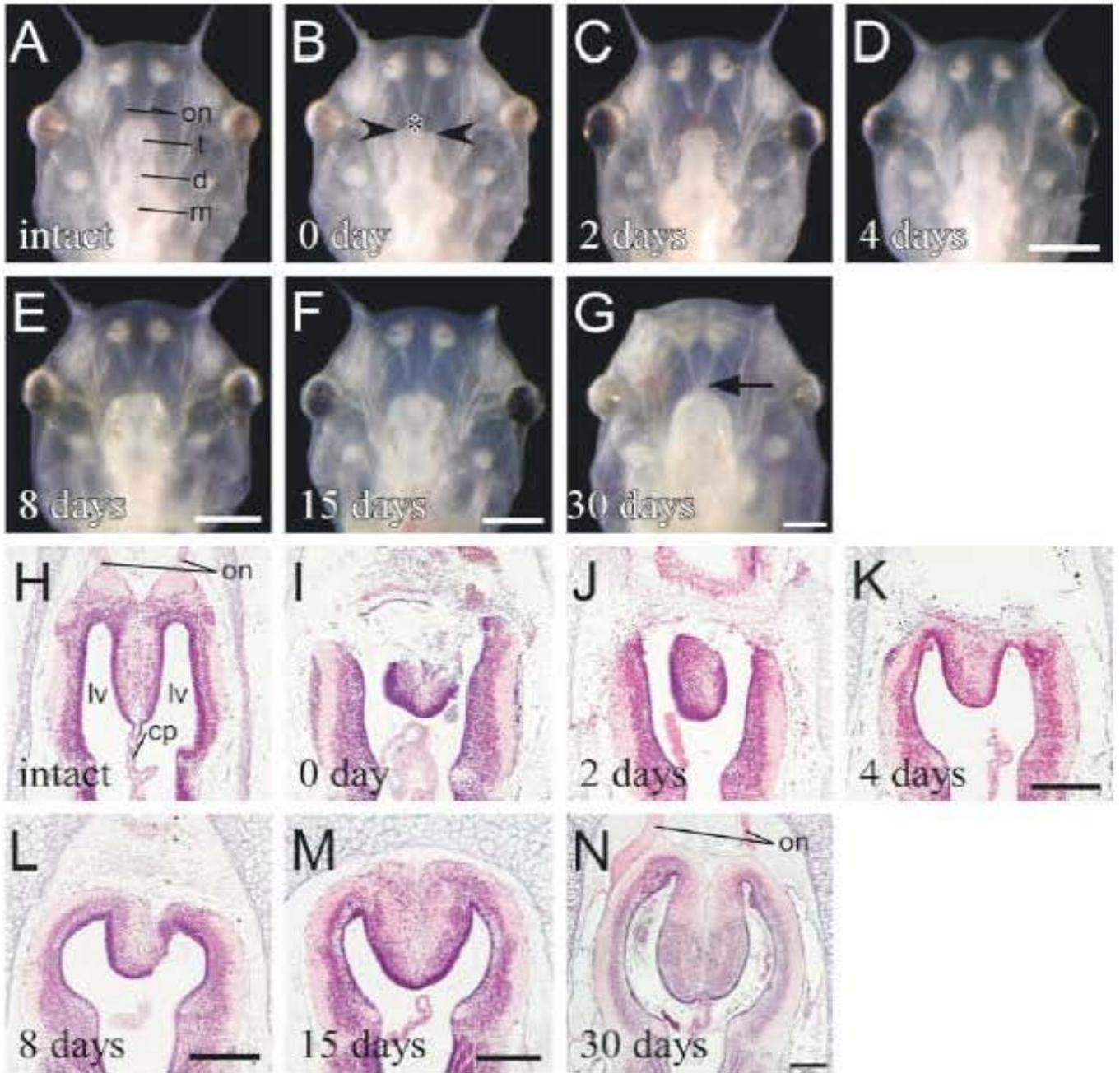


Figura 6. Regeneración del telencéfalo larvario. La parte anterior del telencéfalo fue removida de un renacuajo de estadio 53 (A,H), posteriormente fue observado macroscópicamente (A-G) e histológicamente (H-N). Inmediatamente después de la disección, los ventrículos se encontraban abiertos del extremo anterior (B, I). Tan sólo 4 días después de la operación, los huecos en el extremo anterior del ventrículo se habían sellado (D, K). Posteriormente el cúmulo de células que cerró el ventrículo empezó a incrementar en grosor y finalmente se extendió anteriormente (K-M). 30 días después de la operación el telencéfalo había regenerado por completo. Incluso las fibras de los nervios olfatorio habían regenerado las conexiones con órganos olfatorios. Las puntas de las flechas en (B) indican el extremo anterior del telencéfalo que quedó después de la operación. La flecha en el panel (G) indica la conexión entre el nervio olfatorio y el telencéfalo regenerado. Abr. on, olfactory nerve; t, telencephalon; d, diencephalon; m, mesencephalon; lv, lateral ventricle; cp, choroid plexus. Barras, 2mm (A-G); 300 μ m (H-N). (Yoshino and Tochinal, 2004)

La regeneración del telencéfalo observada en *Xenopus laevis* es un proceso mediado por células troncales neurales y progenitoras. Es importante mencionar que esta capacidad regenerativa se pierde en el organismo adulto. La pérdida de la capacidad regenerativa en el adulto no es consecuencia de una disminución en la población de células troncales neurales, sino en la incapacidad de éstas de migrar en el cerebro adulto (Yoshino and Tochinai, 2004).

Köster y Fraser (2006) demostraron que los embriones del pez cebra son capaces de regenerar el cerebelo (figura 7). Mas aún, demostraron que el cerebelo de las larvas de pez cebra era regenerado a partir de células presentes en la región anterior del cerebro posterior. Una observación importante es que el proceso regenerativo del cerebelo va acompañado de la reactivación de los patrones de formación que ocurren durante el desarrollo en la región anterior del cerebro posterior. En este estudio también se demostró que la señalización de FGF es esencial para el proceso regenerativo. Para detectar la regeneración del cerebelo en este estudio utilizan una línea de pez cebra que tiene la GFP bajo el control de *gata1*. Es importante mencionar que *gata1* se expresa en células de la sangre y en diferentes poblaciones neuronales, incluyendo a los precursores del cerebelo.

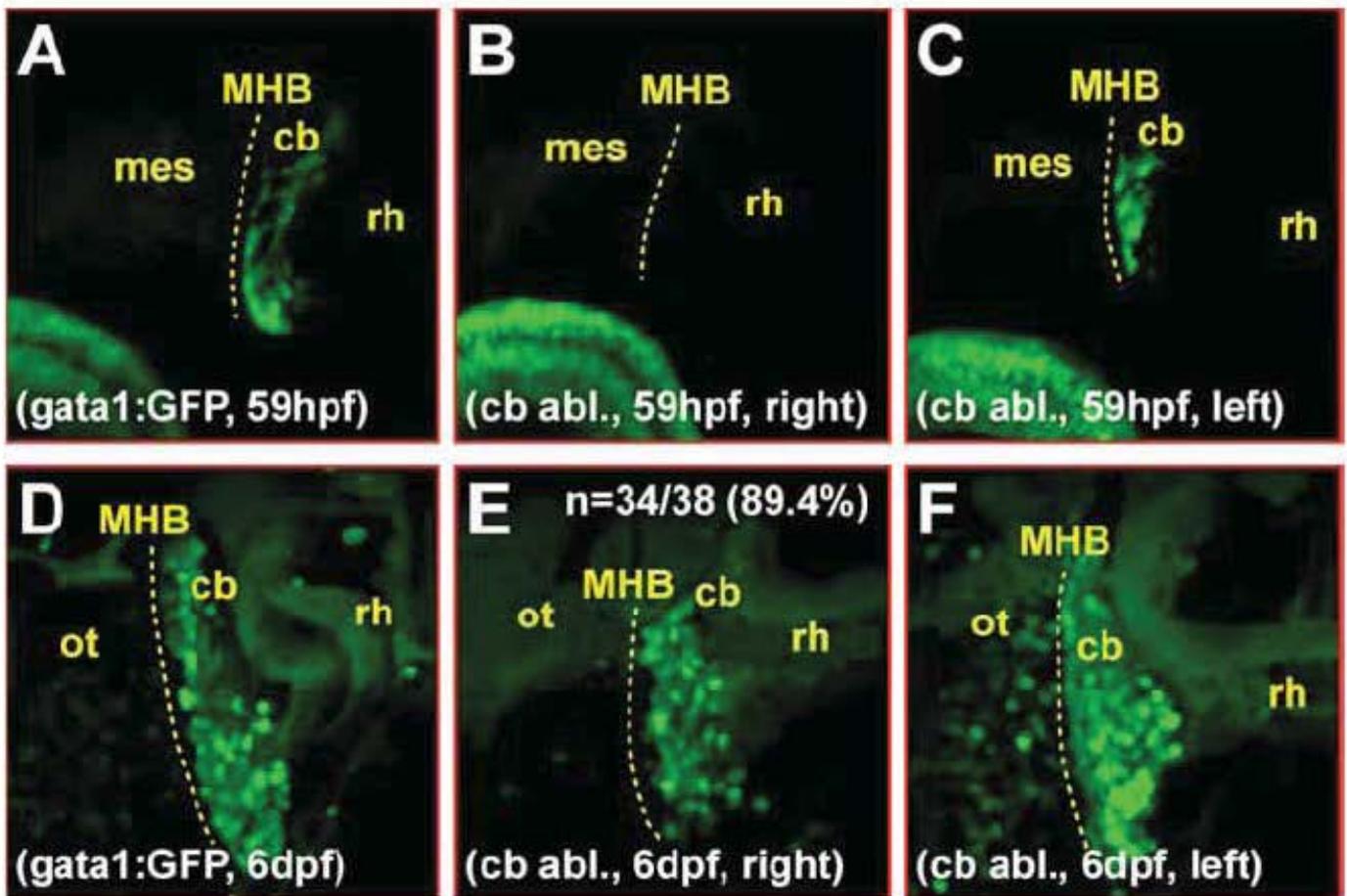


Figura 7. Regeneración del cerebelo del pez cebra. A-F, Vista lateral. Se removió quirúrgicamente el cerebelo de las larvas de pez cebra en la etapa 36 horas post-fertilización (hpf), por lo anterior, no se observan células positivas para *gata 1:GFP*(B). Esto indica que el cerebelo fue removido por completo. La presencia de algunas células *gat 1:GFP* en el lado izquierdo del dominio cerebelar (C) sirve como control de que el transgen se esta expresando como en los organismos no operados (A). El 89% de los embriones transgénicos que fueron operados presentaron células *gata 1:GFP* positivas en la frontera mes-metencefálica 6 días después de la fertilización (E-F) con una morfología muy similar a la del control (D). cb, cerebelo; mes, mesencéfalo; MHB, frontera mes-metancefálica; rh, romboencéfalo. (Köster y Fraser, 2006)

El descubrimiento de poblaciones de células troncales y progenitoras en el adulto nos sugieren que algunos tejidos presentan cierto potencial regenerativo. En la actualidad se ha encontrado evidencia de que las células troncales de los organismos adultos participan de forma activa en la renovación continua de ciertos tejidos como la piel, bulbo olfatorio, folículo piloso y sistema hematopoyético. Las células troncales también participan en la reparación de ciertos tejidos que sufren un desgaste continuo como en el caso del músculo o hueso. De particular importancia es el hallazgo de células troncales y progenitoras en el cerebro adulto de mamíferos, ya que se ha reportado que están involucradas en procesos de neurogénesis. Las dos regiones en las cuales ha sido reportada la neurogénesis son: la región subventricular (Lois and

Alvarez-Buylla, 1993) y la región subgranular del hipocampo (Kuhn *et. al.*, 1996). Estos descubrimientos rompen con el paradigma de que el cerebro adulto era incapaz de generar nuevas neuronas. Mas aún, se ha demostrado que el cerebro adulto de los mamíferos conserva cierta capacidad regenerativa. Uno de estos estudios demostró que la región subventricular de ratones adultos es capaz de regenerar después de ser sometida a un tratamiento con el antimitótico Ara-C. En este estudio se observó que los astrocitos presentes en la región subventricular son capaces de regenerar por completo la red neural de la región subventricular (Doetsch *et. al.*, 1999). En términos generales esta red neural participa en la renovación de las neuronas del bulbo olfatorio.

El daño al SNC parece ser un fuerte incentivo para la activación de las células troncales neurales y progenitoras. Gould y Tanapat (1997) demostraron que cuando se produce una lesión en el hipocampo de la rata adulta, se induce la proliferación de los progenitores neurales del Giro Dentado. Sin embargo, en este estudio no se observó la migración de los progenitores hacia la región dañada. Esto podría deberse a la ausencia de las señales que promueven la migración de los neuroblastos. Fallon *et al.* (2000) realizaron estudios en los cuales reportaron que las células troncales neurales de la región subventricular son capaces de proliferar, migrar y diferenciar cuando son estimuladas por una lesión de las neuronas dopaminérgicas e inyecciones del factor TGF α . La migración neuronal era dirigida hacia la región inyectada. Al inyectar TGF α al estriado, se observó un aumento en el número de neuronas positivas para TH (marcador dopaminérgico) en esta región. Es importante mencionar que en este estudio no se demostró que las neuronas dopaminérgicas generadas *de novo* fueran del tipo de las observadas en la Substancia Nigra. Es decir, no se hizo ninguna prueba para distinguir cuál era el tipo de neurona dopaminérgica que había sido generada.

Debido a que tienen una capacidad indefinida para dividirse y el potencial de diferenciar en varios tipos celulares, las células troncales tienen un enorme potencial terapeutico. Cuando se implantan precursores mesencefálicos en el estriado de ratas modelo para el Parkinson, inyectadas con 6-hidroxidopamina, estos precursores sobreviven, proliferan y diferencian hacia neuronas dopaminérgicas. Mas aún, las células implantadas promovieron la recuperación funcional de las ratas Parkinsonianas (Sawamoto *et al.*, 2001). El tejido nervioso lesionado es capaz de producir señales que promueven la diferenciación de las células troncales. Nishino *et al.* (2000) demostró que las células troncales neurales diferencian con una mayor frecuencia hacia el

linaje dopaminérgico cuando son transplantadas en un estriado lesionado (Nishino *et. al.*, 2000).

Enfermedades como el Parkinson, Huntington y Alzheimer promueven la degeneración de determinadas poblaciones neuronales. Es probable que la neurodegeneración promueva una respuesta del SNC que este dirigida a aminorar los daños. Batista *et. al.* (2006) demostraron que en un modelo para la enfermedad de Huntington, la línea de ratón R6/2, se produce la expansión de las células troncales neurales de la región sub-ependimal. Adicionalmente, las células progenitoras de la región sub-ependimal proliferan y alteran sus patrones de migración, ya que algunas de estas células no migran al bulbo olfatorio, sino que son redirigidas a la zona afectada, el estriado. Es importante mencionar que la respuesta del SNC también se observa en modelos de neurodegeneración artificiales. Un estudio muy relevante para el trabajo actual fue realizado por Mitsumoto *et. al.* (1998). En este experimento los autores demostraron que los ratones que fueron tratados con MPTP, toxina que induce síntomas Parkinsonianos porque promueve la degeneración de las neuronas Daérgicas, son capaces de regenerar las fibras inmunoreactivas para TH presentes en ésta región. Es importante mencionar que en este estudio no se observó la regeneración de los cuerpos celulares de las neuronas DAérgicas. Por lo tanto, la regeneración de las fibras inmunoreactivas para TH provino de los cuerpos celulares de las neuronas dopaminérgicas que no fueron degeneradas.

Varios de los estudios anteriormente mencionados nos sugieren que el sistema nervioso de los vertebrados tiene la capacidad de responder ante un insulto o lesión. Es decir, cuando el tejido nervioso sufre un insulto se produce una respuesta que promueve un cambio en las señales producidas, con el propósito de inducir procesos que aminoran los daños. Es probable que la degeneración neuronal produzca señales que modifiquen el destino de las células troncales y progenitoras inmaduras, para reparar o regenerar el tejido dañado.

Enfermedad del Parkinson

El Parkinson es una enfermedad neurodegenerativa que se produce por la pérdida de las neuronas dopaminérgicas de la región del cerebro conocida como *Substantia nigra (SN)*. La enfermedad fue descrita y documentada en 1817 por el médico británico Dr. James Parkinson. Los pacientes de Parkinson presentan una pérdida de alrededor del 80% de las neuronas dopaminérgicas de la SN. Las neuronas

dopaminérgicas son importantes porque participan en el sistema mesolímbico, modulando la postura, el movimiento voluntario, adicciones y sentimientos. Esta enfermedad es la segunda enfermedad neurodegenerativa más común en las personas de edad avanzada después del Alzheimer. Algunos de los síntomas son bradicinesia (lentitud de movimientos voluntarios), acinesia (ausencia de movimiento), rigidez muscular y temblor.

Los tratamientos para la enfermedad del Parkinson consisten en medicamentos que disminuyen los síntomas, ninguna de las terapias actuales detiene la degeneración de las neuronas DAérgicas. El poco conocimiento que se tiene de los procesos moleculares que provocan la neurodegeneración son el principal obstáculo para el desarrollo de terapias neuroprotectoras. Algunos de los genes que se han relacionado con la enfermedad del Parkinson son: α -sinucleína, parkina, DJ-1 y UCHL-1 (Dawson y Dawson, 2003). Todos estos genes participan en la maquinaria que se encarga de la degradación de proteínas (proteosoma). Con base en lo anterior, se piensa que el plegamiento erróneo de las proteínas y la disfunción del proteosoma son eventos cruciales en la patogénesis del Parkinson. Otros eventos que se han relacionado con la patogénesis de esta enfermedad neurodegenerativa son la disfunción de la mitocondria y el estrés oxidativo; ambos eventos pueden colaborar en la acumulación de las proteínas mal-plegadas (Dauer y Przedborski, 2003). Los modelos de la enfermedad de Parkinson producidos por neurotoxinas (Ej. MPP+) han probado ser muy útiles para estudiar los eventos moleculares involucrados en la muerte de las neuronas DAérgicas.

Desarrollo del tubo neural

El sistema nervioso de los vertebrados está constituido por una gran variedad de poblaciones celulares. Dichas poblaciones celulares se desarrollan en regiones específicas a lo largo de los ejes dorso-ventral (D-V) y antero-posterior (A-P) del tubo neural. El tubo neural es una estructura de origen ectodérmico que se forma por encima de la notocorda. El tubo neural es la estructura que va a dar lugar a la mayor parte del sistema nervioso. Se han propuesto que centros señalizadores que radican a lo largo de los ejes D-V y A-P del tubo neural producen señales que están organizadas en un plano cartesiano, cuyas coordenadas especifican espacialmente la identidad de las distintas poblaciones celulares presentes a lo largo del tubo neural (Wolpert, 1969; Rubenstein *et al.*, 1994).

La epidermis ectodérmica dorsal, la placa del piso, la placa del techo y la notocorda se consideran como centros de señalización que especifican la identidad celular a lo largo del eje D-V (Tanabe and Jessell, 1996). Por otra parte, la placa pre-cordal, el mesodermo paraxial, el Organizador Istmico (IsO) y la Cresta Neural Anterior son los organizadores que determinan el destino celular en el eje A-P del tubo neural (Lumsden and Krumlauf, 1996).

Especificación del eje antero-posterior

La determinación del eje antero-posterior del tubo neural comienza con la inhibición de miembros de los BMP's (Bone morphogenetic proteins). Esto es debido a que las proteínas BMP2 y BMP4 son inhibidores neurales que están presentes en el neuro-ectodermo. Algunas de las señales que antagonizan la actividad de los BMP's son las proteínas Noggin, Chordin y Follistatin (Gilbert, 2003). Por otra parte, se ha demostrado que las señales que inducen la caudalización del tubo neural incluyen al ácido retinóico (RA) y a la familia de los factores de crecimiento fibroblásticos (FGF's). El RA es una molécula esencial en la especificación del eje A-P, ya que regula la expresión de los genes de la familia Hox. Estos genes son importantes ya que codifican para valores posicionales a lo largo del eje A-P. En particular, la expresión diferencial de los genes Hox determina la identidad de los rombómeros presentes en el neuro-eje (Studer *et al.*, 1994). Además de señales que determinan el patrón de formación del neuro-eje, también hay señales que inducen la formación del sistema nervioso central (SNC). Se ha demostrado que algunos genes homeóticos promueven el desarrollo de tres vesículas en el extremo anterior del tubo neural. Estas vesículas posteriormente van a dar lugar a las siguientes estructuras: prosencéfalo, mesencéfalo y romboencéfalo. El prosencéfalo va a dar lugar a dos vesículas secundarias: telencéfalo y diencéfalo. Posteriormente el telencéfalo diferencia en los lóbulos olfatorios, hipocampo y cerebro, mientras que el diencéfalo diferencia en la retina, epitálamo, hipotálamo y tálamo. El mesencéfalo simplemente va a generar el cerebro medio en el adulto. El romboencéfalo genera dos vesículas secundarias: metencéfalo y mielencéfalo. El metencéfalo va a dar lugar al cerebelo y el pons, a su vez el mielencéfalo diferencia en la medula oblongata. Algunos de los genes homeóticos expresados en la región del organizador que provocan la formación de estructuras de la cabeza son Lim-1 y Otx-2.

Especificación del eje dorso-ventral

La especificación del tubo neural a través del eje D-V está determinada por factores pertenecientes a la superfamilia de TGF- β y a la familia de Sonic hedgehog (Shh). Los factores pertenecientes a la superfamilia de TGF- β son producidos por el ectodermo dorsal, mientras que la proteína Shh es sintetizada en la notocorda. En ambos casos, estos factores inducen la formación de un segundo centro de señalización. Sonic hedgehog induce la formación de la “placa del piso” del tubo neural. Las células que forman la placa del piso también producen Shh, creando un gradiente de concentración de esta proteína a lo largo del eje D-V del tubo neural. En términos generales, Sonic hedgehog es la proteína encargada de ventralizar el tubo neural.

La identidad dorsal del tubo neural está determinada por factores pertenecientes a la superfamilia TGF- β . En un principio la epidermis secreta a las proteínas BMP-4 y BMP-7, que se encargan de inducir la formación de un segundo centro de señalización, la placa del techo. Las células que conforman a la placa del techo producen BMP-4. Esta proteína induce a las células vecinas a producir otras proteínas de la superfamilia TGF- β . Esto lleva a la liberación de una cascada de factores que difunden hacia la región ventral del tubo neural creando un gradiente de concentración. Algunas de estas proteínas incluyen a los BMP-4, BMP-5, BMP-7, Dorsalina y Activina (Figura 1).

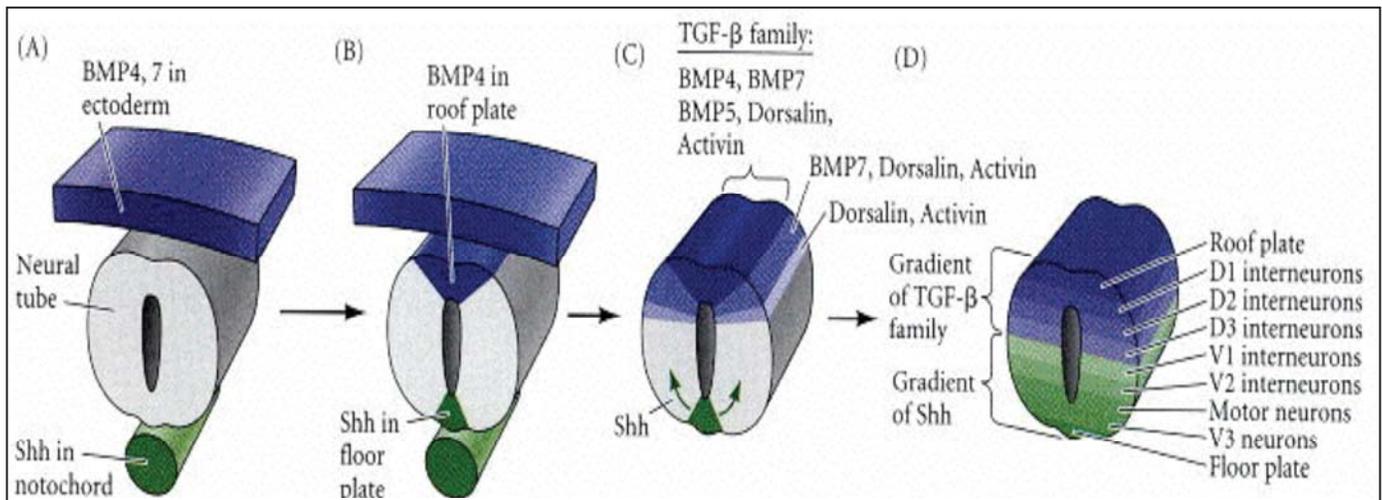


Figura 1. Señales que especifican las identidades neuronales a través del eje dorso-ventral del tubo neural. A) El tubo neural recién formado es influenciado por dos centros de señalización. La parte dorsal del tubo neural se encuentra expuesta a las proteínas BMP4 y BMP7 secretadas por la epidermis, mientras que la parte ventral del tubo neural está expuesta a la proteína Shh secretada por la notocorda. **(B)** Establecimiento de centros de señalización secundarios en el tubo neural. BMP4 se expresa y es secretada por las células de la placa del techo; Sonic hedgehog se expresa y es secretada por las células de la placa del piso. **(C)** BMP4 establece una cascada de señalización de los factores relacionados a TGF-β que se extiende desde la placa del techo hasta regiones ventrales. La proteína Shh es secretada en la placa del piso y difunde dorsalmente creando un gradiente de concentración. **(D)** La identidad de las neuronas de la médula espinal está determinada por una exposición diferencial a los distintos factores paracrinos presentes en el tubo neural. La exposición a una combinación específica de señales posicionales va a promover la activación de ciertos factores de transcripción (Modificada de Gilbert, 2003).

La señalización de los factores pertenecientes a la superfamilia de TGF-β y Shh actúan a lo largo del tubo neural y determinan la expresión de distintos factores de transcripción a lo largo del eje D-V. La exposición a distintos factores de transcripción permite la formación de diversas poblaciones neurales.

Frontera mesencéfalo-metencefalo: Organizador Istmico

La Cresta Neural Anterior (CNA) es un centro de señalización que se ubica en la frontera entre el prosencéfalo y el ectodermo anterior. Algunos estudios recientes sugieren que la CNA es necesaria para el mantenimiento de la identidad del cerebro frontal. El Organizador Istmico es otro centro de señalización que se encuentra en la región que une al mesencéfalo con el metencéfalo. Este organizador es necesario para el desarrollo de las estructuras mesencefálicas y metencefálicas. Durante el inicio de la neurulación los factores de transcripción Otx2 y Gbx2 son expresados en dominios específicos ubicados en la región anterior y posterior a la frontera mes-metencefálica. Meinhardt propuso un modelo en el cual sostenía que la interfase entre

las zonas de expresión de *Otx2* y *Gbx2* determinaba la posición del IsO. Se han realizados varios experimentos genéticos en el ratón, así como estudios de expresión ectópica y trasplantes en el pollo, que ponen a prueba este modelo. En términos generales, los resultados obtenidos de estos experimentos apoyan el modelo de Meinhardt. Por ejemplo, un estudio realizado por Bally-Cuif y Wassef (1994) demostró que la juxta-posición ectópica de *Otx2* y *Gbx2*, inducida por un trasplante de la frontera mes-metencefálica en el embrión de pollo, promovió el desarrollo ectópico del IsO. Como ya se mencionó anteriormente el Organizador Istmico promueve la inducción y mantenimiento de las estructuras mes-metencefálicas. *Wnt1* y *Fgf8* son dos factores solubles que normalmente son expresados en el IsO. Es importante mencionar que varios estudios sugieren que *Fgf8* es el factor responsable de la actividad organizadora del Istmo. Por ejemplo, en experimentos en los cuales se implantaban esferas remojadas en *Fgf8* en el diencéfalo, mesencéfalo y romboencéfalo se indujo la expresión ectópica de los marcadores mes-metencefálicos. El seguimiento de los implantes en el diencéfalo reveló el desarrollo ectópico de estructuras mesencefálicas y cerebelares. Cabe destacar que la especificación espacial y organización de estas estructuras dependía completamente de la posición de las esferas (Crossley *et al.*, 1996; Martínez *et al.*, 1999). Por otra parte, cuando esferas remojadas en *Fgf8* fueron implantadas en regiones del cerebro que expresan *Otx2*, se indujo la expresión de *Gbx2* y disminuyó la expresión de *Otx2*. Esto es relevante porque *Otx2* especifica la identidad de cerebro medio e inhibe la diferenciación del cerebro posterior. En estos experimentos también se indujo la expresión global de *En1*, *En2*, *Pax2*, *Pax5* y *Pax8* a lo largo de la región mes-metencefálica (Liu *et al.*, 1999) (Figura 2).

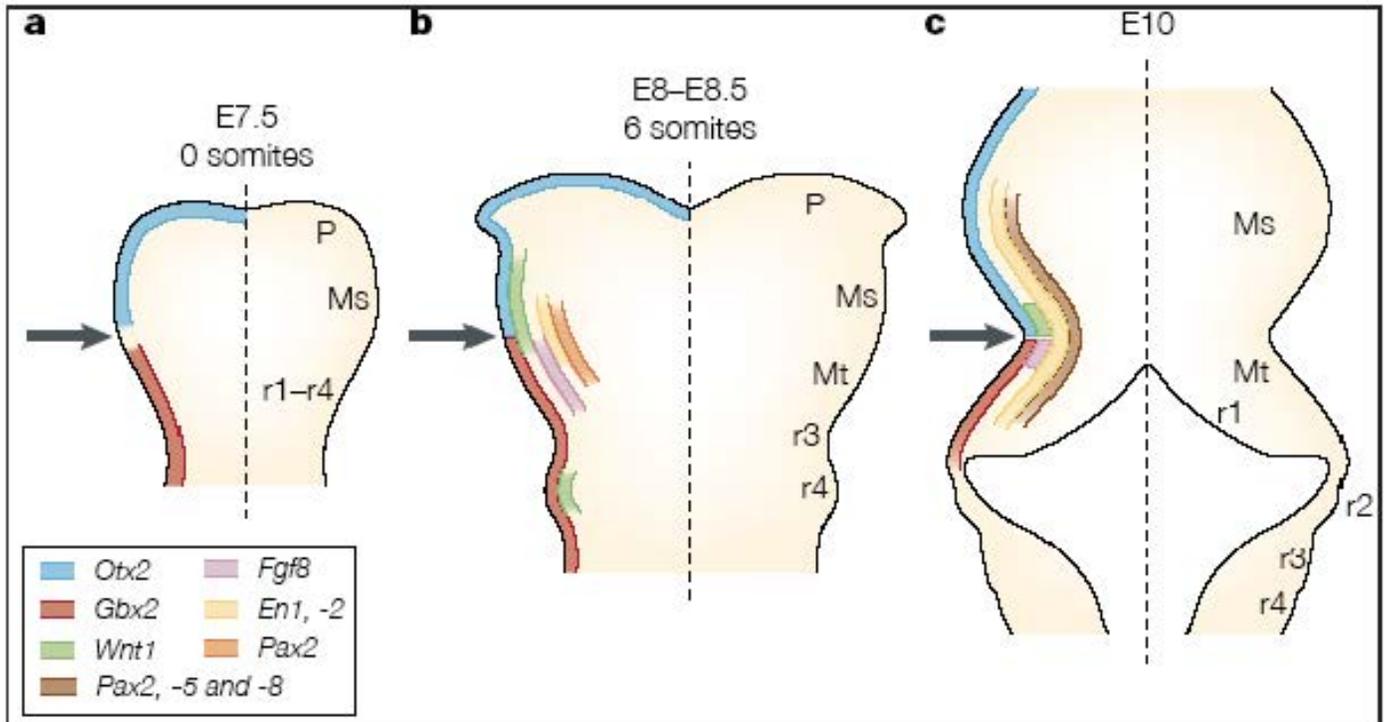


Figura 2. Patrones de expresión de los genes en la frontera mesencéfalo-metencéfalo. Vista dorsal de la placa neural embrionaria del ratón en los estadios (a) 0 somitas, (b) 6 somitas y (c) E10. (a) Al final de la gastrulación (estadio de 0 somitas), el tubo neural se encuentra subdividido en un dominio anterior que expresa *Otx2* y un dominio posterior que expresa *Gbx2*. Los patrones de expresión de ambos genes se juntan en la frontera mes-met y forman gradientes decrecientes en direcciones opuestas. (b) En el estadio de 6 somitas ha disminuido la distancia entre los dominios de expresión de *Otx2* y *Gbx2*; los bordes se han refinado y han entrado en contacto. También ha iniciado la expresión de *Wnt1* en el mesencéfalo, seguido rápidamente por *En1*, *En2* y *Pax2* en el dominio *Otx2*-*Gbx2*. Poco tiempo después comienza la expresión de *Pax8*, que se restringe al lado caudal del dominio *Otx2*-*Gbx2*. (c) En la etapa E10, el punto de encuentro entre *Otx2*-*Gbx2* determina la frontera mes-met. En cada lado de la frontera mes-met, la expresión de *Wnt1* y *Fgf8* se ha restringido a círculos angostos que rodean al tubo neural. Los dominios de expresión de *En1* y *Pax2*, que todavía atraviesan la frontera mes-met, se han vuelto más angostos, mientras que *En2*, *Pax5* y *Pax8* se expresan en casi todo lo largo del dominio mes-met. Abr. Ms, mesencéfalo; Mt, metencéfalo; P, prosencéfalo; r, rombómeros. La flecha a la izquierda de cada panel indica la posición de la frontera mes-met. (Modificado de Wurst and Bally-Cuif, 2001).

La actividad del IsO está sujeta a una retroalimentación positiva (positive feedback), debido a esto en el cerebro embrionario existen mecanismos que limitan la actividad del Organizador Istmico a la región mes-metencefalica. En la region anterior al dominio mes-metencefalico los genes *Engrailed* y *Pax2* contrarrestan la actividad de *Pax6* para establecer la frontera mesencéfalo-diencefalica (Matsunaga *et al.*, 2000). En la región posterior la expresión de la proteína *Hoxa2*, producida por el rombómero-2, inhibe la expansión caudal de la estructura conocida como primordio cerebelar (Gavalas *et al.*, 1997). Debido a que *Fgf8* se expresa normalmente después de la activación de los genes *Engrailed* y *Pax*, los efectos observados por los trasplantes de esferas muy probablemente no correspondan a la inducción del IsO, sino a una retroalimentación positiva que permita su mantenimiento (Joyner *et al.*, 2000). La existencia de una

retroalimentación positiva de *Fgf8*, *Wnt1* y de los genes *Engrailed* y *Pax* fue comprobada por experimentos de pérdida y ganancia de función realizados en los embriones de pollo, ratón y pez-cebra. La pérdida de función de *En1*, *Pax2*, *Pax5*, *Fgf8* y *Wnt1* resultó en la inducción de genes específicos del cerebro medio-posterior como *Gbx2*, pero **no** en su mantenimiento (McMahon *et al.*, 1992; Schwarz *et al.* 1997; Reifers *et al.*, 1998). Por el contrario, la expresión ectópica de *Pax2*, *Pax5*, *En1* y *En2* en el diencefalo de embriones de pollo resultó en la represión de *Pax6*, que es un marcador específico de la región diencefálica. Además de inducir la expresión de *Fgf8*, *Wnt1* y otros genes específicos del cerebro medio-posterior (Okafuji *et al.* 1999; Araki and Nakamura, 1999).

Neuronas dopaminérgicas del cerebro medio

Las neuronas dopaminérgicas son aquellas células nerviosas que producen y secretan dopamina. La dopamina es un compuesto perteneciente a la familia de las catecolaminas. Este compuesto ha sido seleccionado a lo largo de la evolución como un mensajero químico y se encuentra conservado en un gran número de organismos, desde invertebrados hasta el humano.

La dopamina es un neurotransmisor de gran importancia ya que participa en varios circuitos del SNC. En los mamíferos las neuronas dopaminérgicas participan en los circuitos que regulan la actividad de la retina y el bulbo olfatorio. Una población importante de neuronas dopaminérgicas se encuentra en el hipotálamo, dicha población neuronal inerva a la glándula pituitaria y se encarga de modular la liberación de diversas hormonas. La población más grande de neuronas dopaminérgicas se ubica en la Substancia Nigra (SN) y en la Zona Tegmental Ventral. En términos generales, la población de neuronas dopaminérgicas que radica en la SN proyecta axones al estriado, modulando la postura y el movimiento.

La tirosin-hidroxilasa (TH) es la enzima limitante en la biosíntesis de la dopamina y de otras catecolaminas relacionadas. Debido a esto, se ha utilizado la TH como el principal marcador molecular de las neuronas dopaminérgicas. Esta enzima añade un grupo hidroxilo a la posición meta de la tirosina, formando el compuesto dihidroxifenilalanina (DOPA). Posteriormente la descarboxilasa-de-amino-ácidos-aromáticos es la enzima encargada del último paso en la síntesis de la dopamina. Este paso involucra la eliminación del grupo carboxilo de la molécula DOPA (Figura 3).

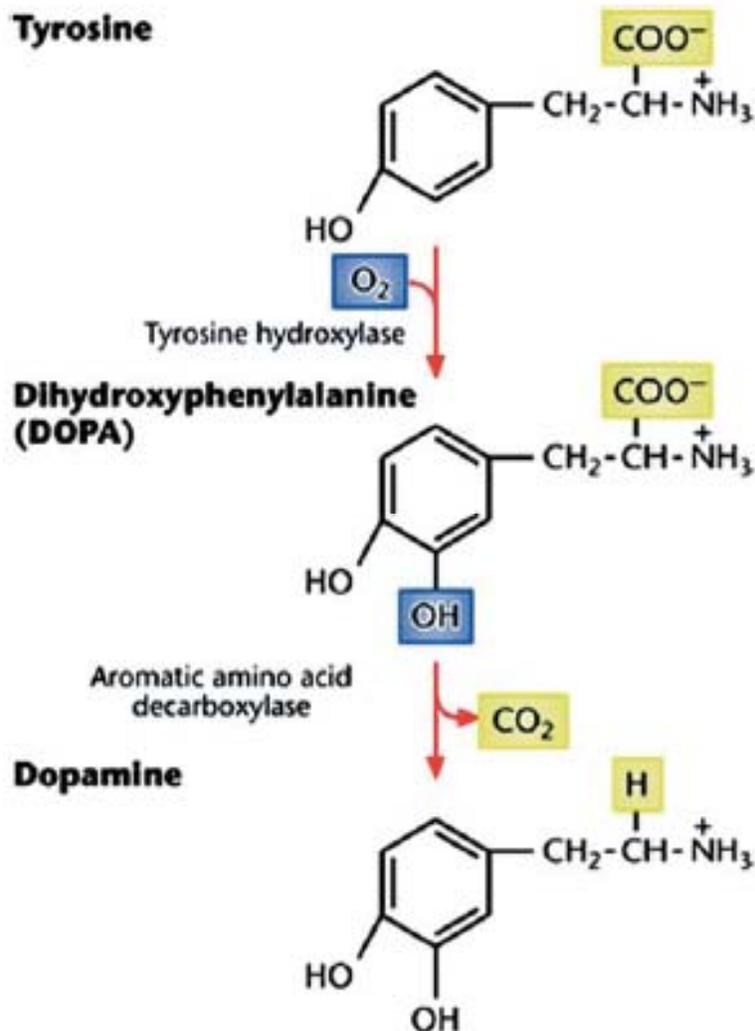


Figura 3. Biosíntesis de la dopamina. En este esquema se muestran los precursores y las enzimas que participan en la síntesis de la dopamina. (Modificado de Bannon, 2005)

El grupo de Bayer utilizó inmunohistoquímica para la TH, combinado con la autoradiografía de la timidina [³H], para determinar el periodo de neurogénesis de las neuronas dopaminérgicas en el ratón. En este estudio encontraron que las neuronas dopaminérgicas del cerebro medio (mesencéfalo) aparecen alrededor del día E10 y su neurogénesis continúa hasta el día E15 (Bayer *et al.*, 1995). Los resultados obtenidos están resumidos en la siguiente tabla:

| Periodo de inyección de la timidina [³ H] | Número de animales | % Neuronas marcadas para TH (Mean ± SD) | Día de origen | % Producidas en el periodo indicado |
|---|--------------------|---|---------------|-------------------------------------|
| | | (A) 100.00 | E10 | 10.48 (A-B) |
| E11-E12 | 4 | (B) 89.52 ± 3.19 | E11 | 26.88 (B-C) |
| E12-E13 | 4 | (C) 62.64 ± 11.73 | E12 | 47.35 (C-D) |
| E13-E14 | 5 | (D) 15.29 ± 7.99 | E13 | 14.64 (D-E) |
| E14-E15 | 6 | (E) 0.66 ± 0.60 | E14 | 0.66 (E-0) |

(Bayer *et al.*, 1995)

Especificación del linaje dopaminérgico

Actualmente se conoce muy poco acerca de los factores que regulan los patrones de formación y la generación de las neuronas dopaminérgicas en el cerebro medio. La inducción de las neuronas dopaminérgicas depende de la señalización de Shh y de FGF8, moléculas secretadas por las células de la placa del piso y por el organizador istmico respectivamente (Ye *et al.*, 1998; Hynes and Rosenthal, 1999) (figura 4).

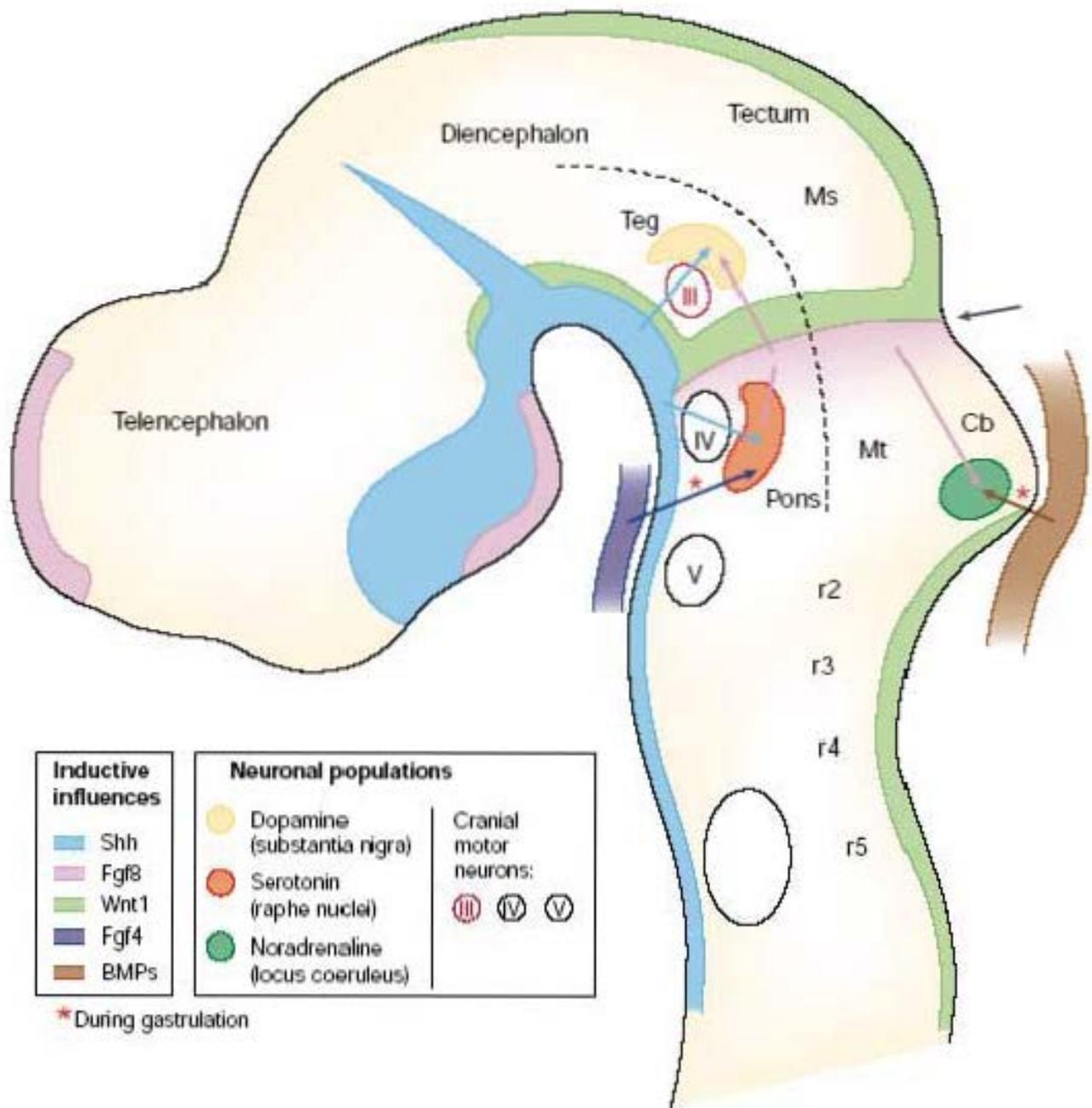


Figura 4. La interacción entre señales antero-posteriores y dorso-ventrales especifican identidades neuronales en la frontera mes-met. Vista sagital del tubo neural de un ratón en el estadio E11. Las señales inductoras (representados por las flechas) son secretadas por la placa neural a nivel de la frontera mes-met (Fgf8) y por la placa del piso (Shh). También son secretadas por tejido no-neural durante la gastrulación (Fgf4 y BMP's). Neuronas motoras del nervio craneal III y las neuronas dopaminérgicas del tegmentum responden a una combinación de Shh y Fgf8. Las neuronas serotoninérgicas del puente requieren la señalización temprana de Fgf4, y posteriormente Shh y Fgf8. Las neuronas noradrenérgicas del locus coeruleus requieren de Fgf8 y Bmp4. Abr. Bmp, bone morphogenetic protein; Cb, cerebellum; Fgf, fibroblast growth factor; Ms, mesencephalon; Mt, metencephalon; r, rhombomeres; Shh, sonic hedgehog; Teg, tegmentum; Tel, telencephalon (Modificado de Wurst and Bally-Cuif, 2001).

La función principal de estos morfógenos es el establecimiento de la identidad de cerebro medio en las primeras etapas del desarrollo neural. Varios factores de transcripción como Nurr1, Pitx3, En y Lmx1b están involucrados en la maduración, migración y mantenimiento de las neuronas dopaminérgicas post-mitóticas, pero no en la especificación inicial del linaje dopaminérgico. Es importante señalar que aún se desconocen las señales que actúan río abajo de Shh y FGF8. La aldehído deshidrogenasa 1 (Aldh1) se ha descrito como un marcador molecular para los progenitores proliferantes de las neuronas dopaminérgicas. Aldh1 es la enzima que convierte al retinaldehído en ácido retinoico (Lindahl and Evces, 1984). Esta enzima aparece alrededor del día E9.5 en la región ventral del mesencéfalo y posteriormente colocaliza con los marcadores post-mitóticos de las neuronas DAérgicas.

Una característica única de las neuronas dopaminérgicas es su generación a partir de la línea media del mesencéfalo ventral, región ocupada inicialmente por células gliales de la placa del piso que expresan Shh (Placzek *et al.*, 1990, 1993; Placzek y Briscoe, 2005). En contraste con la mayoría de las otras neuronas, la generación de las neuronas DAérgicas debe ser precedida por una conversión de las células de la placa del piso en progenitores neurales. Los mecanismos que regulan esta conversión, así como la identidad de las señales que controlan la transición, son asuntos que quedan por resolver.

En un estudio reciente se identificaron y caracterizaron dos proteínas con homeodominio Lmx1a y Msx1, que se expresan específicamente en los progenitores de las neuronas dopaminérgicas del cerebro medio y que son señales esenciales en la especificación del linaje dopaminérgico. Lmx1a funciona como un activador transcripcional que promueve la expresión de un conjunto de proteínas con homeodominio, como Msx1, que especifican la identidad de las neuronas dopaminérgicas del cerebro medio. Por otro lado, Msx1 es una proteína que funciona como un represor transcripcional dependiente de Groucho/TLE, que suprime las características gliales de las células de la placa del piso e induce la diferenciación neuronal (Andersson *et al.*, 2006).

Varios factores de transcripción se expresan en el neuro-epitelio del cerebro medio, pero sus patrones de expresión no están restringidos al dominio de los progenitores dopaminérgicos. Estos factores de transcripción incluyen a Lmx1b, En1, En2, Otx2 y Gbx2 (Wurst and Bally-Cuif, 2001). Debido a que estos factores de transcripción son expresados en etapas tempranas del desarrollo, es muy probable que estos factores

tengan la función de establecer y determinar la posición del cerebro medio-posterior, en lugar de especificar las identidades neuronales.

Diferenciación post-mitótica

Una vez que se especifican las identidades neuronales del cerebro medio, se lleva a cabo una expansión de los progenitores neurales. En esta etapa los progenitores proliferan de una manera activa. Al término de esta expansión se produce la diferenciación de las distintas poblaciones neuronales. Las neuronas dopaminérgicas post-mitóticas requieren de la acción de diversos factores de transcripción para permitir su maduración, migración y mantenimiento. Algunos de estos factores incluyen al receptor nuclear Nurr1 y a los factores de transcripción con homeodominio Lmx1b, Ptx1, En1 y En2 (Wallen and Perlmann, 2003) (Figura 5) .

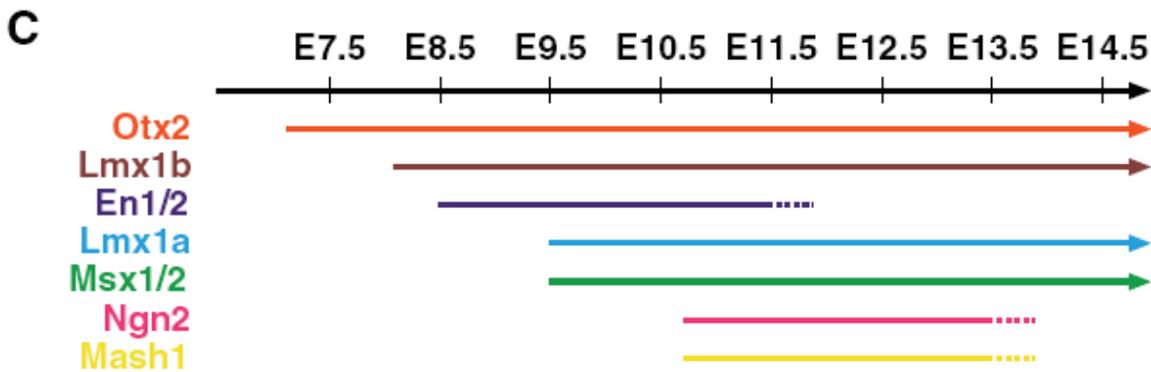
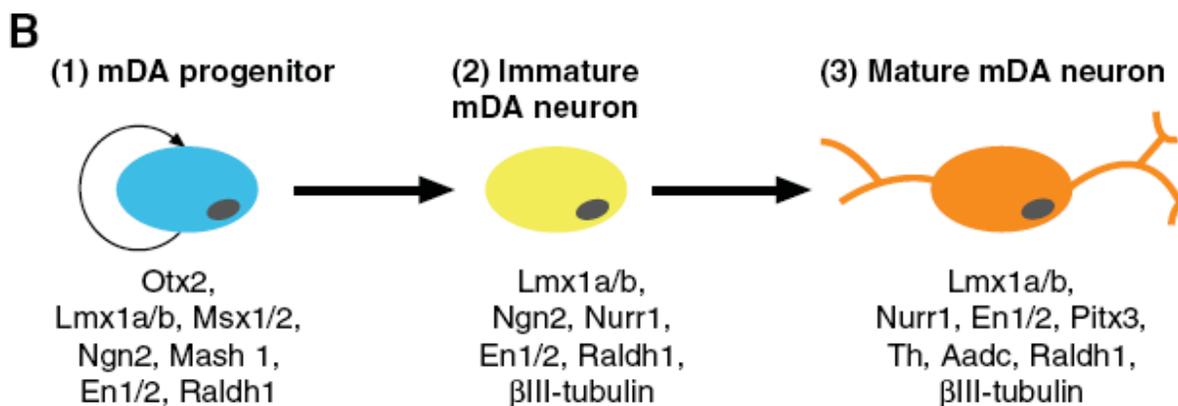
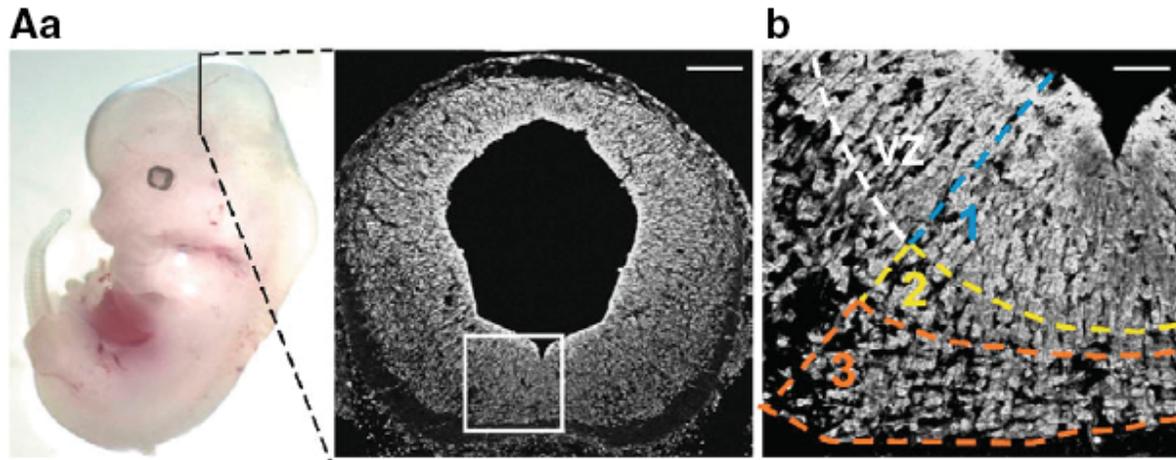


Figura 5. (A) Características moleculares y posición del linaje dopaminérgico en el cerebro medio. (Aa) Embrión de ratón de E12.5 días de desarrollo. Las líneas negras marcan la región disectada que se muestra en la derecha. Corte coronal del mesencéfalo embrionario. (Ab) Acercamiento del recuadro mostrado en la figura (Aa). En esta figura se ilustra la posición que ocupan por los precursores proliferantes, neuronas DAérgicas inmaduras y neuronas DAérgicas maduras. (B) Características moleculares de las distintas células que componen el linaje dopaminérgico. Factores de transcripción expresados por las distintas poblaciones celulares presentes en el linaje dopaminérgico. (C) Esquemática de los periodos de expresión de algunos factores de transcripción necesarios para el desarrollo de las neuronas DAérgicas (Ang, SL., 2006).

De los factores de transcripción expresados en las neuronas dopaminérgicas post-mitóticas, Nurr1 ha sido el más estudiado. Nurr1 es un factor de transcripción perteneciente a la superfamilia de receptores nucleares que son activados por su ligando (Law *et al.*, 1992). Debido a que se desconoce el ligando de Nurr1, así como de otros miembros de la superfamilia, estos se han denominado como receptores huérfanos. La mayoría de los receptores nucleares presentan una organización estructural común, compuesta por un dominio de unión al DNA y un dominio de unión a su ligando. Nurr1 se puede unir al DNA en forma de monómero, homodímero o heterodímero en conjunto con el receptor-X de los retinoides (Perlmann and Jansson, 1995). Cuando se une al DNA en forma de monómero u homodímero, Nurr1 funciona como un factor de transcripción constitutivo. Células positivas para Nurr1 se pueden encontrar en las extremidades en desarrollo, testículos del adulto, glándula adrenal, timo y en el SNC. Dentro del sistema nervioso Nurr1 se expresa en las neuronas dopaminérgicas que van apareciendo en la región ventral del mesencéfalo alrededor del día E10.5 (Zetterstrom *et al.*, 1997). La expresión de Nurr1 en estas células se mantiene durante todo el desarrollo hasta la etapa adulta. Es importante mencionar que Nurr1 se expresa en varias otras regiones del SNC como en la corteza, hipocampo, tálamo y espina dorsal. Estudios en el ratón en los cuales utilizaban un knockout³ de Nurr1 demostraron que éste factor de transcripción es esencial para la generación de neuronas dopaminérgicas en el cerebro medio. Esto es debido a que en estos ratones no se detectaron los marcadores de neuronas dopaminérgicas. Además, en los mismos ratones knock-out para Nurr1 todos los otros tipos catecolaminérgicos se desarrollaron con normalidad, incluso las poblaciones dopaminérgicas del bulbo olfatorio e hipotálamo. Estos resultados nos sugieren que Nurr1 promueve de manera específica el desarrollo de las neuronas dopaminérgicas del cerebro medio (Saucedo-Cardenas *et al.*, 1998; Castillo *et al.*, 1998). Aún en la ausencia de Nurr1 estos animales presentan una expresión normal de varios marcadores de las neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo, tales como Pitx3, En1, En2, GFR α 1 y Lmx1b. Sin embargo, estos ratones mutantes carecen por completo de la TH y del receptor de tirosin-cinasa conocido como c-ret. El gene c-ret es importante porque codifica para un receptor de tirosin-cinasa que se une al GDNF⁴, que es un factor que promueve la sobrevivencia de las neuronas motoras y dopaminérgicas (Trupp *et al.*, 1996). Posteriormente se demostró que Nurr1 regula de manera directa al promotor del gene de la tirosin-hidroxilasa (Sakurada *et al.*, 1999). Otro estudio demostró que el promotor

³ Es una técnica de biología molecular que generalmente involucra la alteración de la secuencia de un gene por recombinación homóloga, produciendo un gene no funcional.

⁴ GDNF es el factor neurotrófico derivado de células gliales.

del gene que codifica para el transportador de dopamina también es regulado por Nurr1 *in vitro* (Sacchetti *et al.*, 2001). Mutaciones nulas⁵ tanto de *TH* como de *c-ret*, no ha logrado eliminar a las neuronas dopaminérgicas del cerebro medio, como el knock-out para Nurr1 (Zetterstrom *et al.*, 1997). Este resultado nos indica que existen otros genes blanco de Nurr1 que están involucrados en el desarrollo de neuronas dopaminérgicas. También se ha demostrado que Nurr1 es necesario para la migración, invasión y el mantenimiento de las neuronas dopaminérgicas (Saucedo-Cardenas *et al.*, 1998).

Se han identificado varios factores de transcripción con homeodominio que se expresan en neuronas dopaminérgicas en desarrollo. Por ejemplo, *Lmx1b* se puede detectar a partir del día E7.5 en el SNC del ratón. Por otra parte, *Pitx3* se expresa de manera específica en células positivas para TH presentes en el cerebro medio a partir del día E11.5. Gene targeting de *Lmx1b* produce la pérdida de la expresión de *Pitx3* en el embrión, aunque se mantiene la expresión de Nurr1 y TH. En los ratones con mutaciones nulas para *Lmx1b*, no es posible detectar neuronas positivas para TH en el mesencéfalo a partir del día E16.5. Estos resultados sugieren que *Lmx1b* es necesaria para mantener el linaje dopaminérgico. *Pitx3* es necesario para la especificación y/o supervivencia de los progenitores dopaminérgicos de la SN (Nunes *et al.*, 2003).

En1 y *En2* son genes de ratón homólogos al gene *Engrailed* de *Drosophila*. Estos genes se expresan temprano en la morfogénesis del cerebro medio y se ha demostrado que son importantes en el mantenimiento de las estructuras mesencefálicas (Danielian and McMahon, 1996). Ambos genes presentan una segunda etapa de expresión alrededor del día E11 que se encuentra restringida a las neuronas dopaminérgicas en desarrollo. También se observó que en el ratón nulo para *En1* y *En2* se promueve una disminución considerable en la expresión de *TH* (Simon *et al.*, 2001).

⁵ Mutaciones nulas (gene targeting) es un término empleado para definir una tecnología que permite la modificación del genoma de forma dirigida, específica y controlada.

ANTECEDENTES

Cultivo de explantes

A pesar de que es posible realizar experimentos *in vivo* con los embriones de algunos animales modelo, esto no es tan sencillo en el caso de los organismos vivíparos. Por esta y otras razones se han desarrollado sistemas *in vitro*. En general estos sistemas permiten una manipulación más sencilla y un mayor control de las condiciones ambientales. El cultivo de órganos se puede definir como el mantenimiento de fragmentos de tejido u órganos completos *in vitro*. Este sistema se desarrolló al final del siglo XIX como parte del desarrollo de las técnicas de embriología. R.G. Harrison fue el primero en emplear técnicas *in vitro* para el estudio de fenómenos que ocurren *in vivo*, realizando cultivos de médula espinal embrionaria de anfibios. Con este sistema Harrison pudo observar el crecimiento de los axones de los neuroblastos y llegó a la conclusión de que el axón se formaba por expansión del cuerpo neuronal y **no** por fusión de una cadena de células. Este cultivo lo realizó en una gota de linfa del anfibio, que colgaba de un cubreobjetos, en una cámara sellada. La primera limitación para el establecimiento del cultivo de órganos era la producción de un medio de cultivo adecuado. Burrows (1910) empleó plasma de pollo para nutrir a los explantes de tejidos embrionarios de pollo. En su momento este medio resultó ser un éxito ya que le permitió observar el crecimiento del tejido nervioso, corazón y piel. Actualmente se entiende por cultivo de explantes al conjunto de técnicas que permiten el mantenimiento de los tejidos y/o órganos *in vitro*, manteniendo en lo posible sus propiedades fisiológicas, bioquímicas y genéticas. Es importante mencionar que en los cultivos de explantes se conserva, aunque sea parcialmente, su estructura tridimensional. Este tipo de cultivo permite reproducir con cierta fidelidad el desarrollo de los tejidos embrionarios por un periodo limitado. Los cultivos de explantes conllevan cierta heterogeneidad debido a que los tejidos no pueden immortalizarse como las células, lo que obliga a la utilización de un animal nuevo en cada experimento.

1-metil-4-fenilpiridina (MPP+)

1-metil-4-fenilpiridinium es una neurotoxina que produce un síndrome Parkinsoniano en los mamíferos. MPP+ es el metabolito activo del compuesto MPTP (Chiba *et al.*, 1984). Esta neurotoxina produce la degeneración selectiva de las neuronas dopaminérgicas (Langston *et al.*, 1983). La neurodegeneración es selectiva porque se ha demostrado que esta toxina entra a las neuronas a través del transportador de

dopamina (DAT) (Nicotra y Pavez, 2002). El MPP⁺ presenta una gran afinidad por el DAT, con valores de K_m entre 0.05-0.1 μ M en los sinaptosomas de rata y de 20 μ M en líneas celulares que presentan una expresión ectópica del transportador de dopamina (Piffl *et al.*, 1993). La asimilación celular de MPP⁺ a través del DAT presenta un perfil farmacológico muy parecido a la asimilación de dopamina. Se ha demostrado que ratones que carecen del gene que codifica para el transportador de dopamina no son susceptibles a la toxicidad del MPP⁺ (Bezard *et al.*, 1999). Por otro lado, los ratones que presentan niveles de expresión elevados para DAT son más sensibles al MPP⁺ (Donovan *et al.*, 1999). Inhibidores específicos del transportador de dopamina, como por ejemplo el manzidol, protegen por completo de la toxicidad inducida por el MPP⁺ (Ricaurte *et al.*, 1985). Es importante mencionar que el MPP⁺ también puede afectar a las neuronas granulares cerebelares *in vitro* (Marini *et al.*, 1989; Du *et al.*, 1997). En este modelo el MPP⁺ entra a las neuronas granulares cerebelares a través del transportador de cationes orgánicos-3 (Shang *et al.*, 2003).

Una vez que la neurotoxina entra a la célula se concentra en el interior de la mitocondria. En este organelo el MPP⁺ es un fuerte inhibidor del complejo I del sistema de transporte de electrones. Esto provoca la escasez de ATP's (Dunnett and Bjorklund, 1999), alteración de la homeostasis de calcio, la pérdida del potencial de membrana mitocondrial y la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Fabre *et al.*, 1999). El estrés oxidativo y bioenergético generado por la neurotoxina eventualmente lleva a la muerte celular.

Existe cierta controversia acerca de si el MPP⁺ induce cambios estructurales relacionados a una muerte celular de tipo apoptótica o necrótica. Varios estudios sugieren que tratamientos con bajas concentraciones de MPTP/MPP⁺ llevan a una muerte de tipo apoptótica, mientras que altas concentraciones de MPTP/MPP⁺ promueven una muerte de tipo necrótica (Nicotra and Parvaez, 2002). Como se mencionó anteriormente, el MPP⁺ frecuentemente induce una muerte de tipo apoptótica. De las moléculas identificadas como posibles señales apoptóticas activadas por ésta neurotoxina incluyen a JNK, Bcl-2 y Bax. El tratamiento con MPP⁺ induce un incremento acelerado en los niveles de fosforilación de JNK y JNK cinasa en el sistema nigro-estriatal (Saporito *et al.*, 2000). Por otra parte, existen varios estudios que sugieren que Bcl-2 está implicado en la respuesta de la célula ante la toxicidad ocasionada por el MPP⁺. Offen *et al.* (1998) demostraron que el ratón transgénico que expresa Bcl-2 en sus neuronas es resistente a la toxicidad inducida por MPTP y 6-hidroxidopamina. Otro estudio demostró que ante un tratamiento con

MPP+ se produce un aumento en la cantidad de Bcl-2 (Itano and Nomura, 1995). Estos estudios sugieren que Bcl-2 podría jugar un papel en la resistencia de las neuronas a factores citotóxicos. Aunque es importante mencionar que cuando las células eran tratadas simultáneamente con staurosporina, un inhibidor de cinasas, se inhibió el incremento de Bcl-2 pero sin obtener una variación en la muerte neuronal. En otro estudio observaron que ante un tratamiento con MPP+ se disparó la colocalización de Bcl-2 en la mitocondria. Otro resultado interesante del mismo grupo es que el MPP+ es capaz de inducir un incremento de las dos proteínas anti-apoptóticas (Bcl-2 y Bcl-X_l), únicamente cuando el sistema de transporte de electrones está funcionando en la célula (Veech *et al.*, 2000). Esto podría deberse a que el incremento en los niveles de Bcl-2 es una respuesta adaptativa a la producción de ROS y al estrés oxidativo provocado por varias toxinas. Por otra parte, Bax es un miembro de la familia de Bcl-2 que funciona como un promotor de la muerte celular. Cuando se le administró MPTP de forma intraperitoneal a ratones, se indujo un incremento en la expresión de Bax en la SN (Hassouna *et al.*, 1996). Es importante mencionar que esto no se pudo reproducir en la línea celular MN9D. Distintas concentraciones de MPTP o MPP+ no promovieron un incremento en la expresión de Bax (Choi *et al.*, 1999).

Existe evidencia que sugiere que la muerte inducida por MPTP o MPP+ involucra la activación de las caspasas. Du *et al.* (1997) demostraron que cuando las neuronas granulares cerebelares eran expuestas a una concentración de 60-300 μ M de MPP+ se inducía la actividad de la caspasa-3. Sólo el inhibidor de la caspasa-3 (Ac-DEVD-CHO) era capaz de proteger a las neuronas granulares cerebelares contra los efectos neurotóxicos del MPP+. El efecto de los inhibidores de caspasas también fue analizado en cultivos de mesencéfalos de rata. En este estudio encontraron que la muerte celular inducida por bajas concentraciones de MPP+ (1-100 μ M) involucraba una actividad de proteasa parecida a la de caspasa-3 (Dodel *et al.*, 1998). Aunque la muerte celular de tipo apoptótica ha sido implicada en la neurotoxicidad inducida por MPTP/MPP+, varios estudios han desafiado el papel de las caspasas en la muerte neuronal inducida por esta neurotoxina. Por ejemplo en la línea celular MN9D, la muerte neuronal inducida por MPP+ no fue reducida por un co-tratamiento con inhibidores universales de caspasas como zVAD-fmk y BAF, ni siquiera por la sobre-expresión de un dominante negativo de Apaf-1/caspasa-9 (Choi *et al.*, 1999). Los tratamientos de MPP+ sobre células MN9D y cultivos primarios de cerebro medio, promovían la translocación del factor de inducción de apoptosis (AIF) hacia el núcleo. AIF es una proteína mitocondrial que puede promover tipos de muerte celular que son

independientes de caspasas (Chu *et al.*, 2005). Debido a lo anterior es probable que los efectos de la neurotoxina MPP+ no siempre requieran de la actividad de las caspasas. Los distintos mecanismos por los cuales el MPTP/MPP+ induce la muerte de tipo apoptótica están ejemplificados en la figura 9.

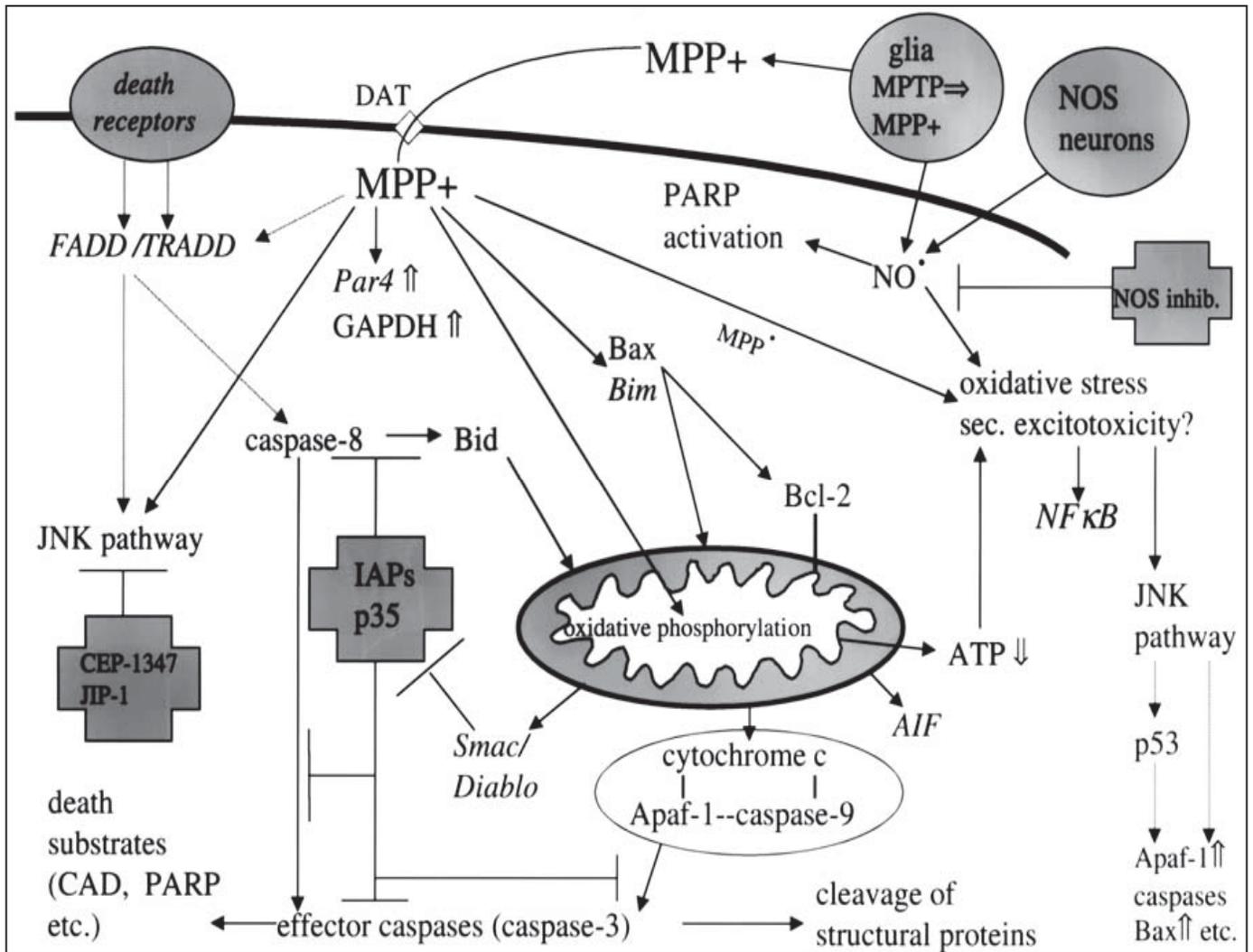


Figura 9. Mecanismos de muerte apoptótica inducidos por MPTP/MPP+. Los mecanismos que no han sido del todo comprobados, pero que sólo tienen un papel hipotético se muestran con líneas punteadas. Ver texto para obtener una explicación detallada de cada mecanismo.

JUSTIFICACION

Las neuronas dopaminérgicas son parte importante de la modulación de la postura y el movimiento. La pérdida de estas neuronas en el adulto se ha vinculado a varias enfermedades neurodegenerativas, incluyendo al Parkinson. Esto ha dirigido una mayor atención hacia el estudio de las neuronas dopaminérgicas. El actual estudio es relevante porque utiliza un modelo de Parkinson, inducido por una neurotoxina, para estudiar la respuesta del tejido embrionario ante la degeneración de las neuronas dopaminérgicas. Para eliminar de manera selectiva a las neuronas dopaminérgicas se propone utilizar a la neurotoxina MPP+. Los efectos que genera esta neurotoxina, así como la respuesta del tejido ante la misma, se pueden estudiar con gran detalle en los cultivos de explantes.

La capacidad de regenerar tejidos u órganos se encuentra ampliamente distribuida en el reino animal. Sin embargo, son pocos los ejemplos de regeneración en los organismos adultos, menos aún son los ejemplos de regeneración del sistema nervioso. Esto podría deberse a que el entorno no es propicio para inducir la regeneración o a restricciones intrínsecas de las células troncales adultas. A diferencia del organismo adulto el embrión presenta una mayor cantidad de células en estado indiferenciado y el ambiente propicio para que se lleve a cabo la regeneración. Basándonos en este contexto sería interesante determinar la capacidad que tiene el mesencéfalo embrionario de ratón de regenerar las neuronas dopaminérgicas. Otra posibilidad es que se identifique una población celular con alto potencial terapéutico para la enfermedad del Parkinson.

Este trabajo tendría un gran impacto sobre el campo de la medicina regenerativa porque pretende determinar capacidad regenerativa del sistema nervioso embrionario. Esto es de gran importancia porque si el tejido embrionario es incapaz de regenerar el tejido nervioso, entonces en teoría el adulto debería de tener una menor posibilidad de regenerar el sistema nervioso.

HIPOTESIS

Ante la neurodegeneración inducida por el MPP+ los precursores neurales proliferan y consecuentemente regeneraran las neuronas DAérgicas del mesencéfalo embrionario.

OBJETIVOS

Objetivo general:

- Determinar la capacidad del mesencéfalo embrionario para regenerar a las neuronas dopaminérgicas después de una lesión con la neurotoxina MPP+.

Objetivos particulares:

- Determinar la concentración de la neurotoxina que disminuya significativamente la población de neuronas DAérgicas del mesencéfalo embrionario.
- Comprobar que la neurotoxina MPP⁺ mate de manera específica a las neuronas dopaminérgicas.
- Caracterizar la respuesta del mesencéfalo embrionario ante el tratamiento.
- Comprobar si las neuronas dopaminérgicas regeneradas provienen de precursores neurales proliferantes.

MATERIALES Y METODOS

Dissección de embriones de E10 de ratón y cultivo de explantes

Medios y soluciones:

1) Dulbecco Modified Eagle Medium (**DMEM**)/F12 con HEPES

Para preparar 1 lt:

- a) Disolver el medio en polvo en aproximadamente 800 ml de H₂O grado cultivo en un vaso de precipitado de 1lt con agitación suave.
- b) Enjuagar el paquete que contenía el medio para recuperar las trazas de medio adheridas al sobre.
- c) Añadir 1.2 g de NaHCO₃.
- d) Agitar hasta disolver.
- e) Ajustar el pH a 6.9, entre 0.2 y 0.3 unidades de pH por debajo del requerido (pH 7.1), ya que el pH aumenta entre 0.1 y 0.3 con la filtración. Se recomienda utilizar HCl 1N en agua de cultivo (añadir el HCl lentamente agitando el medio, 120 gotas aprox.). Esto se tiene que realizar en una campana de flujo laminar vertical.
- f) Ajustar a 1 lt en un matraz volumétrico. Sellar con parafilm y mezclar el medio por inversión.
- g) Esterilizar por filtración a través de una membrana de 0.22 µM.
- h) Guardar a 4°C y utilizar en un periodo de máximo 2 meses.

2) Glutamina-Penicilina-Estreptomicina (GPS).

Preparado con Gluta-Max (Gibco 35050-061)

Para una solución 100x:

- a) Descongelar un frasco de 100 ml de Gluta-Max (200 mM) almacenado a -20°C.
- b) Transferir 10 ml de Gluta-Max a un tubo falcon de 15 ml; agregar la penicilina (300 mg) y la estreptomicina (500 mg) y mezclar hasta que se disuelva.
- c) Esterilizar la solución de GPS por filtración con membrana de 0.22 µM; una vez filtrada mezclarla con los 90 ml restantes del Gluta-Max.
- d) Hacer alícuotas de 5 ml y almacenar a -20°C. Descongelar para utilizar y mantener a 4°C por un periodo máximo de 1 mes.

3) OPTIMEM con Gluta-Max (Gibco 51985)

4) OPTIMIX

Para 50 ml de solución:

- a) Añadir 36 ml de OPTIMEM con Gluta-Max.
- b) Agregar 12.5 ml de DMEM/F12 con HEPES.
- c) Agregar 1 ml de Glucosa 2M.
- d) Añadir 0.5 ml de GPS del stock 100x.

5) Colágena de rata

Para preparar 420 µl:

- a) Agregar 300 µl de medio OPTIMIX.
- b) Añadir 100 µl de colágena de rata.
- c) Agregar 10 µl de NaCl 1.5M
- d) Añadir 10 µl de Bicarbonato de sodio al 7.5%.

Debido a que la colágena gelifica rápidamente a temperatura ambiente la preparación se debe de realizar en hielo y guardar inmediatamente a 4°C.

Procedimiento:

- 1) Disectar los embriones de E10.5 de ratón para obtener el tejido mesencefálico. Una vez que se obtiene el mesencéfalo, éste se abre por la parte dorsal para exponer la línea media ventral. Todas las disecciones se deben de realizar en el medio DMEM/F12 con HEPES.
- 2) Una vez terminada la disección, se utiliza una punta de 1ml cortada en el extremo para colocar 3 mesencéfalos en una caja de Petri de 35mm.
- 3) A continuación se debe de recuperar la mayor cantidad posible del medio DMEM/F12 con HEPES que embebe a los mesencéfalos. Este paso debe de realizarse con rapidez para evitar que los tejidos se sequen.
- 4) Se embebe cada tejido con 30 µl de colágena de rata. Se debe de verificar que los tejidos estén bien sumergidos y acomodados (con el ventrículo hacia arriba). Esto se tiene que hacer de inmediato debido a que la colágena gelifica rápidamente a temperatura ambiente.
- 5) Incubar los tejidos por 50 min a 37°C. Evitar mucho movimiento de los explantes durante su transporte a la incubadora.
- 6) Cubrir los explantes con 2 ml de medio OPTIMIX. Este paso se debe de realizar con mucho cuidado para prevenir que los tejidos se salgan de la gota de colágena.
- 7) Cambiar el medio cada 2 días.

Tratamientos con BrdU

Se utiliza el mismo procedimiento experimental descrito para las disecciones y cultivo de explantes. El BrdU (Roche 1 299 964) se agrega a los cultivos de explantes después del 4to día de cultivo, una vez que haya concluido el periodo de neurogénesis dopaminérgica. Antes realizar el tratamiento con BrdU es necesario remover el medio de cultivo con la neurotoxina. Posteriormente se disuelve el BrdU en medio OPTIMIX a una dilución 1:1000. Una vez que hayan transcurrido 48hrs es necesario cambiar el medio; se vuelve a agregar al cultivo la solución de OPTIMIX/BrdU (1:1000) por un periodo de 24 hrs. El tratamiento con bromodeoxiuridina debe de durar en total unas 72 hrs. La detección del marcaje con BrdU se realiza por medio de inmunohistoquímica con el anticuerpo anti-BrdU acoplado a Alexa-Fluor 594, α -ratón IgG.

Tratamientos con MPP+

Se utiliza el mismo procedimiento experimental descrito para las disecciones y cultivo de explantes. El MPP+(Sigma D048-100mg) se disuelve a la concentración deseada en el medio OPTIMIX durante el cambio de medio. Es importante mencionar que en los cultivos de explantes de E10.5 la neurotoxina se aplica a partir del día 4to de cultivo para permitir la neurogénesis de las neuronas dopaminérgicas. Se prepara una solución stock que tiene una concentración de 500 mM; se diluyen 100 mg de MPP+ en 674 μ l de agua (grado cultivo). Se aplican 4 tratamientos de la neurotoxina a los cultivos de explantes: (i) 10 μ M, (ii) 50 μ M, (iii) 100 μ M y (iv) 200 μ M. Los explantes se exponen por un periodo de 48 hrs a los tratamientos de MPP+ (Choi *et al.*, 1999; Nicotra and Parvez, 2002; Church and Hewett, 2003; Chu *et al.*, 2005). Después de exponer a los explantes al MPP+, los cultivos se mantuvieron por otros 3 días en condiciones basales de cultivo para permitir la regeneración de las neuronas DAérgicas. La regeneración de las neuronas dopaminérgicas se detecta con el marcador de proliferación BrdU. Es importante mencionar que el BrdU sólo va a funcionar si el proceso regenerativo es mediado por progenitores proliferantes. Si la regeneración ocurre a través de la diferenciación de progenitores DAérgicos, entonces la regeneración va a ser detectada por un aumento en la cantidad de neuronas dopaminérgicas presentes en el explante.

Fijación del tejido

Soluciones:

1) Paraformaldehido (PFA) al 4%

Preparar fresco o almacenar alicuotas a -70°C .

Para 10 ml (USAR GUANTES Y CUBREBOCAS):

- a) Tomar 4 ml de H₂O bidestilada.
- b) Agregar 0.4 g de PFA.
- c) Calentar entre 60-70°C en campana de extracción (no sobrecalentar).
- d) Agregar 10 μ l de NaOH 10N y dejar enfriar dentro de la campana.
- e) Añadir 5 ml de PBS 2X.
- f) Ajustar el pH a 7.2 con HCl.
- g) Aforar a 10 ml con H₂O bidestilada.
- h) Filtrar con membrana de 0.22 μ M.

2) PBS

Para 1 lt de solución 1X:

- a) Agregar 8 g de NaCl, 0.2 gr de KCl, 0.2 g de KH_2PO_4 y 0.815 g de Na_2HPO_4 anhidro a 1 lt de agua grado cultivo. Disolver agitando suavemente y esterilizar por filtración a través de membrana de $0.22 \mu\text{M}$.

Almacenar a temperatura ambiente por hasta 2 meses.

Procedimiento:

- 1) Poner los explantes en un tubo eppendorff de 1.5 ml.
- 2) Agregar PFA al 4%.
- 3) Poner los tubos en la agitadora del cuarto frío por un periodo de 2 hrs.
- 4) Hacer 3 lavados con PBS 1X (15 min cada uno).
- 5) Mantener a 4°C hasta por 1 semana.

Cortes en el Criostato

Soluciones y preparación del material:

- 1) Sacarosa al 30%.

Para preparar 50 ml:

- a) Tomar 25 ml de H_2O bidestilada.
- b) Agregar 15 g de sacarosa; disolver agitando suavemente.
- c) Aforar a 50 ml con H_2O bidestilada.
- d) Esterilizar por filtración a través de membrana de $0.22 \mu\text{M}$.

- 2) Gel para la crio-preparación de los tejidos (resina).

- 3) Gelatina de porcino de tipo-A (SIGMA, G1890-100g)

- 4) Preparación de laminillas gelatinizadas

- a) Preparar una solución de gelatina de porcino al 1%.
- b) Poner la solución en un estuche para porta-objetos.
- c) Introducir los porta-objetos en el estuche. Verificar que los porta-objetos estén bien sumergidos. Dejar los porta-objetos sumergidos por 30 min.
- d) Sacar los porta-objetos y dejar que se sequen.
- e) Rotular con el plumón hidrofóbico los bordes.

Procedimiento:

- 1) Substituir el PBS 1X de los tubos eppendorff con los explantes por sacarosa al 30%. Poner los tubos en la agitadora del cuarto frío toda la noche.
- 2) Poner un trozo de hielo seco en un contenedor con alcohol industrial al 100%.
- 3) Colocar una gota del gel para la crio-preparación en un trozo de parafilm. Quitar todas las burbujas con las pinzas de disección.
- 4) Sacar el tejido del tubo eppendorff con sacarosa al 30% y colocarlo en la gota de resina.
- 5) Orientar los mesencéfalos con el ventrículo hacia arriba.
- 6) Poner la platina en contacto con el hielo seco para que enfrie.
- 7) Poner en contacto el parafilm con el alcohol industrial para que la gota de resina que contiene al tejido se congele rápidamente. Tener cuidado de que el alcohol no entre en contacto directo con la resina.

- 8) Agregar un poco de resina en la platina y antes de que se congele completamente, colocar la gota congelada con el tejido encima de la base de resina para que se pegue a la platina.
- 9) Colocar la platina en el crióstato y realizar cortes de 10 μm . Los cortes se deben de realizar en el crióstato a una temperatura alrededor de los -25°C.
- 10) Los cortes deben de ser recuperados con las laminillas gelatinizadas. Dichas laminillas deben de almacenarse a -70°C en el REVCO hasta que vayan a ser procesadas.

Imunohistoquímica

Soluciones

- 1) PFA al 4%
- 2) Tritón X-100
- 3) Suero de oveja (SS, por sus siglas en inglés "sheep serum")
- 4) Acido clorhídrico 2N

| 5) Anticuerpos primarios: Dilución | <u>Concentración</u> |
|---|----------------------|
| (a) Anticuerpo policlonal anti-TH (Chemicon, Temecula, CA) | 1:500 |
| (b) Anticuerpo monoclonal anti- β III Tubulina (Chemicon, Temecula, CA) | 1:100 |
| (c) Anticuerpo policlonal anti- β III Tubulina (Chemicon, Temecula, CA) | 1:2000 |
| (d) Anticuerpo monoclonal anti-NeuN (Chemicon, Temecula, CA) | 1:100 |
| (e) Anticuerpo anti-BrdU acoplado a Alexa-Flour 594, α -ratón IgG | 1:200 |
| (f) Anticuerpo policlonal anti-AIF(Santacruz) | 1:250 |
| (g) Anticuerpo policlonal anti-IgG (DakoCytomation) | 1:50 |
| (h) Anticuerpo monoclonal anti-Nestin (Chemicon, Temecula, CA) | 1:200 |
| (i) Anticuerpo monoclonal anti-Nkx2.2 | 1:2 |
| (j) Anticuerpo policlonal anti-Lmx1a | 1:1000 |
| (k) Anticuerpo policlonal anti-Histona H3 fosforilada (Upstate) | 1:100 |

6) Anticuerpos secundarios:

- (a) Alexa-Flour 647 α -ratón IgG hecho en cabra (Molecular Probes)
- (b) Alexa-Flour 594 α -ratón IgG hecho en cabra (Molecular Probes)
- (c) Alexa-Flour 488 α -ratón IgG hecho en cabra (Molecular Probes)
- (d) Alexa-Flour 647 α -conejo IgG hecho en cabra (Molecular Probes)
- (e) Alexa-Flour 594 α -conejo IgG hecho en cabra (Molecular Probes)
- (f) Alexa-Flour 488 α -conejo IgG hecho en cabra (Molecular Probes)

Todos se utilizaron en una dilución de 1:1000.

7) DAPI (Molecular Probes) se utiliza a una dilución 1:1000

8) Solución de montaje
Para preparar 50 ml:

- a) Mezclar 25 ml de glicerol con 25 ml de NaHCO_3 0.1M con un pH de 9.0.

- b) Agregar 0.4 mg/ml de p-phenilendiamina para evitar el quencheo de la fluorescencia.

Procedimiento:

- 1) Dejar secar los cortes por 30 min. Si fueron congelados en el REVCO, descongelar los cortes por 40 min a 4°C y posteriormente dejar secar las laminillas a temperatura ambiente por 20 min.
- 2) Fijar los cortes por 2 min con PFA al 4%.
- 3) Hacer 3 lavados con PBS 1X (5 min cada uno).
- 4) Permeabilizar los cortes con PBS/Tritón 1% por 5 min¹.
- 5) Hacer 3 lavados con PBS 1X (5 min cada uno).
- 6) Incubar con anti-IgG por 30 min. EXCLUSIVAMENTE PARA LOS PROCEDIMIENTOS QUE UTILICEN ANTICUERPOS MONOCLONALES.
- 7) Bloquear 1 hr con PBS/10% SS/0.2% Tritón.
- 8) Incubar anticuerpo primario 2 hrs diluido en PBS/10%SS/0.2%Tritón.
- 9) Hacer 3 lavados con PBS/1% Tritón (5 min cada uno).
- 10) Incubar anticuerpo secundario 40 min diluido en PBS/10% SS/1% Tritón.
- 11) Hacer 3 lavados con PBS/1% Tritón (5 min cada uno).
- 12) Incubar DAPI por 2 min.
- 13) Hacer 3 lavados con PBS/1% Tritón (5 min cada uno).
- 14) Montar cortes en glicerol/buffer de fosfatos (solución de montaje).

Procedimiento para la detección de BrdU y TH:

- 1) Dejar secar los cortes por 30 min. Si fueron congelados en el REVCO, descongelar los cortes por 40 min a 4°C y posteriormente dejar secar las laminillas a temperatura ambiente por 20 min.
- 2) Fijar los cortes con PFA al 4% por 2 min.
- 3) Hacer 3 lavados con PBS¹
- 4) Permeabilizar con ácido clohídrico (HCl) 2N por 20 min.
- 5) Hacer 3 lavados con PBS
- 6) Permeabilizar con PBT 0.2% por 20 min
- 7) Buferear el tratamiento de HCl con 0.1M de ácido bórico pH=8.5 por 20 min.
- 8) Hacer 3 lavados con PBS
- 9) Bloquear 30 min con PBS/SS 10%/Tritón 0.2%.
- 10) Incubar anticuerpo primario anti-TH y anti-BrdU (acoplado a fluoroforo 594 nm) diluido en PBS/SS 10%/Tritón 0.2% por 1 hr.
- 11) Hacer 3 lavados con PBT 1%
- 12) Incubar anticuerpo secundario Alexa-Fluor 488 nm anti-conejo diluido en PBS/SS 10%/Tritón 0.2% por 30 min.
- 13) Hacer 3 lavados con PBT 1%
- 14) Incubar con DAPI por 2 min.
- 15) Hacer 3 lavados con PBT 1%
- 16) Montar cortes en glicerol/buffer de fosfatos.

TUNEL (Roche 11 684 795 910)

- a) Fijar las células con PFA al 4%por 10 min.
- b) Lavar 3 veces con PBS 1X.

¹ A partir de este momento con mezclado moderado en el agitador orbital.

- c) Incubar con la solución de permeabilización previamente enfriada (0.1% de Tritón X-100 en 0.1% de citrato de sodio en PBS) por 10 min en hielo.
- d) Lavar 3 veces con PBS
- e) Agregar 25 µl de solución de reacción TUNEL (1:10 transferasa:nucleótidos marcados) por cada cuadro de la lamilla. Cubrir con un pedazo de parafilm cada pozo para distribuir homogéneamente la solución en toda la muestra.
- f) Incubar en cámara húmeda por 1¹/₂ hrs a 37°C.
- g) Lavar 3 veces con PBS.
- h) Teñir con DAPI por 2 min.
- i) Lavar 3 veces con PBS.
- j) Montar

La señal de TUNEL se puede detectar en verde (Fluoresceína) o rojo (TMR).

Análisis de resultados

El análisis de las inmunohistoquímicas y TUNEL fue realizado utilizando un microscopio invertido de fluorescencia (Nikon Eclipse TE300) y una cámara fotográfica (CoolSNAP RS Photometrics). También se realizaron análisis en el área de microscopía confocal que cuenta con un sistema confocal Bio-Rad MRC600, laser Kr-Ar, con tres líneas de excitación a 488 nm, 568 nm y 647 nm, adaptado a un microscopio de epi-fluorescencia Axioskop de Zeiss de óptica infinita, con objetivos: Plan Neofluar de 5X/0,15, 10X/0,30 Ph1, 20X/0,50 Ph2, 40X/0,75 Ph2, DIC y 100X/1,3 Ph3 oil. Un objetivo C-Apochromat 63X/1.2 W Korr, Ph 3, DIC y un objetivo Plan-Apochromat 100X/1.4 oil Iris. Tiene acoplado un motor-Z para realizar cortes ópticos de hasta 0.18 µm, un digitalizador de imágenes y cámara fotográfica. Asimismo, cuenta con software especializado para la deconvolución y reconstrucción de imágenes 3-D.

RESULTADOS

Selección de la concentración de MPP⁺

El primer objetivo de este trabajo fue determinar experimentalmente la concentración del MPP⁺ que disminuya significativamente la población de neuronas DAérgicas del mesencéfalo embrionario. Para cumplir este objetivo y con base en lo reportado, se optó por experimentar con 4 concentraciones de la neurotoxina en los cultivos de explantes: (i) 10 μ M, (ii) 50 μ M, (iii) 100 μ M y (iv) 200 μ M. El tiempo de exposición de los cultivos de explantes a las distintas concentraciones de MPP⁺ fue por un periodo fijo de 48hrs (Choi *et al.*, 1999; Nicotra and Parvez, 2002; Church and Hewett, 2003; Chu *et al.*, 2005).

Para determinar el efecto de las diferentes concentraciones de MPP⁺ sobre el número de neuronas DAérgicas presentes en los explantes, se cuantificó el número total de neuronas dopaminérgicas presentes en los tejidos tratados y controles. Para identificar a la población DAérgicas se realizó inmunohistoquímica contra la TH. Los tratamientos con las concentraciones de 100 y 200 μ M provocaron la degeneración de casi toda la población dopaminérgica. Es decir, después de los tratamientos con 100 y 200 μ M, se encontraron muy pocas células inmunoreactivas para TH en los explantes. Sin embargo, un análisis más detallado de estos tejidos demostró que estas concentraciones estaban siendo tóxicas para todo el explante. Los tejidos tratados con estas concentraciones mostraron ser más lábiles, estimado por el mayor número de núcleos condensados y células TUNEL⁺. Los tejidos controles presentaron en promedio 2823 neuronas DAérgica, mientras que los tejidos tratados con 10 μ M de MPP⁺ presentaron en promedio 2311 neuronas dopaminérgicas. Esto representa una disminución de la población DAérgica de 512 células (18% \pm 3.6%), pero esta disminución no fue significativa (n=3; P<0.157). Por otro lado, los tejidos tratados con 50 μ M de MPP⁺ presentaron en promedio 1502, esto representa una disminución de la población DAérgica de 1320 células (47% \pm 12.1%). Este tratamiento disminuyó significativamente el número total de neuronas dopaminérgicas presentes en el mesencéfalo embrionario (n=3, P<0.03; Figura 10).

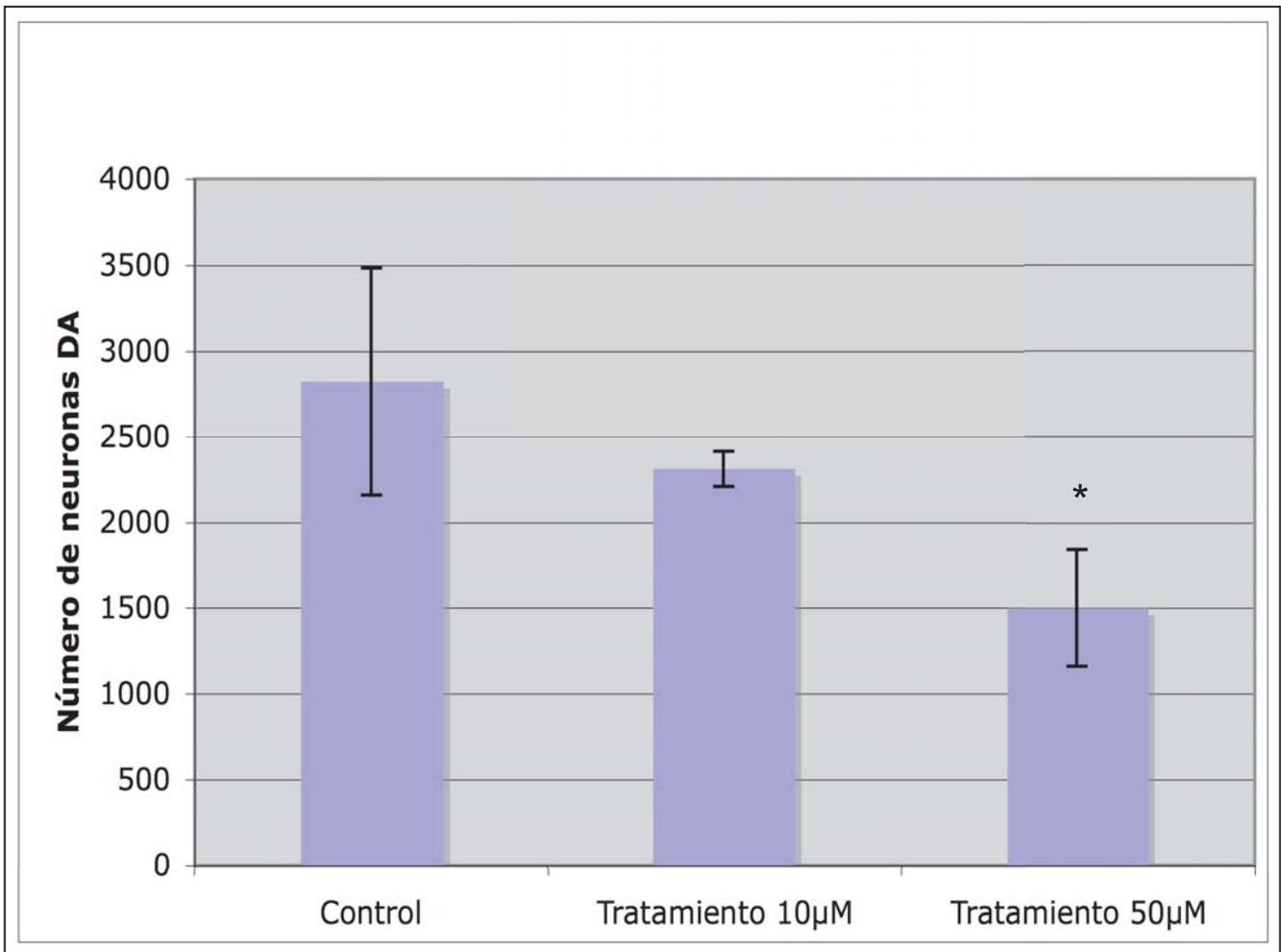


Figura 10. Selección de la concentración de MPP⁺. Los tratamientos con MPP⁺ producen una disminución en el número total de neuronas presentes en la región ventral del mesencéfalo embrionario. El tratamiento con 10 µM de MPP⁺ provocó una disminución no significativa en la población DAérgica. El tratamiento con 50 µM de MPP⁺ disminuyó significativamente el número total de neuronas dopaminérgicas del cerebro medio (* P<0.0275). Las barras de error representan la desviación estándar.

Degeneración de las neuronas dopaminérgicas

Es importante señalar que nuestro método para cuantificar a las neuronas DAérgicas sólo nos permite determinar la diferencia en el número de células inmunoreactivas para TH, entre los tejidos tratados y los controles. Es decir, es una evidencia indirecta de que la neurotoxina está provocando la degeneración de las neuronas DAérgicas. Debido a esto fue necesario realizar experimentos adicionales para comprobar de manera directa que las neuronas dopaminérgicas estuvieran degenerando a consecuencia del tratamiento. Se utilizó la técnica de TUNEL para demostrar que los tejidos tratados con 50 μM de MPP⁺ presentaban neuronas DAérgicas en proceso de muerte celular. En la Figura 11a se puede observar que las neuronas dopaminérgicas de los tejidos tratados presentan características típicas de la neurotoxicidad inducida por el MPP⁺: (i) las células son inmunoreactivas para TUNEL, (ii) se produce la degeneración de las neuritas, (iii) el soma se vuelve más redondo y los núcleos más pequeños (compactos). En los controles no se encontraron neuronas DAérgicas que fueran inmunoreactivas para TUNEL (Figura 11b). Además, las neuronas dopaminérgicas en los tejidos control presentan neuritas y una morfología menos redonda. Por otro lado, la cantidad de neuronas DAérgicas presentes en los controles es significativamente mayor que en los tejidos tratados ($n=3$, $P<0.0275$). En resumen, se logró encontrar un tratamiento de MPP⁺ que promueve la degeneración de las neuronas dopaminérgicas.

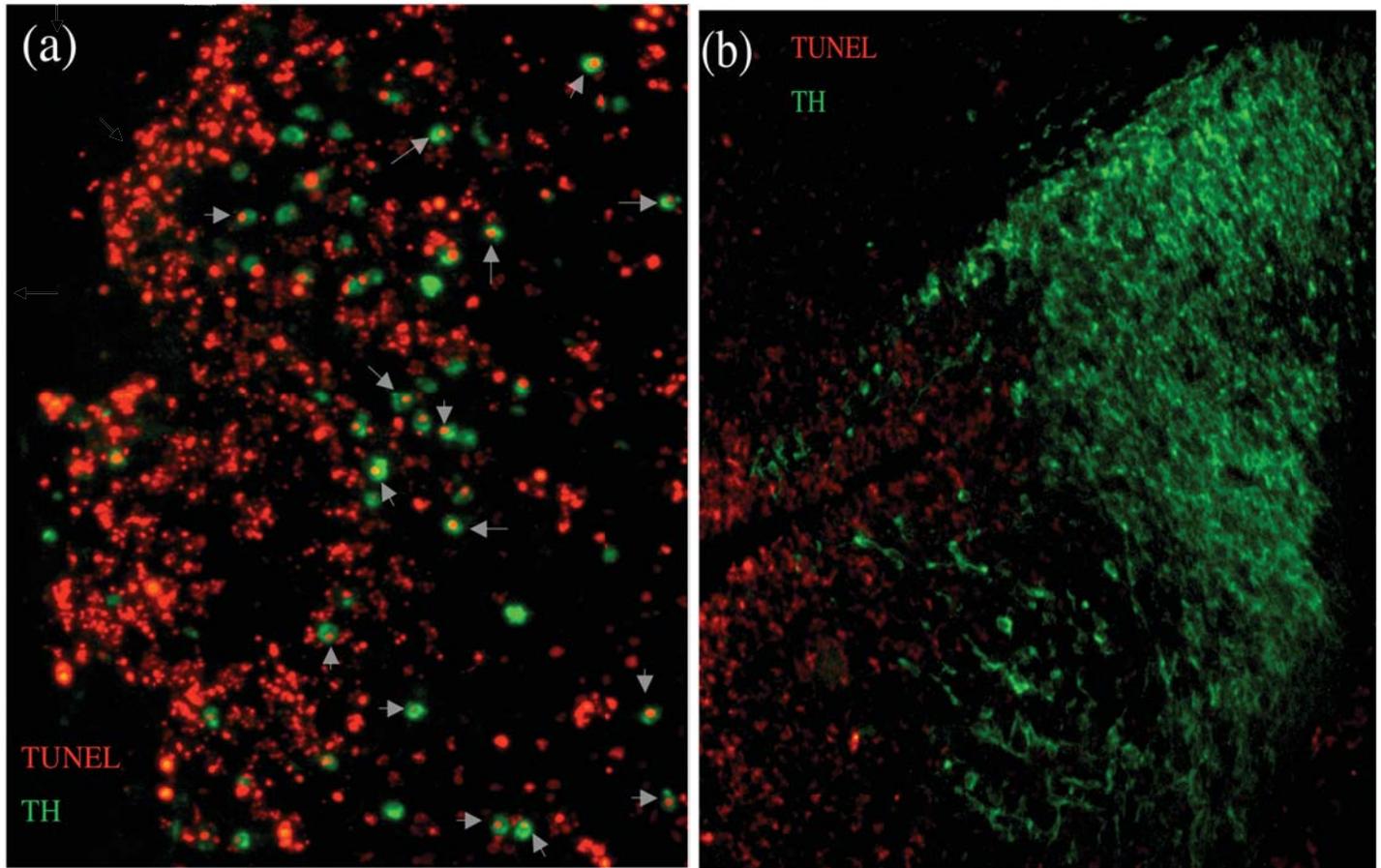


Figura 11. El MPP⁺ a una concentración de 50 μM induce la muerte de las neuronas DAérgicas. (a) Tejido tratado con 50 μM de MPP⁺ por 48hrs a partir del 4^o día; (b) tejido control, cultivado por 6 días pero sin MPP⁺. Inmunohistoquímica para detectar TH (verde) y TUNEL (rojo). Las flechas muestran células TH⁺ / TUNEL⁺. Nótese que las neuronas DAérgicas que están en proceso de degeneración han perdido las neuritas.

Especificidad de la neurotoxina

El tratamiento con 50 μM de MPP^+ se consideraría específico, siempre y cuando, no se afectaran otras poblaciones neuronales presentes en el mesencéfalo embrionario. Para determinar si la neurotoxina seguía siendo específica a la concentración de 50 μM , se cuantificó el número total de neuronas maduras NO-dopaminérgicas y el número de neuronas DAérgicas maduras presentes en el explante. Para determinar la presencia de neuronas maduras en el explante se utilizó el marcador nuclear NeuN. En la Figura 12a se muestra un ejemplo de la distribución de las neuronas maduras y población dopaminérgica en el mesencéfalo embrionario. Se consideraron como neuronas DAérgicas maduras aquellas células que fueran inmunoreactivas para TH y NeuN, mientras que las células inmunoreactivas sólo para NeuN se consideraron como neuronas maduras NO-dopaminérgicas. El resultado obtenido fue que en los tejidos tratados con MPP^+ el número total de neuronas DAérgicas maduras fue significativamente menor que en los controles ($P < 0.03629015$). Por otro lado, el número total de células $\text{TH}^-/\text{NeuN}^+$ (neuronas maduras NO-dopaminérgicas) presentes en el explante no varió significativamente entre los tejidos tratados y los controles (Figura 12b). Se calculó un cociente que nos permitiera comparar el efecto de la neurotoxina sobre las neuronas maduras presentes en el mesencéfalo embrionario. Para esto se dividió el número de neuronas DAérgicas maduras ($\text{TH}^+/\text{NeuN}^+$) sobre el número de neuronas maduras NO-dopaminérgicas ($\text{TH}^-/\text{NeuN}^+$). Este análisis nos indica que el MPP^+ a una concentración de 50 μM induce una reducción significativa en la proporción de neuronas DAérgicas maduras con respecto a las neuronas maduras NO-dopaminérgicas ($P < 0.020674794$; Figura 12c).

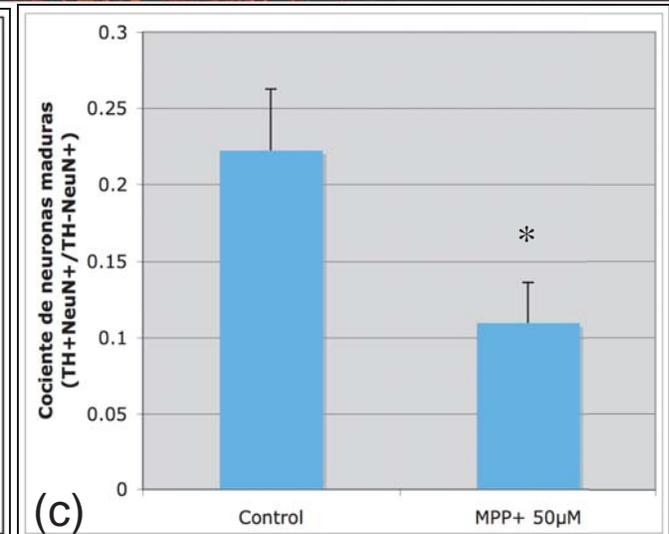
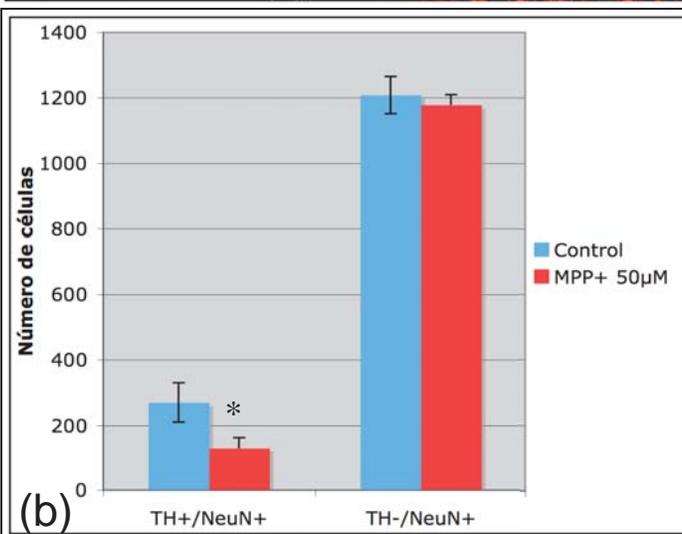
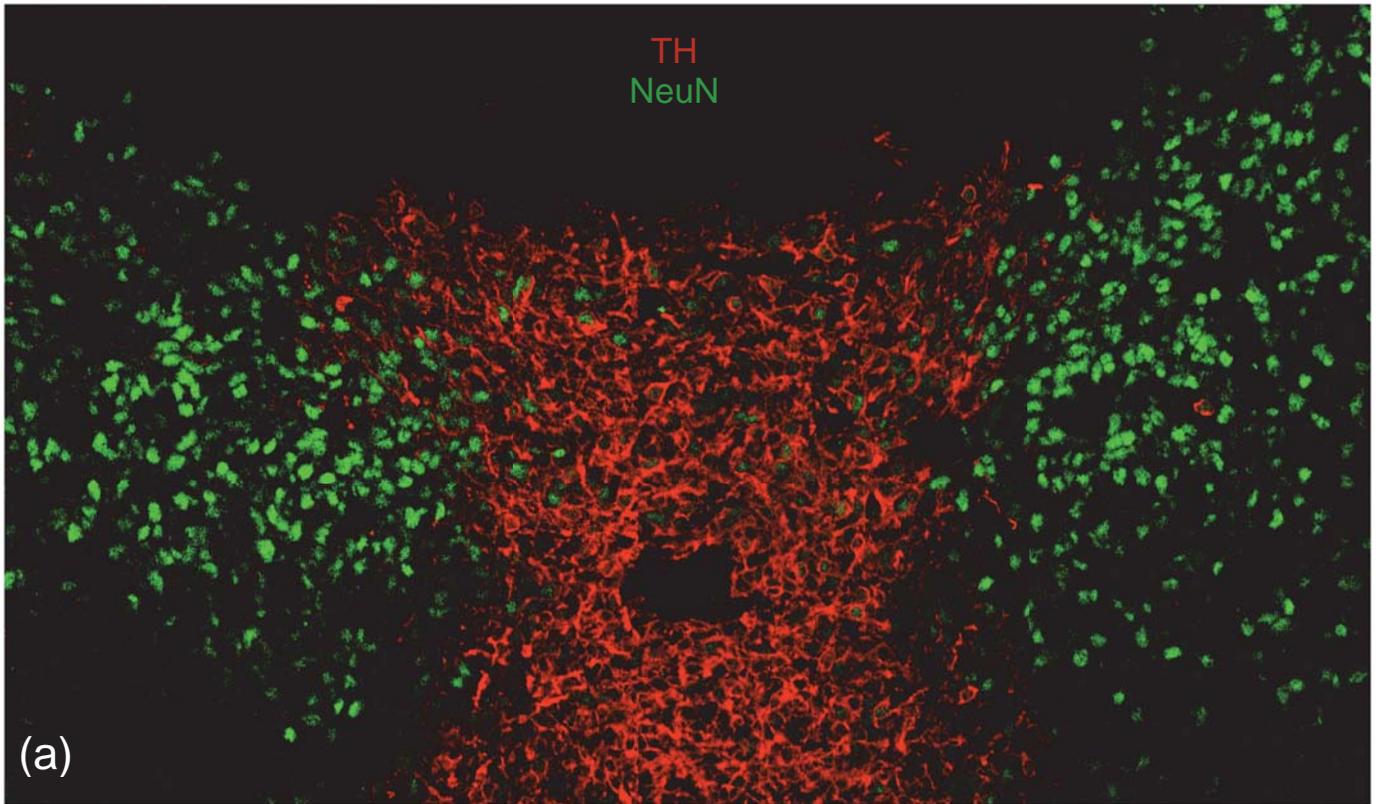


Figura 12. Especificidad del tratamiento (50µM MPP⁺). (a) Inmunohistoquímica para detectar TH (rojo) y NeuN (verde). (b) Cuantificación del número de neuronas maduras NO-dopaminérgicas (TH⁻/NeuN⁺) y el número de neuronas DAérgicas maduras (TH⁺/NeuN⁺) presentes en los explantes tratados y en los controles. En los tejidos tratados con 50µM MPP⁺ se produjo una disminución significativa en el número total de neuronas DAérgicas maduras ($P < 0.03629015$). (c) Cálculo del cociente obtenido de tal forma que nos permitiera comparar el efecto de la neurotoxina sobre las neuronas maduras presentes en el mesencéfalo embrionario. La diferencia fue significativa entre los tejidos tratados y controles ($P < 0.020674794$).

Respuesta del mesencéfalo embrionario ante el tratamiento con MPP⁺

Los explantes de mesencéfalos embrionarios de E10.5 concluyen el periodo de neurogénesis dopaminérgica alrededor del día 4 de cultivo. La hipótesis de éste trabajo es que la neurodegeneración inducida por la neurotoxina va a promover la proliferación de los precursores neurales y consecuentemente la regeneración de las neuronas DAérgicas. Para poner a prueba esta hipótesis se optó por agregar un marcador de proliferación celular a los cultivos. Por lo mismo, los explantes fueron tratados con BrdU por un periodo de 72hrs. El tratamiento con BrdU se aplicó tanto a los tejidos tratados como a los controles. En este diseño experimental, aquellas células que resultaran inmunoreactivas para TH y BrdU podrían considerarse como neuronas dopaminérgicas regeneradas. Esto es debido a que el BrdU se agregó a partir del 6° día de cultivo y los explantes no deberían de presentar proliferación en la región ventral después del 4° día de cultivo.

Un resultado interesante es que después del tratamiento con 50 μ M de MPP⁺ los tejidos tratados presentaron una proliferación masiva en la región ventral del mesencéfalo embrionario. Es muy importante enfatizar que la proliferación detectada se ubicó mayoritariamente en el nicho dopaminérgico. Un análisis preliminar nos llevó a pensar que los explantes tratados con la neurotoxina fueron capaces de regenerar parcialmente a las neuronas DAérgicas. Lo anterior debido a que un gran número de células presentes en la región ventral del mesencefalo embrionario aparentaban ser inmunoreactivas tanto para TH como para BrdU (Figura 13c-d). Un análisis más detallado con microscopía confocal reveló que sólo unas cuantas células eran doble positivas para TH y BrdU. La mayoría de las células que proliferaron en respuesta al tratamiento con MPP⁺ no eran neuronas dopaminérgicas (Figura 14). Sin embargo, es posible afirmar que la proliferación detectada es una respuesta específica al tratamiento, principalmente porque no se observa en los controles. Otro resultado interesante es que prácticamente todas las células inmunoreactivas para BrdU se encuentran restringidas a la región de neurogénesis dopaminérgica.

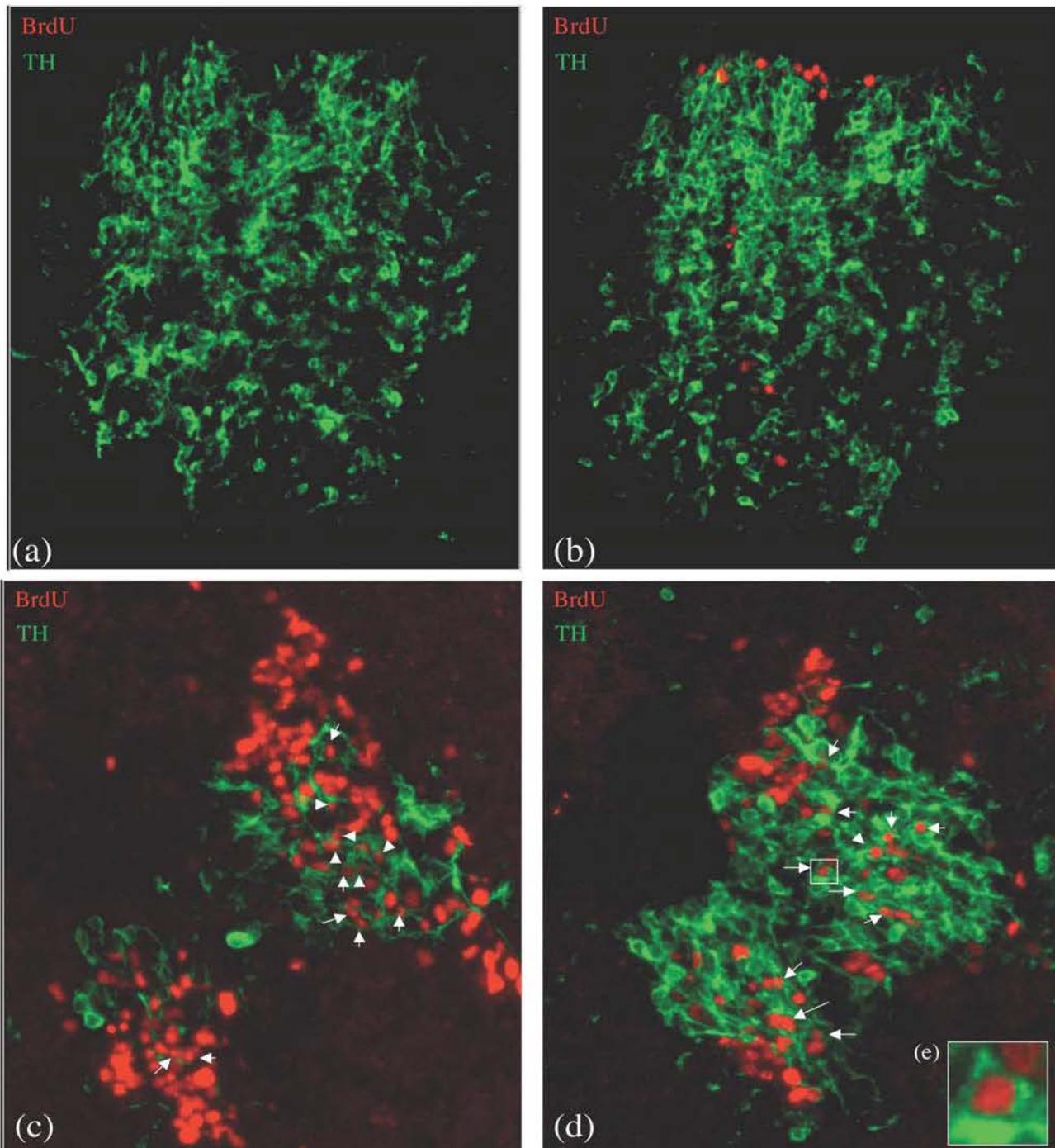


Figura 13. Experimento regeneración. Inmunohistoquímica para detectar TH (verde) y BrdU (rojo). (a) Tejido control. Estos tejidos fueron cultivados en medio OPTIMIX sin MPP⁺ por 6 días, posteriormente se cultivaron las muestras con BrdU por 72 hrs. (b-d) Tejidos tratados. El tratamiento consistía en agregar 50 μ M de MPP⁺ a partir del 5^o día de cultivo. Las muestras tratadas estuvieron expuestas al MPP⁺ por 48hrs, posteriormente se cambió el medio de cultivo y se agregó BrdU por 72hrs para detectar la proliferación. En respuesta al tratamiento se produce una proliferación abundante en la región de neurogénesis de las neuronas DAérgicas. (e) Aumento del recuadro señalado en (d). Las flechas muestran células que aparentemente son TH⁺/BrdU⁺.

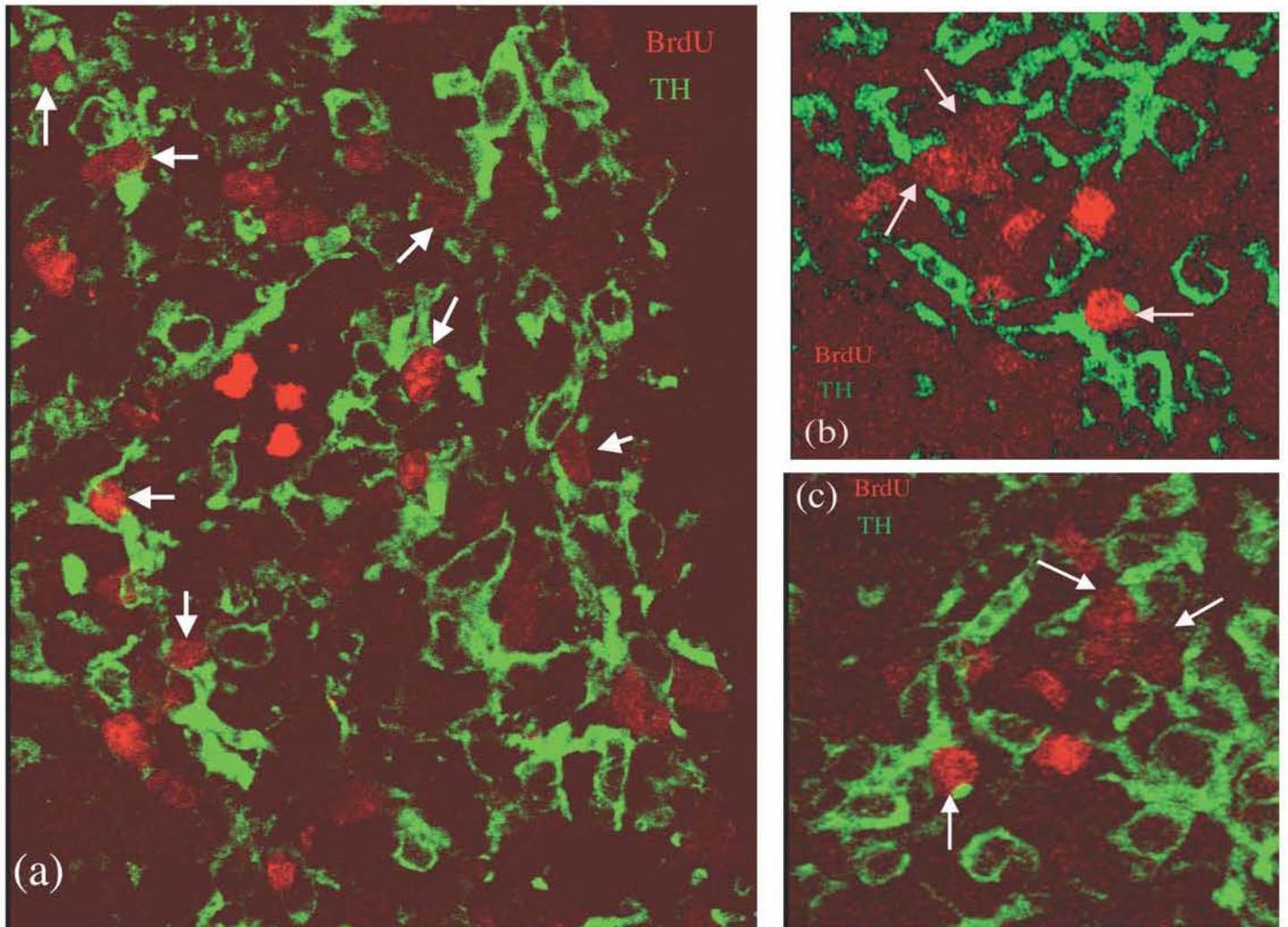


Figura 14. Precusores proliferantes no diferenciaron a neuronas DAérgicas. Imágenes tomadas con microscopía confocal. Inmunohistoquímica para detectar TH (verde) y BrdU (rojo). (a) Imagen a 20x; (b-c) imagen a 40x. Las flechas muestran células que son TH/BrdU⁺, estas son las células que aparentaban ser neuronas dopaminérgicas regeneradas en la figura 13.

La incorporación de BrdU no es consecuencia de la reparación del ADN

Aunque la incorporación de BrdU en los tejidos tratados parece ser el reflejo de una respuesta proliferativa de los explantes, es necesario descartar la posibilidad de que el BrdU haya sido incorporado como consecuencia de un daño al ADN. Es poco probable que el BrdU haya ocasionado algún daño al ADN debido a que los controles que no fueron tratados con la neurotoxina, pero sí expuestos al BrdU, no presentaron la incorporación de éste marcador de proliferación (Figura 13a). Es decir, los controles tratados sólo con BrdU no presentaron la respuesta observada en los tejidos tratados con MPP⁺. Otro indicio de que el fenómeno que observamos en los tejidos tratados era en efecto proliferación, es que varias de las células inmunoreactivas para BrdU, también eran positivas para la histona H3 fosforilada (H3). La H3 se utilizó para corroborar la proliferación observada en los tejidos tratados, debido a que es marcador de mitosis (Figura 15-16c). La expectativa es que no todas las células inmunoreactivas para BrdU, resulten positivas para la H3. Esto es debido a que la H3 sólo marca las células que estén en mitosis al momento que fueron fijadas, mientras que el BrdU sirvió como marcador de las células que proliferaron en un periodo de 72hrs. Mas aún, aquellas células que incorporaron el BrdU conservaron el marcaje, e incluso lo heredaron a su progenie, a pesar de ya no estar en proliferación.

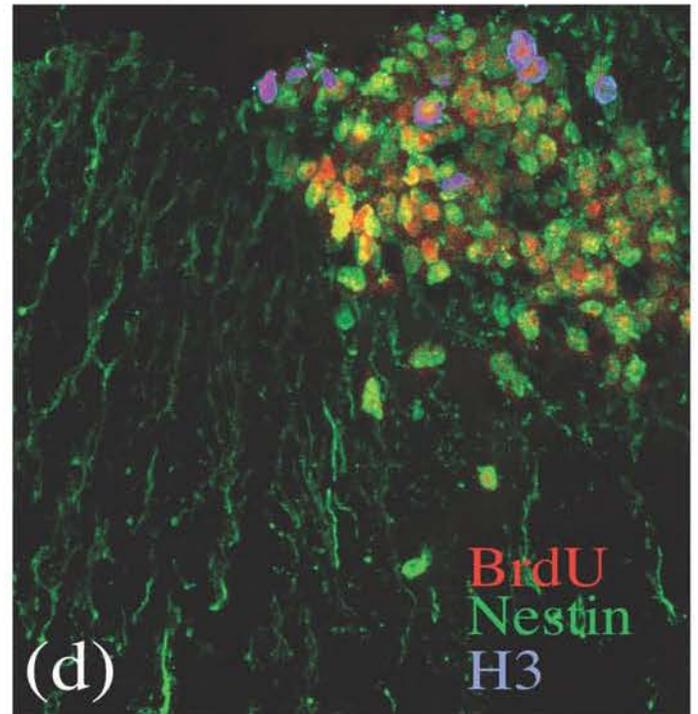
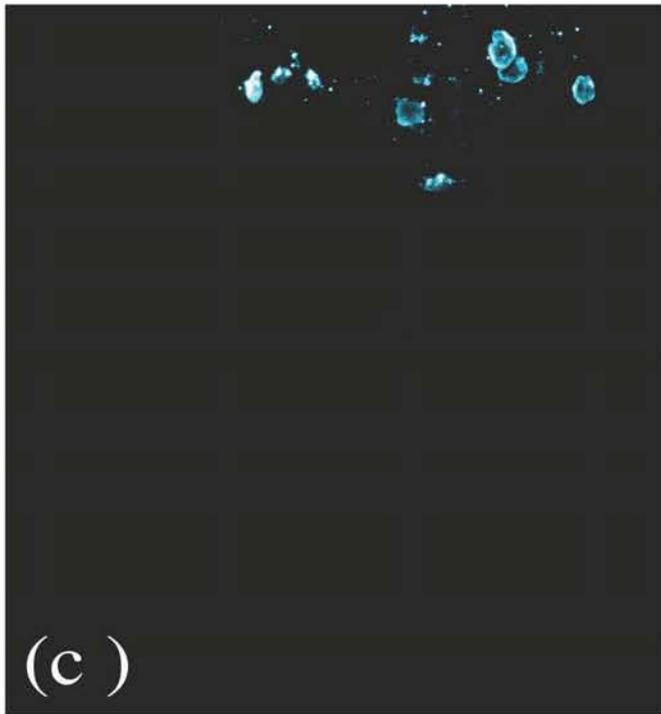
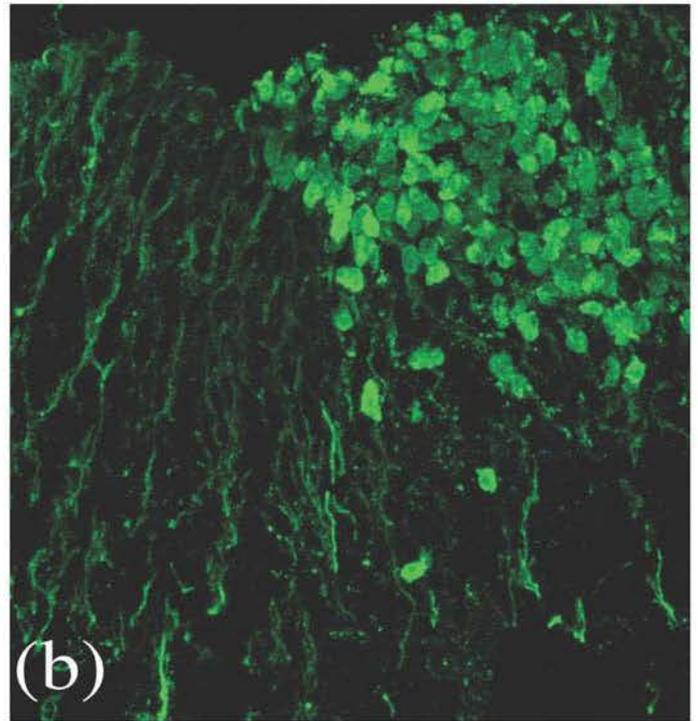
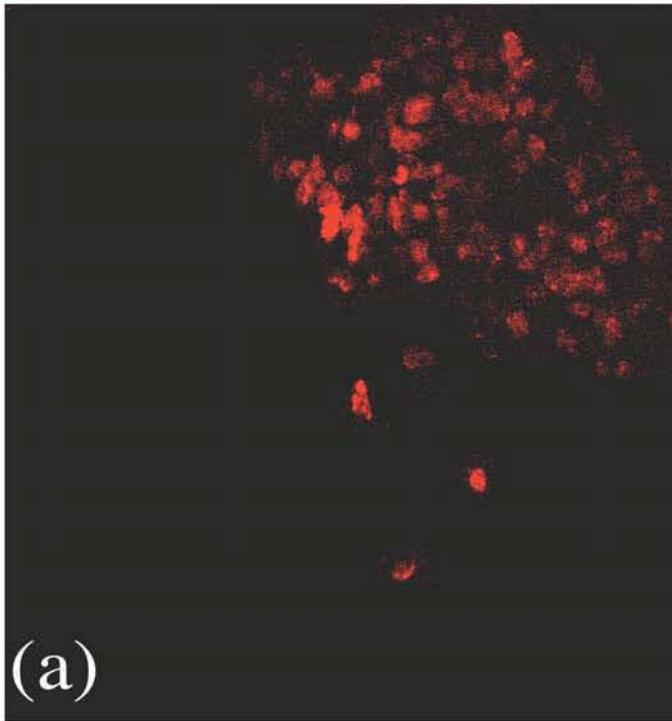


Figura 15. El marcador de mitosis H3 confirma la proliferación. (a)-(d)Tejido tratado (50 μ M de MPP⁺). (d) Sobrelape de los canales (a-c). Inmunohistoquímica para detectar BrdU (a, rojo), Nestina (b, verde) e histona H3 fosforilada (c, azul). Imágenes tomadas con microscopía confocal.

Proliferación de los precursores neurales

Debido a que los explantes sufrieron una neurodegeneración es posible que las células proliferantes sean progenitores, precursores neurales o glía. En tal caso, estas células podrían formar parte de un proceso regenerativo o de reparación de la región ventral del mesencéfalo embrionario. En la región ventricular del mesencéfalo se encuentran los precursores neurales DAérgicos (Andersson *et al.*, 2006). En contraste, en la región pial se ubican las neuronas DAérgicas maduras (Ang, 2006). En la Figura 16 se muestra un corte coronal del mesencéfalo embrionario de ratón. Un resultado muy interesante es que una gran parte de las células proliferantes estaban concentradas en la región ventricular, sitio en cuál se encuentran los precursores neurales (Figura 16b-c). Debido a lo anterior se optó por hacer inmunohistoquímica contra Nestina (Figura 15, 16 y 17). Nestina es una proteína de filamento intermedio que se expresa en las células troncales neuroepiteliales presentes en etapas tempranas del desarrollo del SNC. Se ha utilizado generalmente como marcador de las células troncales neurales y precursores neurales de mamíferos. Esto se realizó para determinar la naturaleza de las células inmunoreactivas para BrdU. Análisis de la región ventricular de los tejidos tratados nos muestra que los precursores neurales proliferaron en respuesta al tratamiento (15, 16c y 17a-d). Cabe destacar que esta proliferación no se observó en los tejidos control (Figura 16d y 17e-h). Un dato muy importante es que la gran mayoría de las células proliferantes eran precursores neurales (BrdU⁺/Nestina⁺ 96.88 ± 0.26%). Algunas de estas células también son inmunoreactivas para H3, descartando la posibilidad de que los precursores neurales hayan incorporado BrdU por daño a su ADN (Figura 15, 16 y 17). Adicionalmente, los tejidos tratados presentan un incremento muy significativo en la cantidad de precursores neurales proliferantes cuando se comparan con los controles (P<1.788E-10). Por otro lado, la cantidad de células que proliferaron, que no fueron inmunoreactivas para Nestina, no variaron significativamente entre los explantes tratados y controles (Figura 17i). Esto sugiere que la respuesta de los tejidos tratados esta dirigida a regenerar las neuronas perdidas.

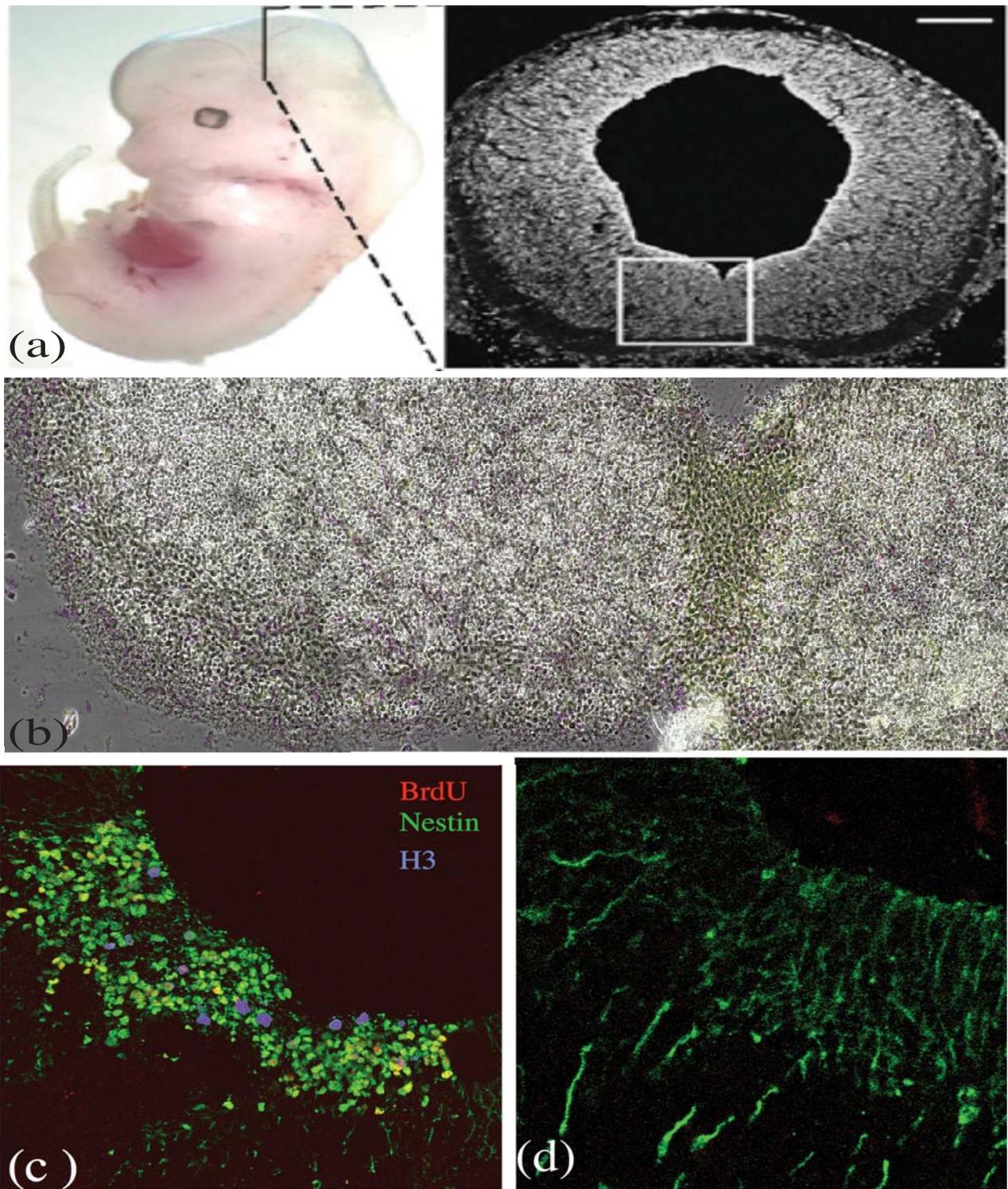


Figura 16. Proliferación de los precursores. (a) Corte coronal del mesencéfalo embrionario, en el recuadro se muestra la región ventral del cerebro medio. (b) Región ventral del mesencéfalo embrionario de un tejido tratado ($50 \mu\text{M}$ de MPP^+). (c) Región ventricular en la cual se ubican los precursores DAérgicos. Se muestra la proliferación de los precursores. (d) Tejido control con BrdU. Inmunohistoquímica para detectar Nestina (verde), BrdU (rojo) e histona H3 fosforilada (azul).

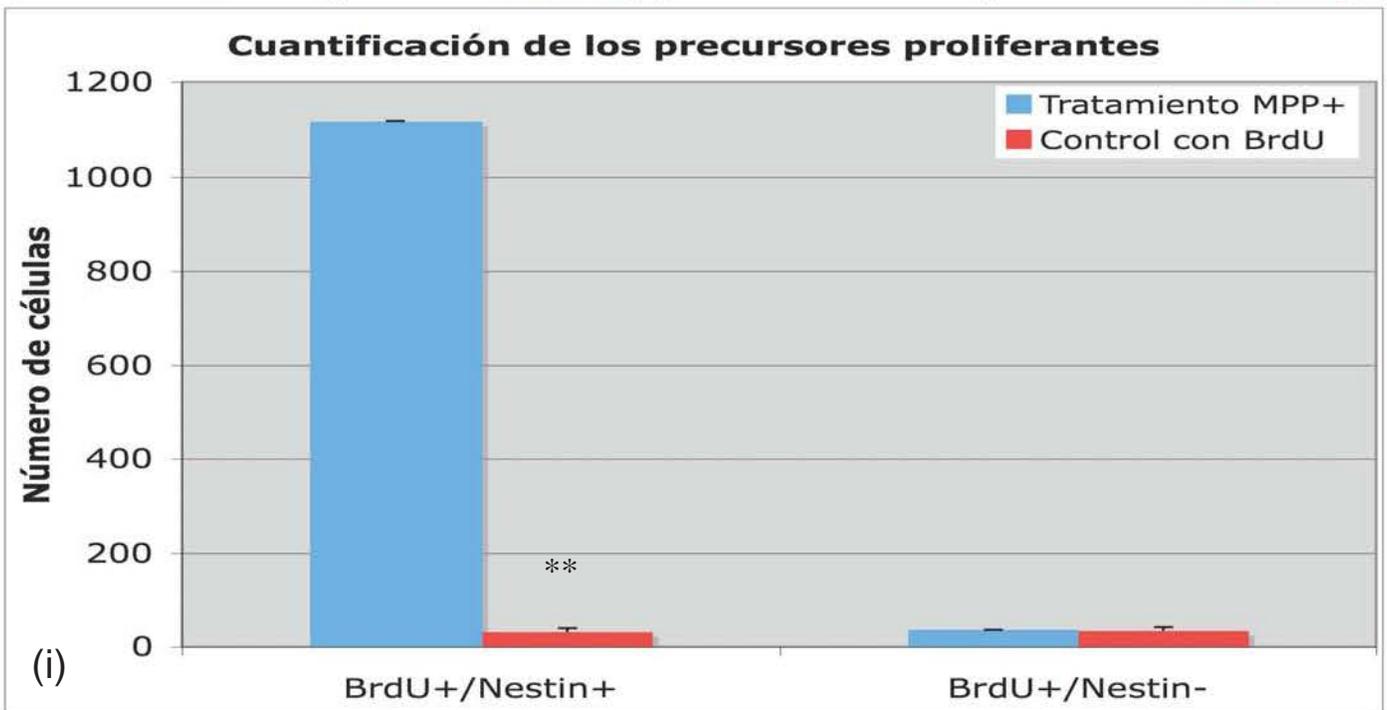
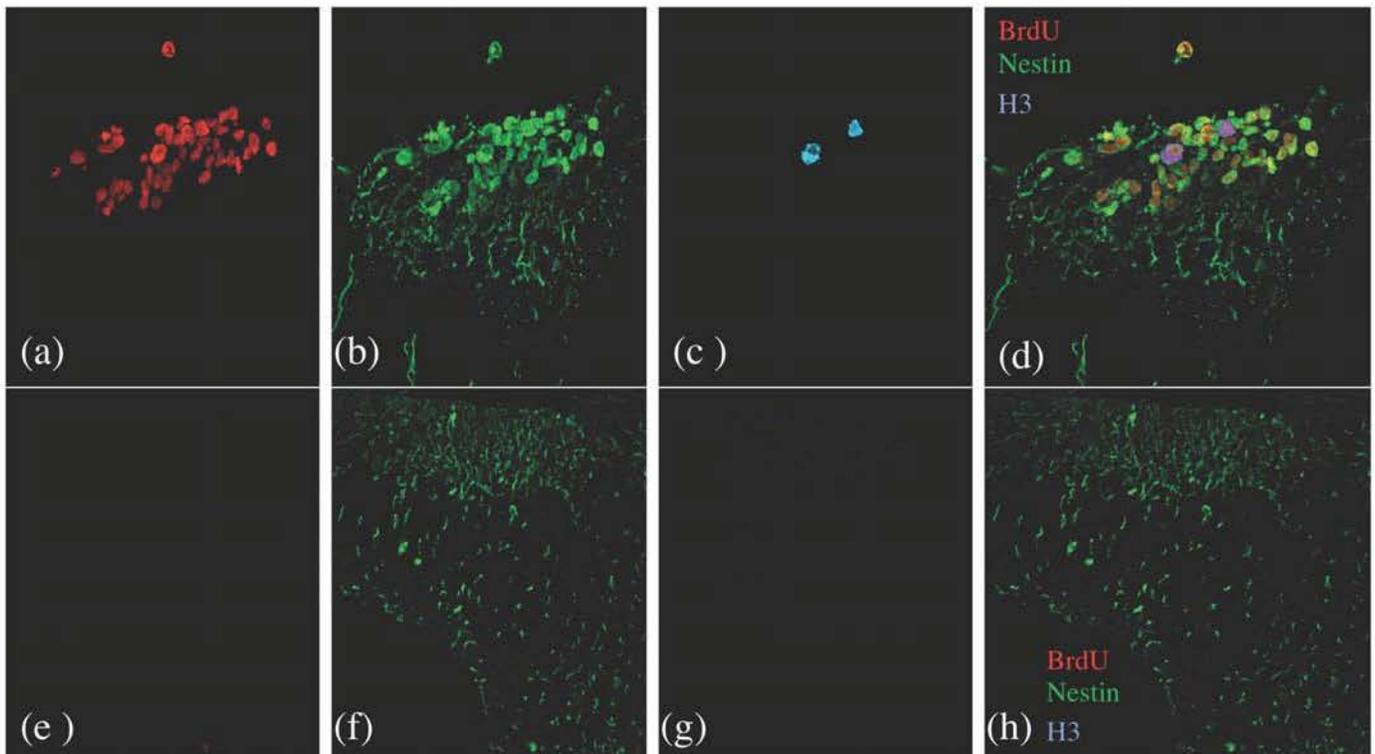


Figura 17. Proliferación de los precursores. (a-d) Tejido tratado (50 μM de MPP⁺). (e-h) Tejido control con BrdU. Inmunohistoquímica para detectar BrdU (a,e; rojo), Nestina (b, f; verde) e histona H3 fosforilada (c, g; azul). (d) Sobrelape de los canales (a-c). (h) Sobrelape de los canales(e-g). Imágenes tomadas con microscopía confocal. (i) Cuantificación de los precursores neurales que proliferaron en respuesta al tratamiento con 50 μM de MPP⁺. El número de precursores neurales proliferantes aumentaron significativamente en los tejidos tratados, cuando se comparan con los controles (** P<1.788E-10). Es importante señalar que el número de células BrdU⁺/Nestin⁻ no varió significativamente entre los tejidos tratados y los controles.

Proliferación de los precursores DAérgicos

Aunque la proliferación observada estaba concentrada en la región ocupada por los precursores DAérgicos, era necesario obtener evidencia directa de que una fracción de los precursores neurales proliferantes pertenecían al linaje dopaminérgico. Para lograr este objetivo se realizó inmunohistoquímica contra Lmx1a que es un marcador del linaje dopaminérgico. Lmx1a es una proteína con homeodominio que se expresa en los precursores DAérgicos, así como en la población de neuronas dopaminérgicas (Andersson *et al.*, 2006). De esta manera, aquellas células que tuvieran la posición correcta en el cerebro medio y que fueran inmunoreactivas para Nestina y Lmx1a, se pueden considerar como precursores DAérgicos. En la Figura 18 se muestra evidencia de que los precursores dopaminérgicos proliferaron en respuesta al tratamiento con 50 μM de MPP⁺. De acuerdo a lo esperado, no se observó proliferación de los precursores DAérgicos en los controles. Esto significa que ante un insulto con MPP⁺, los explantes fueron capaces de reactivar a los precursores DAérgicos para regenerar a las neuronas perdidas.

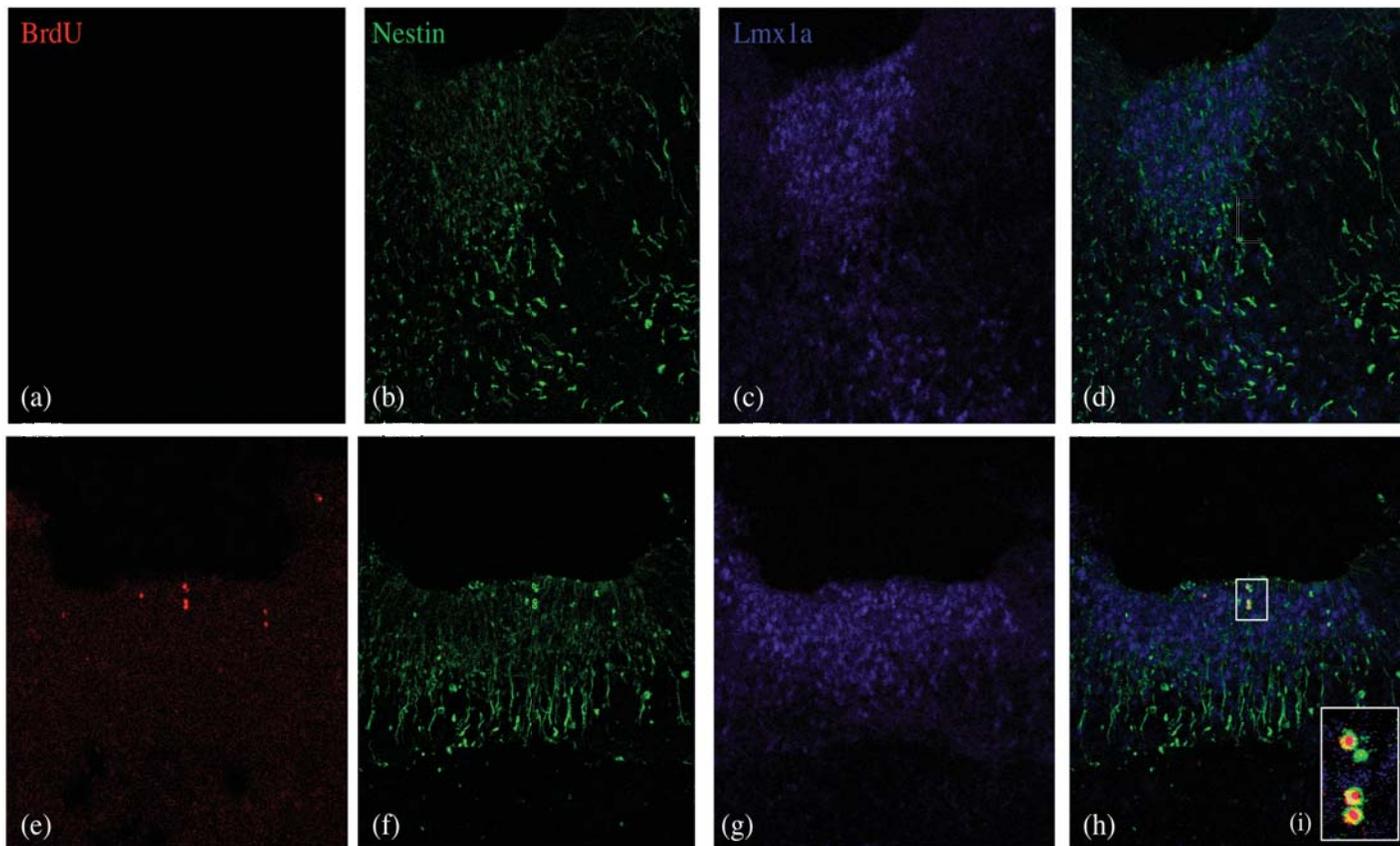


Figura 18. Proliferación de los precursores DA. (a-d) Tejido control con BrdU. (e-h) Tejido tratado (50 μ M de MPP⁺). Inmunohistoquímica para detectar BrdU (a,e; rojo), Nestina (b, f; verde) y Lmx1a (c, g; azul). (d) Sobrelape de los canales (a-c); (h) Sobrelape de los canales(e-g). (i) Aumento del recuadro que se muestra en (h). Imágenes tomadas con microscopía confocal.

DISCUSION

Selección de la concentración de MPP⁺

Pocos son los reportes que utilizan el MPP⁺ en los cultivos de explantes de mesencéfalo embrionario como modelo de neurodegeneración. Debido a esto, la selección de la concentración de MPP⁺ no fue una tarea sencilla. La mayoría de los reportes existentes utilizan el MPTP y su aplicación es sobre cultivos celulares o *in vivo*. Es importante mencionar que el MPTP necesita ser procesado por células gliales para generar el producto activo (MPP⁺), esto es una limitación en nuestro modelo experimental porque la gliogénesis todavía no ocurre en el mesencéfalos de E10.5. Por esta razón se optó por utilizar el MPP⁺.

La regeneración de los órganos o poblaciones celular tiene sus limitaciones y en la mayoría de los casos existe un “umbral de daño” para el proceso regenerativo. Es decir, la regeneración sólo se puede llevar a cabo cuando el daño a las estructuras no es excesivo. Los tratamientos con las concentraciones de 100 y 200 μM provocaron la degeneración de prácticamente de toda la población DAérgica y de otros tipos celulares también. Queda abierta la posibilidad de eliminar exclusivamente a todas las neuronas DAérgicas y determinar si este tratamiento permite una respuesta similar. La aplicación de estas concentraciones podría comprometer la capacidad del mesencéfalo embrionario para regenerar a las neuronas DAérgicas. Por lo tanto, era importante seleccionar una concentración de MPP⁺ que disminuyera la población dopaminérgica de manera significativa, pero que no fuera tóxica para todo el tejido. La concentración de 10 μM provocó una disminución de alrededor del 18%, pero esto no representó una diferencia significativa. El tratamiento con 50 μM de MPP⁺ disminuye significativamente el número total de neuronas DAérgicas presentes en los explantes. Posteriormente se comprobó que el MPP⁺ a una concentración de 50 μM induce la degeneración específica de las neuronas dopaminérgicas. Estos resultados nos llevaron a seleccionar la concentración de 50 μM como el tratamiento para los experimentos subsecuentes.

Degeneración de las neuronas DAérgicas

El MPP⁺ es una neurotoxina que induce la muerte de las neuronas DAérgicas, por lo tanto, se decidió cuantificar a las células inmunoreactivas para TH, para determinar si los diferentes tratamientos con MPP⁺ estaban teniendo un efecto sobre el tamaño de la población dopaminérgica. Este método nos proporciona evidencia indirecta de que

la neurotoxina estaba provocando la degeneración de las neuronas DAérgica. Adicionalmente, la cuantificación de las células inmunoreactivas para TH no nos proporciona un fiel reflejo de los efectos de la neurotoxina. Esto es debido a que éste método sólo toma en cuenta a las neuronas DAérgica que ya degeneraron, pero no considera a las células que se encontraban en proceso de muerte. Se utilizó la técnica de TUNEL para determinar si el tratamiento con 50 μM de MPP^+ induce la muerte de las neuronas dopaminérgicas. Aunque sólo se cuenta con evidencia cualitativa, las imágenes sugieren que un gran número de neuronas DAérgica son inmunoreactivas para TUNEL. En caso de que esto sea cierto, entonces es probable que con nuestro método estemos subestimando la degeneración de las neuronas DAérgica ocasionada por el MPP^+ . Esto no debería de representar un problema porque sólo significa que la neurotoxina es más efectiva para inducir la degeneración de las neuronas dopaminérgicas. Adicionalmente, contamos con evidencia de que los tejidos tratados con 10 y 50 μM de MPP^+ presentan neuronas DAérgica que sobreviven a los tratamientos, es decir, hay neuronas dopaminérgicas que NO son inmunoreactivas para TUNEL. Aunque, también cabe la posibilidad de que estas células estén muriendo por otro tipo de muerte que no este siendo detectada por la técnica de TUNEL (ej. autofagia).

Especificidad de la toxina

Es posible que la neurotoxina tenga un efecto diferencial sobre las distintas neuronas DAérgica presentes en el mesencéfalo embrionario. Esta hipótesis surge a partir de la observación de que el MPP^+ parece afectar de manera diferencial a las neuronas DAérgicas maduras ($\text{TH}^+/\text{NeuN}^+$) e inmaduras ($\text{TH}^+/\text{Tub-}\beta\text{III}^+$). Esto podría deberse a una diferencia en la expresión del DAT. Aún no se conocen los patrones de expresión del DAT, lo que único que podemos inferir al respecto es que la mayoría de las células que componen la población DAérgica expresan el DAT a partir del día E13.5.

La especificidad de la neurotoxina se probó cuantificando a los neuronas maduras presentes en los diferentes tratamientos. Para darle mayor solidez a este resultado sería interesante medir el efecto de MPP^+ sobre otra población neuronal presente en el mesencéfalo embrionario. Por ejemplo, se podría medir el efecto de la neurotoxina sobre la población de motoneuronas presente en el cerebro medio. Para esto se podría cuantificar a las poblaciones de motoneuronas en los distintos tratamientos para determinar si el MPP^+ esta afectando el tamaño poblacional de las motoneuronas. Adicionalmente sería necesario obtener evidencia directa del efecto de

la neurotoxina sobre la muerte motoneuronal. La expectativa es que el MPP⁺ a una concentración de 50 μ M o menor, no afecta significativamente a la población de motoneuronas presente en el mesencéfalo embrionario. La estrategia experimental podría ser la siguiente, las motoneuronas se pueden identificar utilizando el marcador Isl1/2, posteriormente se puede realizar un ensayo de TUNEL para determinar si hay diferencias en la cantidad de muerte celular.

Respuesta del mesencéfalo embrionario ante el tratamiento con MPP⁺

Después de un insulto con el MPP⁺ los explantes respondieron con una proliferación masiva concentrada en la región de neurogénesis de las neuronas dopaminérgicas. Debido a que la proliferación fue una respuesta específica al tratamiento con la neurotoxina y estuvo concentrada en el nicho dopaminérgico, en un principio se pensó que se había llevado a cabo una regeneración parcial de las neuronas DAérgicas. Imágenes como las que se muestran en la Figura 13 nos llevaron a pensar que el mesencéfalo embrionario era capaz de regenerar parcialmente a las neuronas DAérgicas, después de sufrir una neurodegeneración inducida por el MPP⁺. Sin embargo, un análisis más detallado con microscopía confocal reveló que sólo unas cuantas células habían sido regeneradas (TH⁺/BrdU⁺). Los falsos positivos observados (imágenes como las que se muestran en la Figura 13) se deben a que las señales de los diferentes marcadores se encuentran en diferentes planos ópticos. Esto significa que las señales provienen de distintas células que se encuentran en el mismo corte histológico, pero en diferentes capas. Para detectar estos falsos negativos o evitarlos, es necesario recurrir a la microscopía confocal. En este tipo de microscopía se pueden tomar imágenes en distintos planos ópticos de un mismo corte histológico. De esta manera, es posible afirmar si diferentes señales provienen de la misma célula. Utilizando esta tecnología se pudo llegar a la conclusión de que en los tejidos tratados sólo unas cuantas células eran inmunoreactivas para ambos marcadores, TH y BrdU.

Una pregunta muy interesante que surgió a partir de este resultado es: ¿Cuál es la naturaleza de las células que proliferaron en respuesta al tratamiento? Posteriormente se comprobó que estas células proliferativas eran precursores neurales. Pero si los explantes fueron capaces de promover la proliferación de los precursores neurales, ¿porqué no se observó una mayor diferenciación hacia el linaje dopaminérgico? Una hipótesis es que los precursores neurales no tuvieron suficiente tiempo para diferenciarse hacia neuronas DAérgicas. Si tomamos en cuenta que los explantes sólo tuvieron 72hrs para ejecutar su respuesta ante el tratamiento, esta explicación es

posible. Para poner a prueba esta hipótesis se podrían dejar los cultivos de explante hasta 2 días más, sin comprometer la integridad de los tejidos. Es importante mencionar que los cultivos de explante permiten reproducir con cierta fidelidad el desarrollo de los tejidos embrionarios, pero su limitación es que sólo es por un tiempo limitado. Otra estrategia para poner a prueba esta hipótesis es la siguiente: extraer los precursores neurales proliferantes de los tejidos tratados y después transplantarlos a un cultivo de explante que no ha sido tratado (Figura 19). En teoría, los precursores neurales proliferantes deberían de diferenciar hacia neuronas DAérgicas en los explantes receptores debido a que han tenido tiempo suficiente para completar su diferenciación. Aunque en este experimento quedaría la duda de si las señales presentes en el explante receptor afectaron de alguna manera la diferenciación de los precursores neurales proliferantes.

También sería interesante probar la capacidad que tiene el nicho regenerativo para inducir la diferenciación de distintos precursores neurales. Como ya se mencionó anteriormente, los tejidos tratados con MPP⁺ responden con la proliferación de los precursores neurales; esta respuesta puede estar mediada por factores solubles. Los factores solubles podrían ser secretados por las neuronas DAérgicas que han iniciado el proceso de muerte o por los precursores neurales. Estos factores podrían generar un nicho altamente neurogénico. Para probar esta hipótesis se podrían transplantar células troncales, cuerpos embroides o diferentes tipos de precursores neurales para probar la capacidad del nicho regenerativo para inducir la diferenciación dopaminérgica.

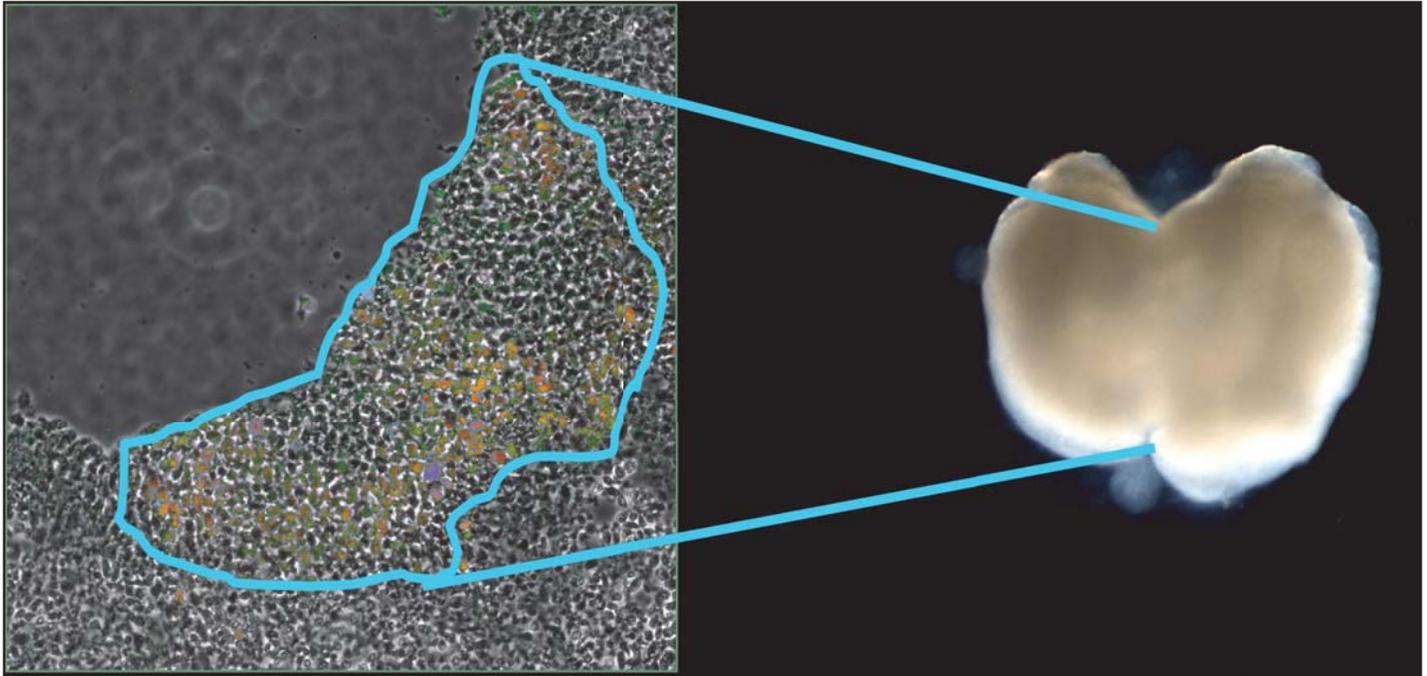


Figura 19. Transplante de precursores neurales proliferantes. Es posible extraer los precursores neurales proliferantes del tejido tratado para transplantarlos al nicho dopaminérgico de otro explante. Esta estrategia experimental sería útil para determinar si los precursores neurales proliferantes son capaces de diferenciarse hacia neuronas DAérgicas.

La incorporación de BrdU no es consecuencia de la reparación del ADN

Tratamientos con concentraciones muy altas de BrdU puede ocasionar daño al material genético. El daño inducido promueve la reparación del mismo material genético, proceso que involucra la incorporación de BrdU al ADN (Frielingsdorf *et al.*, 2004). Es poco probable que las concentraciones que utilizamos en nuestros experimentos hayan ocasionado algún daño al ADN, principalmente porque se utilizaron concentraciones mucho más bajas que las reportadas por Frielingsdorf *et al.* (2003). Por otro lado, los tejidos controles que sólo fueron expuestos al BrdU, no presentaron la incorporación de éste marcador. Para descartar la posibilidad de que la inmunoreactividad contra BrdU fuera un artefacto, se optó por hacer inmunohistoquímica contra el marcador mitótico H3. Lo esperado era que una fracción de las células BrdU⁺ fueran inmunoreactivas para el H3. La tinción con BrdU y H3 no debe de ser idéntica porque estos marcadores identifican diferentes etapas del ciclo celular. La H3 sólo marca a las células que estén en mitosis al momento que fueron fijadas, mientras que el BrdU marca a las células que se encuentren en fase S durante el periodo de aplicación (72 hrs) Aquellas células que incorporan el BrdU conservan el

marcaje a pesar de ya no estar en proliferación e incluso lo heredaron a su progenie. Por todo lo expuesto anteriormente, en caso de que ocurra un proceso de proliferación celular, uno esperaría que el marcaje con H3 sea mucho menor que la tinción con BrdU. En resumen, la evidencia presentada en este trabajo sugiere que es poco probable que la incorporación de BrdU sea consecuencia de la reparación del ADN. Más aún, los datos sugieren que el fenómeno observado en los tejidos tratados es proliferación celular.

Proliferación de los precursores neurales

La proliferación que se observó en los tejidos tratados estuvo concentrada en la región ventral del mesencéfalo embrionario, sitio en el cual se encuentran la población dopaminérgica. Debido a que los precursores neurales se ubican en una fracción de la región ventral (región ventricular), se decidió hacer inmunohistoquímica contra Nestina. El hecho de que la gran mayoría de las células proliferantes sean precursores neurales nos dice mucho acerca del proceso regenerativo. Existen muchas hipótesis acerca de la naturaleza del proceso regenerativo, las dos principales son las siguientes: (i) la regeneración podría estar mediada por progenitores o (ii) precursores proliferantes. En el caso de que el proceso regenerativo involucraría a progenitores, es probable que los progenitores se dividieran un par de veces y después hubieran diferenciado hacia neuronas DAérgica. Este proceso regenerativo hubiera sido más difícil de estudiar y caracterizar. El otro mecanismo involucra la proliferación de los precursores neurales, posteriormente estos precursores neurales diferenciarían hacia progenitores DAérgicos y finalmente hacia neuronas dopaminérgicas. Este mecanismo recapitularía el desarrollo de la población DAérgica, es decir, probablemente se reactivarían las mismas señales que especifican a las neurona dopaminérgica del cerebro medio. Lo anterior pudiera involucrar la activación de señales tales como Shh, Fgf8, Nurr1, Lmx1a/b, Msx2, Ngn2, En1/2, Ptx3, entre otros.

Proliferación de los precursores DAérgicos

El hallazgo de que algunos de los precursores neurales proliferantes fueron inmunoreactivos para Lmx1a nos sugiere que la respuesta de los tejidos tratados, incluye la reposición de las neuronas DAérgicas perdidas. Este resultado es un indicio de que el mesencéfalo embrionario puede reactivar el desarrollo del linaje dopaminérgico. Es muy probable que los precursores DAérgicos proliferantes provengan de la diferenciación de los precursores neurales proliferantes.

La proliferación de los precursores DAérgicos fuera del periodo de neurogénesis dopaminérgica y como consecuencia de un tratamiento con MPP⁺ nos sugiere que éstos tejidos pueden regenerar a las neuronas dopaminérgicas. Este resultado indica que los precursores neurales proliferantes había iniciado la diferenciación hacia el linaje dopaminérgico. Sería interesante determinar las señales que inducen la proliferación de los precursores neurales, su diferenciación hacia precursores dopaminérgicos y finalmente la especificación hacia neurona DAérgica.

CONCLUSIONES

Selección de la concentración de MPP⁺

(1) El tratamiento con 50 μM de MPP⁺ provocó una disminución de la población DAérgica de 1320 células ($47\% \pm 12.1\%$), con respecto al número de células que se encuentran en los tejidos control (2823 neuronas DAérgicas). Esto representa una disminución significativa ($n=3$, $P<0.03$) del número total de neuronas dopaminérgicas presentes en el mesencéfalo embrionario.

Degeneración de las neuronas DAérgicas

(1) La aplicación de 50 μM de MPP⁺ a los cultivos de explante por 48hrs induce la muerte de las neuronas dopaminérgicas (TH⁺/TUNEL⁺).

Especificidad de la neurotoxina

(1) El número total de neuronas DAérgicas maduras (TH⁺/NeuN⁺) presentó una reducción significativa ($n=3$, $P<0.04$) en los explantes tratados con 50 μM de MPP⁺.

(2) La cantidad de neuronas maduras de otras poblaciones neuronales presentes en el mesencéfalo embrionario no varió significativamente ($n=3$, $P<0.5$) entre los tejidos tratados y controles.

(3) El MPP⁺ a una concentración de 50 μM induce la degeneración específica de las neuronas dopaminérgicas.

Respuesta del mesencéfalo ante el tratamiento con MPP⁺

(1) Los tejidos tratados presentaron una proliferación masiva en la región ventral del mesencéfalo embrionario (nicho dopaminérgico).

La incorporación de BrdU no es resultado de la reparación del ADN

(1) La incorporación de BrdU en los tejidos tratados no es consecuencia de la reparación del ADN. La doble inmunotinción con BrdU y H3 sugiere que el fenómeno observado en los tejidos tratados es proliferación celular.

Proliferación de los precursores neurales

(1) La mayoría de las células que proliferaron en respuesta al tratamiento con 50 μ M de MPP⁺ son precursores neurales ($96.88 \pm 0.26\%$).

(2) Los tejidos tratados presentan un incremento significativo en la cantidad de precursores neurales proliferantes ($P < 0.001$).

Proliferación de los precursores DAérgicos

(1) Preliminarmente, los precursores dopaminérgicos proliferaron en respuesta al tratamiento con 50 μ M de MPP⁺.

PERSPECTIVAS

Efecto de la neurotoxina sobre la población DAérgica

En éste trabajo se observó un efecto del MPP⁺ sobre la población dopaminérgica. El tratamiento con 50 µM de MPP⁺ provocó una disminución significativa en el número de células inmunoreactivas para TH. También se demostró que el mismo tratamiento induce una reducción significativa en la cantidad de neuronas DAérgicas maduras. Sin embargo, es posible que la neurotoxina tenga un efecto diferencial sobre las distintas células que componen al linaje dopaminérgico. Esta hipótesis surge a partir de la observación de que el MPP⁺ parece afectar de manera diferencial a las neuronas DAérgicas maduras (TH⁺/NeuN⁺) e inmaduras (TH⁺/Tub-βIII⁺). Esto podría deberse a una diferencia en la expresión del DAT. Para poder caracterizar el efecto del MPP⁺ sobre todo el linaje dopaminérgico sería interesante determinar el patrón de expresión del DAT. Esto nos permitiría formular predicciones acerca de la susceptibilidad de las distintas células que componen el linaje DAérgico a la toxicidad inducida por el MPP⁺.

La 6-hidroxi-dopamina es una neurotoxina que también produce la degeneración de las neuronas DAérgicas. Un experimento muy interesante sería determinar si la 6-hidroxi-dopamina puede replicar la respuesta reportada para el MPP⁺, es decir, inducir la proliferación de los precursores neurales y DAérgicos.

Otro experimento importante consiste en probar la capacidad regenerativa del mesencéfalo de ratones de diferentes edades. Este experimento consiste en inyectar la SN de ratones jóvenes (2-3 meses de edad) y adultos con MPP⁺ o 6-hidroxi-dopamina. Estos experimentos nos permitirían determinar si la SN tiene precursores neurales, como los reportados para el mesencéfalo embrionario, que puedan responder ante un insulto.

Caracterización del proceso regenerativo

Pocos son los ejemplos de regeneración del sistema nervioso central en los vertebrados. Debido a lo anterior el “proceso regenerativo” que se reporta en este estudio tiene un gran valor para el desarrollo de procesos terapéuticos. A continuación, sería muy interesante caracterizar las señales que regulan la proliferación y diferenciación de los precursores neurales. Pérez-Garijo *et al.* (2004) demostraron que en la larva de *Drosophila* las células que entran en apoptosis, liberan señales proliferativas para compensar la pérdida celular. Es posible que un proceso

similar esté ocurriendo en nuestro modelo experimental. En tal caso es probable que las neuronas DAérgicas que han iniciado el proceso de muerte estén secretando factores solubles que promuevan el proceso regenerativo. Estos factores solubles actuarían directamente sobre los precursores neurales promoviendo su proliferación. Para probar esta hipótesis se podría utilizar un inhibidor de caspasas como P35 o zVAD para prevenir la muerte de las neuronas DAérgica apoptóticas. En este modelo experimental las neuronas DAérgicas iniciarían el proceso de muerte, pero no podrían concluirlo debido a que las caspasas estarían inhibidas. En este modelo experimental esperaríamos que las neuronas dopaminérgicas que iniciaron el proceso de muerte secretaran mitógenos indefinidamente. Esto debería de reflejarse en un incremento en la cantidad de precursores neurales proliferantes. Shh y Fgf8 son mitógenos que juegan un papel muy importante en la especificación de la población dopaminérgica. Por lo tanto, es posible que en nuestro modelo las neuronas dopaminérgicas que entran en apoptosis liberen mitógenos tales como Fgf8 y Shh. Por lo tanto, sería interesante determinar si en las neuronas DAérgica que han iniciado el proceso de muerte, se produce un aumento en la expresión de Shh y/o Fgf8. Esto se podría cuantificar con un RT-PCR¹, también se podría medir si se produjo un aumento en la cantidad de proteína con un western blot². Es muy importante caracterizar el ambiente regenerativo generado en este estudio porque nos podría proporcionar información acerca de las señales que estimulan a los precursores endógenos a regenerar las neuronas DAérgicas.

Tratamiento de la enfermedad de Parkinson

Sería interesante determinar la utilidad de los precursores neurales proliferantes en el tratamiento del Parkinson. Para poner esto a prueba se podrían realizar trasplantes de los precursores neurales proliferantes a ratones que presentan Parkinson, para ver si estas células son capaces de aminorar los efectos de la enfermedad. Para que el tratamiento sea exitoso es necesario que los precursores neurales proliferantes se integren al tejido, sobrevivan, diferencien a neuronas DAérgicas e inerven el estriado. El hallazgo de precursores DAérgicos proliferantes en los tejidos tratados nos sugiere que los precursores neurales proliferantes tienen la capacidad de diferenciar hacia el linaje dopaminérgico. Dado que los precursores neurales proliferantes surgen como

¹ RT-PCR: Esta técnica sirve para amplificar un fragmento de ARN. Esta técnica se diferencia de un PCR convencional en el hecho de que el molde inicial es ARN y se requiere de una transcriptasa inversa para realizar la conversión del ARN a ADN complementario.

² Western blot es una técnica utilizada para la detección de proteínas en una muestra de un tejido homogeneizado o extracto.

respuesta a un tratamiento con MPP⁺ y se concentran en la región ventral del mesencéfalo embrionario, es posible que la mayoría estén comprometidos al linaje dopaminérgico. Esto les confiere un mayor potencial terapéutico para el tratamiento del Parkinson. Por otra parte, los mesencéfalos embrionarios tratados con MPP⁺ podrían proporcionar el ambiente adecuado para dirigir la diferenciación de distintos tipos de células troncales. El ambiente regenerativo del mesencéfalo embrionario podría inducir con mayor eficiencia la diferenciación de los precursores neurales de la región subventricular o de las células ES humanas hacia precursores DAérgicos del cerebro medio.

REFERENCIAS

- Andersson, E., Tryggvason, U., Deng, Q., Friling, S., Alekseenko, Z., Robert, B., Perlmann, T. and J. Ericson. (2006) Identification of intrinsic determinants of midbrain dopamine neurons. *Cell* **124**(2), 393-405.
- Ang, Siew-Lan. (2006) Transcriptional control of midbrain dopaminergic neuron development. *Development* **133**: 3499-3506.
- Alvarez-Buylla, A., Seri, B. and F. Doetsch. (2002) Identification of neural stem cells in the adult vertebrate brain. *Brain Research Bulletin* **57**: 751-758.
- Araki, I. and H. Nakamura. (1999) Engrailed defines the position of dorsal diencephalic boundary by repressing diencephalic fate. *Development* **126**, 5127-5135.
- Arvidsson, A., Collin, T., Kokai, Z. and O. Lindvall. (2002) Neuronal replacement from endogenous precursors in the adult brain after stroke. *Nat. Med.* **8**: 963-970.
- Bally-Cuif, L. and M. Wassef. (1994) Ectopic induction and reorganization of Wnt1 expression in quail/chick chimeras. *Development* **120**(12): 3379-94.
- Batista, C.M.C., Kippin, T.E., Williams-Morawek, S., Shimabukuro, M.K., Akamatsu, W. and D. van der Kooy. (2006) A progressive and cell non-autonomous increase in striatal neural stem cells in the Huntington's disease R6/2 mouse. *J. Neurosci.* **26**(41): 10452-10460.
- Bayer, S.A., Wills, K.V., Triarhou, L.C. 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.
- Bentivoglio, M. and P. Mazzarello. (1999) The history of radial glia. *Brain Res. Bull.* **49**: 305-315.
- Bezard, E., Gross, C.E., Fournier, M.C., Dovero, S., Bloch, B. and M. Jaber. (1999) Absence of MPTP induced neuronal death in mice lacking the dopamine transporter. *Exp Neurol* **155**: 268-273.
- Castillo, S.O., Baffi, J.S., Palkovits, M., Goldstein, D.S., Kopin, I.J., Witta, J., Magnuson, M.A. and V.M. Nikodem. (1998) Dopamine biosynthesis is selectively abolished in substantia nigra/ventral tegmental area but not in hypothalamic neurons in mice with targeted disruption of the Nurr1 gene. *Mol. Cell. Neurosci.* **11**, 36-46.
- Choi, W.S., Canzoniero, L.M.T., Sensi, S.L., O'Malley, K.L., Gwag, B.J., Sohn, S., Kim, J.E., Oh, T.H., Lee, E.B. and Y.J. Oh. (1999) Characterization of MPP+ induced cell death in a dopaminergic neural cell line: role of macromolecule synthesis, cytosolic calcium, caspase and Bcl-2 related proteins. *Exp. Neurol.* **159**: 274-282.
- Choi, W.S., Yoon, S.Y., Oh, T.H., Choi, E.J., O'Malley, K.L. and Y.J. Oh. (1999) Two distinct mechanisms are involved in 6-hydroxydopamine and MPP+ induced dopaminergic neuronal cell death: Role of caspases, ROS and JNK. *J. Neurosci. Res.* **57**: 86-94.
- Chu, C.T., Zhu, J., Cau, G., Signore, A., Wang, S. and J. Chen. (2005) Apoptosis inducing factor mediates caspase-independent 1-methyl-4-phenylpyridinium toxicity in dopaminergic cells. *J. Neurochem.* **94**: 1685-1695.
- Church, W. and S.J. Hewett. (2003) Relationship between NMDA receptor expression and MPP+ toxicity in cultured dopaminergic cells. *J. Neurosci. Resear.* **73**: 811-817.
- Conboy, I.M. Conboy, M.J., Wagers, A.J., Girma, E.R., Weissman, I.L. and T.A.
- Crossley, P., Martinez, S. and G. Martin. (1996) Midbrain development induced by FGF8 in the chick embryo. *Nature* **380**: 66-68.
- Rando. Rejuvenation of aged progenitor cells by exposure to a young systemic environment. *Science* **433**: 760-764.
- Danielian P.D. and A.P. McMahon. (1996) Engrailed-1 as a target of the wnt-1 signaling pathway in vertebrate midbrain development. *Nature* **383**, 332-334.
- Dauer, W. and S. Przedborski. (2003) Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron* **39**: 889-909.
- Dawson, T.M. and V.L. Dawson. (2003) Molecular pathways of neurodegeneration in Parkinson's disease. *Science* **302**; 819-22.
- Dodel, R.C., Du, Y., Bales K.R., Ling, Z.D., Carvey, P.M. and S.M. Paul. (1998) Peptide inhibitors of caspase-3-like proteases attenuate 1-methyl-4-phenylpyridinium induced

- toxicity of cultured fetal rat mesencephalic dopamine neurons. *Neuroscience* **86**: 701-707.
- Doetsch, F., Garcia-Verdugo, J.M. and A. Alvarez-Buylla. (1999) Regeneration of a germinal layer in the adult mammalian brain. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96**: 11619-11624.
 - Doetsch, F., Petreanu, L., Caille, I., Garcia-Verdugo, J.M. and A. Alvarez-Buylla. (2002) EGF converts transit-amplifying neurogenic precursors in the adult brain into multipotent stem cells. *Neuron* **36**: 1021-1034.
 - Donovan, D.M., Miner, L.L., Perry, M.P., Revay, R.S., Sharpe, L.G., Przedborski, S., Kostic, V., Philpot, R.M., Kirstein, C.L., Rothman, R.B., Schindler, C.W. and G.R. Uhl (1999) Cocaine reward and MPTP toxicity: alteration by regional variant dopamine transporter overexpression. *Brain Res Mol Brain Res* **73**: 37-49.
 - Du, Y., Dodel, R.C., Bales, K.R., Jemmersom, R., Hamilton-Byrd, E. and S.M. Paul. (1997) Involvement of a caspase-3-like cysteine protease in 1-methyl-4-phenylpyridinium mediated apoptosis of cultured cerebellar granule neurons. *J. Neurochem.* **69**: 1382-1388.
 - Dunnett, S. and A. Bjorklund. (1999) Prospects for new restorative and neuroprotective treatments in Parkinson's disease. *Nature* **399**: A32-A39.
 - Eberhardt, O. and J.B. Schulz. (2003) Apoptotic mechanisms and antiapoptotic therapy in the MPTP model of Parkinson's disease. *Toxicology letters* **139**: 135-151.
 - Echeverri, K., Clarke, J.D. and E.M. Tanaka. (2001) *Dev. Biol.* **236**: 151-164.
 - Echeverri, K. and E.M. Tanaka. (2002) Ectoderm to mesoderm lineage switching during Axolotl tail regeneration. *Science* **298**: 1993-6.
 - Endo, T., Yokoyama, H., Tamura, K. and H. Ide. (1997). Shh expression in developing and regenerating limb buds of *Xenopus laevis*. *Dev. Dynamics* **209**: 227-232.
 - Fabre, E., Monserrat, J., Herrero, A., Barja J. and M.L. Leret. (1999) Effect of MPTP on brain mitochondrial H₂O₂ and ATP production and on dopamine and DOPAC in the striatum. *J. Physiol. Biochem.* **55**: 325-331.
 - Fallon, J., Reid, S., Kinyamu, R., Opole, I., Opole, R. Baratta, J., Korc, M., Endo, T.L., Duong, A., Nguyen, G., Karkehabadhi, M., Twardzik, D., and S. Loughlin. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97**: 14686-14691.
 - Filoni, S and G. Gilbertini. (1971) A study of the regeneration of the cerebellum of *Xenopus laevis* in the larval stages and after metamorphosis. *Arch. Biol. (Liege)* **82**, 433-470.
 - Fischer, A. and T.A. Reh. (2001) Muller glia are a potential source of neural regeneration in the postnatal chicken retina. *Nat. Neurosci.* **4**: 247-252.
 - Frielingsdorf H, Schwarz K, Brundin P, Mohapel P. (2004) No evidence for new dopaminergic neurons in the adult mammalian substantia nigra. *PNAS* **101**: 10177-10182.
 - Gavalas, A., Davenne, M., Lumsden, A. Chambon, P. and F.M. Rijli. (1997) Role of Hoxa2 in axon pathfinding and rostral hindbrain patterning. *Development* **124**: 3693-3702.
 - Gilbert, S.F. (2003) *Developmental Biology*, 7th edition. Sinauer Associates Inc. USA. pp. 838.
 - Gould, E. and B.S. Tanapat. (1997) Lesion induced proliferation of neuronal progenitors in the dentate gyrus of the adult rat. *Neuroscience* **80**: 427-436.
 - Hassouna, L., Wickert, H., Zimmermann, M., and F. Gillardon. (1996) Increase in bax expression in substantia nigra following 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MTPT) treatment of mice. *Neurosci. Lett.* **204**: 85-88.
 - Hernit-Grant, C.S. and J.D. Macklis. (1996) Embryonic neurons transplanted to regions of targeted photolytic cell death in adult mouse somatosensory cortex re-form specific callosal projections. *Exp. Neurol.* **139**: 131-142.
 - Hynes, M. and A. Rosenthal. (1999) Specification of dopaminergic and serotonergic neurons in vertebrate CNS. *Curr. Opin. Neurobiol.* **9**, 26-36.
 - Itano, Y. and Y. Nomura. (1995) 1-Methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP+) causes DNA fragmentation and increases the Bcl-2 expression in human neuroblastoma, SH-SY5Y cells through different mechanisms. *Brain Res.* **704**: 240-245.

- Joyner, A.L., Lui, A. and S. Millet. (2000) *Otx2*, *Gbx2* and *Fgf8* interact to position and maintain a mid-hindbrain organizer. *Curr. Opin. Cell Biol.* **12**, 736-741.
- Kodama, R. and G. Eguchi. (1995) *Semin. Cell Biol.* **6**: 143-149.
- Kostakopoulou, K, Vogel, A., Brickell, P. and C. Tickle. (1996) Regeneration of wing bud stumps of chick embryos and reactivation of *Msx-1* and *shh* expression in response to FGF-4 and ridge signals. *Mech. Dev.* **55**: 119-131.
- Köster, R.H. and S.E. Fraser. (2006) FGF signalling mediates regeneration of the differentiating cerebellum through repatterning of the anterior hindbrain and reinitiation of neuronal migration. *J. Neurosci.* **26**(27):7293-7304.
- Kuhn, H.G. Dickinson-Anson, H. and F.H. Gage. (1996) Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. *J. Neurosci.* **16**: 2027-2033.
- Langston, J.W., Ballard, P., Tetrud, J.W. and I. Irwin. (1983) Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. *Science* **219**: 979–980.
- Law, S.W., Conneely, O.M., DeMayo, F.J. and B.W. O'Malley. (1992) Identification of a new brain-specific transcription factor, NURR1. *Mol. Endocrinol.* **6**, 2129-2135.
- Lindahl, R. and S. Evcos. (1984) Rat liver aldehyde dehydrogenase. II. Isolation and characterization of four inducible isozymes. *J. Biol. Chem.* **259**, 11991-11996.
- Liu, A., Losos, K. and A.L. Joyner. (1999) FGF8 can activate *Gbx2* and transform regions of the rostral mouse brain into a hindbrain fate. *Development* **126**, 4827-4838.
- Lois C. and A. Alvarez-Buylla. (1993) Proliferating subventricular zone cells in the adult mammalian forebrain can differentiate into neurons and glia. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **90**: 2074-2077.
- Lumsden, A and R, Krumlauf. (1996) Patterning the vertebrate neuroaxis. *Science* **274**: 1109-1115.
- Magavi, S.S., Leavitt, B.R. and J.D. Macklis. (2000) Induction of neurogenesis in the neocortex of adult mice. *Nature* **22**: 951-955.
- Marini, A.M., Schwartz, J.P. and I.J. Kopin. (1989) The neurotoxicity of 1-methyl-4-pyridinium on cultured cerebellar granule neurons. *J. Neurosci.* **9**, 3665-72.
- Matsunaga, E., Araki, I. And H. Nakamura. (2000) Pax6 defines the di-mesencephalic boundary by repressing *En1* and *Pax6*. *Development* **127**: 2357-2365.
- Martinez, S., Crossley, P.H., Cobos, I., Rubinstein, J.L. and G.R. Martin. (1999) FGF8 induces formation of an ectopic isthmic organizer and isthmic cerebellar development via a repressive effect on *Otx2* expression. *Development* **126**, 1189-1200.
- McGann, C.J., Odelberg, S.J. and M.T. Keating. (2001) Mammalian myotube dedifferentiation induced by newt regeneration extract. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**:13699-13704.
- McMahon, A.P, Joyner, A.L., Bradley, A. and J.A. McMahon. (1992) The midbrain-hindbrain phenotype of Wnt-1/Wnt-1 mice results from stepwise deletion of Engrailed-expressing cells by 9.5 days postcoitum. *Cell* **69**, 581-595.
- Mitsumoto, Y., Watanabe, A., Mori, A. and N. Koga. (1998) Spontaneous regeneration of nigrostriatal dopaminergic neurons in MPTP-treated C57BL/6 mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* **248**:660-663.
- Morgan, T.H. (1907) *Regeneration* (Columbia University, New York).
- Nicotra, A. and S.H. Parvez. (2002) Apoptotic molecules and MPTP-induced cell death. *Neurotoxicology and Teratology* **24**:599-605.
- Nishino, H., Hida, H., Takei, N., Kumazaki, M., Nakajima, K. and H. Baba. (2000) Mesencephalic neural stem (progenitor) cells develop to dopaminergic neurons more strongly in dopamine-depleted striatum than in intact striatum. *Exp. Neurol.* **164**: 209-214.
- Nunes, I., Tovmasian, L.T., Silva, R.M., Burke, R.E. and S.P. Goff. (2003) Pitx3 is required for development of substantia nigra dopaminergic neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100**(7): 4245-50.
- Offen, D., Beart, P.M., Cheung, N.S., Pascoe, C.J., Hochman, A., Gorodin, S., Melamed, E., Bernard, R. and O. Bernard. (1998) Transgenic mice expressing human Bcl-2 in their neurons are resistant to 6-hydroxydopamine and 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine neurotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**: 5789-5794.

- Okafugi T., Funahashi, J. and H. Nakamura. (1999) Roles of *Pax2* in initiation of the chick tectal development. *Brain Res. Dev.* **116**, 41-49.
- Perlmann, T. and L. Jansson. (1995) A novel pathway for vitamin A signaling mediated by RXR heterodimerization with NGFI-B and NURR1. *Genes Dev.* **9**, 769-782.
- Piffl, C., Giros, B. and M.G. Caron. (1993) Dopamine transporter expression confers cytotoxicity to low doses of the parkinsonism-inducing neurotoxin 1-methyl-4-phenylpyridinium. *J Neurosci* **13**: 4246-4253.
- Placzek, M., Tessier-Lavigne, M., Yamada, T., Jessell, T. and J. Dodd. (1990) Mesodermal control of neural cell identity: floor plate induction by the notochord. *Science* **250**, 985-988.
- Placzek, M. and J. Briscoe. (2005) The floor plate: multiple cells, multiple signals. *Nat. Rev. Neurosci.* **6**, 230-240.
- Reifers, S., Bohli, H., Walsh, E.C., Crossley, P.H., Stainier, D.Y. and M. Brand. (1998) *Fgf8* is mutated in zebrafish acerebellar mutants and is required for maintenance of midbrain-hindbrain boundary development and somitogenesis. *Development* **125**: 2381-2395.
- Ricaurte, G.A., Langston, J.W., DeLanney, L.E., Irwin, I. and J.D. Brooks. (1985) Dopamine uptake blockers protect against the dopamine depleting effect of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) in the mouse striatum. *Neurosci Lett* **59**: 259-264.
- Rubenstein, J.L., Martinez, S., Shimamura, K. and Puelles, L. (1994). The embryonic vertebrate forebrain: the prosomeric model. *Science* **266**, 578-580.
- Sacchetti, P., Mitchell, T.R., Granneman, J.G. and M.J. Bannon. (2001) Nurr1 enhances transcription of the human dopamine transporter gene through a novel mechanism. *J. Neurochem.* **76**, 1565-1572.
- Sakurada, K., Ohshima-Sakurada, M., Palmer, T.D. and F.H. Gage. (1999) Nurr1, an orphan nuclear receptor, is a transcriptional activator of endogenous tyrosine hydroxylase in neural progenitor cells derived from the adult brain. *Development* **126**, 4017-4026.
- Saporito M.S., Thomas B.A. and R.W. Scott. (2000) MPTP activates c-Jun NH₂-terminal kinase (JNK) and its upstream regulatory kinase MKK4 in nigrostriatal neurons in vivo. *J. Neurochem.* **75**: 1200-1208.
- Saucedo-Cardenas, O., Quintana-Hau, J.D., Le, W.D., Smidt, M.P., Cox, J.J., De Mayo, F., Burbach, J.P. and O.M. Conneely. (1998) Nurr1 is essential for the induction of the dopaminergic phenotype and the survival of ventral mesencephalic late dopaminergic precursor neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 4013-4018.
- Sawamoto, K., Nakao, N., Kakishita, K., Ogawa, Y., Toyama, Y., Yamamoto, A., Yamaguchi, M., Mori, K., Goldman, S.A., Itakura, T. and H. Okano. (2001) Generation of dopaminergic neurons in the adult brain from mesencephalic precursor cells labeled with a nestin-GFP transgene. *J. Neurosci.* **21**(11): 3895-3903.
- Schwarz, M., Alvarez-Bolado, G., Urbanek, P., Busslinger, M. and P. Gruss. (1997) Conserved biological function between *Pax2* and *Pax5* in midbrain and cerebellum development: Evidence from targeted mutations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 14518-14523.
- Schwob, J.E. (2002) *Anat. Rec. New Anat.* **269**:33.
- Shang, T., Uihlein, A.V., Van Asten, J., Kalyanaraman, B. and C.J. Hillard. (2003) 1-methyl-4-phenylpyridinium accumulates in cerebellar granule neurons via organic cation transporter 3. *J. Neurochem.* **85**(2): 358-67.
- Simon, H.H., Saueressig, H., Wurst, W., Goulding, M.D. and D.D. O'Leary. (2001) Fate of midbrain dopaminergic neurons controlled by the engrailed genes. *J. Neurosci.* **21**, 3126-3134.
- Srebro, Z. (1957) Regeneration of the endbrain in *Xenopus laevis* tadpoles. *Fol. Biol. (Krakow)* **5**, 211-232.
- Stocum D.L. (2002) A Tale of transdifferentiation. *Science* **298**:1901-1902.
- Studer, M., Popperl, H., Marshall, H. Kuroiwa, A. and R. Krumlauf. (1994) Role of a conserved retinoic acid response element in rhombomere restriction of Hox-b1. *Science* **265**: 1728-1732.
- Tanaka, E.M. (2003) Regeneration: If they can do it, why can't we? *Cell* **113**: 559-562.

- Trupp, M., Arenas, E., Fainzilber, M., Nilsson, A.S., Sieber, B.A., Grigoriou, M., Kilkenny, C., Salazar-Grueso, E., Pachnis, V. and U. Arumae. (1996) Functional receptor for GDNF encoded by the c-ret proto-oncogene. *Nature* **381**(6585): 785-9.
- Veech, G.A., Dennis, J., Keeney, P.M., Fall, C.P., Swerdlow, R.H., Parker Jr., W.D., J.P. Bennet Jr. (2000) Disrupted mitochondrial electron transport function increases expression of anti-apoptotic Bcl-2 and Bcl-X_L protein in SH-SY5Y neuroblastoma and Parkinson disease hybrid cells through oxidative stress. *J. Neurosci. Res.* **61**: 693-700.
- Wanek, N., Muneoka, K. and S.V. Bryant. (1989) Evidence of regulation following amputation and tissue grafting in the developing mouse limb. *J. Exp. Zool.* **249**: 55-61.
- Wolpert, L. (1969) Positional information and the spatial pattern of cell differentiation. *J. Theor. Biol.* **25**, 1-47.
- Wurst, W. and L. Bally-Cuif. (2001) Neural plate patterning: upstream and downstream of the isthmus organizer. *Nat. Rev. Neurosci.* **2**, 99-108.
- Ye, W., Shimamura, K., Rubenstein, J.L.R., Hynes, M.A. and A. Rosenthal. (1998) FGF and Shh signals control dopaminergic and serotonergic cell fate in the anterior neural plate. *Cell* **93**, 755-766.
- Yoshino, Y. and S. Tochinai. (2004) Functional regeneration of the olfactory bulb requires reconnection to the olfactory nerve in *Xenopus* larvae. *Development, Growth and Differentiation* **48**:1, 15-24.
- Zetterstrom, R.H., Solomin, L., Jansson, L., Hoffer, B.J., Olson, L. And T. Perlmann. (1997) Dopamine neuron agenesis in Nurr1-deficient mice. *Science* **276**, 248-250.
- Zhou, Q.Y. and R.D. Palmiter. (1995) Dopamine-deficient mice are severely hypoactive, adipsic and aphagic. *Cell* **83**, 1197-1209.