



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO  
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA DEL DESARROLLO Y FISIOLÓGIA  
MOLECULAR**

**DETERMINACIÓN DEL POTENCIAL DE  
DIFERENCIACIÓN NEURONAL DE CÉLULAS TRONCALES  
EMBRIÓNICAS EN EL TELENCÉFALO Y  
ROMBOENCÉFALO EMBRIONARIOS**

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE  
**MAESTRO EN CIENCIAS**

**P R E S E N T A :**

**GILDA GUERRERO FLORES**

DIRECTOR DE TESIS: Dr. Luis Fernando Covarrubias Robles



**CUERNAVACA, MORELOS**

**AGOSTO, 2009**



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.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Dr. Luis Covarrubias en primer lugar por su confianza para permitirme ser parte de su laboratorio, por compartir conmigo su conocimiento, por su apoyo y paciencia, y por su guía durante estos años.

A Manuel Baizabal por enseñarme todas las técnicas necesarias, por aportar sus ideas y críticas al proyecto. A Concepción Valencia por su apoyo en el laboratorio. A Andrés Saralegui por su ayuda con la microscopía confocal. A los Drs. Susana Castro y Chris Wood por sus críticas.

A mi mamá por haberme hecho quien soy, por su apoyo incondicional, por impulsarme a alcanzar mis sueños, por su amor y fe en mí, por ser mi guía y mi mejor amiga. A mis hermanos por su apoyo y cariño en todo momento. A mi tío Beto, el principal promotor de esta aventura.

A Mónica y Miguel, por ser mis mejores amigos...mi familia en Cuernavaca, por estar conmigo en los buenos y malos momentos, por la ayuda académica que tanto me hizo falta, los regaños merecidos, por seguirme en todas mis locuras, en fin, la lista sigue...y seguirá!

Al laboratorio Covarrubias: Rocío, Raúl, Gaby, Gina, Pau, Niurka, David, Manuel, por el apoyo técnico y los momentos de esparcimiento, han hecho del trabajo en el lab una experiencia muy divertida y gratificante.

A la banda: Daniela, Lianet, José, Sergio, Michin, Cuauh, Pol, Víctor, por las pláticas enriquecedoras, las fiestas "leves", las anécdotas que nunca olvidaré... gracias chavos!

A la Red: Héctor, Daniela, Michin, Eugenio, Ericka y Pau por aguantar mi tiranía y por el bicampeonato!!

A todos los que no he mencionado pero que de una u otra forma han compartido muchos momentos conmigo y me han brindado su ayuda cuando la he necesitado.

## INDICE

ABREVIATURAS.....	3
RESUMEN.....	5
ABSTRACT.....	6
I. INTRODUCCIÓN.....	7
a. Desarrollo embrionario temprano en mamíferos y formación del sistema nervioso central.....	7
b. La diferenciación del tubo neural.....	8
i. El eje dorso-ventral.....	8
ii. El eje antero-posterior.....	12
c. La diversidad neuronal.....	14
i. Diferenciación GABAérgica y glutamatérgica en el cerebro anterior.....	14
ii. Diferenciación de motoneuronas y neuronas serotoninérgicas en el cerebro posterior.....	17
d. El sistema nervioso central y las células troncales.....	19
e. Las células troncales embrionarias.....	20
II. ANTECEDENTES.....	22
a. Las células troncales embrionarias y la diferenciación neuronal.....	22
III. HIPÓTESIS.....	30
IV. OBJETIVO GENERAL.....	30
a. Objetivos Particulares.....	30
V. METODOLOGÍA.....	31
a. Cultivo de células troncales embrionarias y formación de cuerpos embrioides.....	31
b. Cultivo de explantes.....	32
c. Implantes en los explantes.....	34
d. Procesamiento de los tejidos e inmunofluorescencia.....	34
e. Cuantificación y análisis de datos.....	35
VI. RESULTADOS.....	36
a. Cultivo de explantes.....	36
i. Cerebro anterior.....	36
ii. Cerebro posterior.....	39

b. Cultivo explante-implante.....	40
VII. DISCUSIÓN.....	46
VIII. CONCLUSIONES.....	51
IX. PERSPECTIVAS.....	52
X. BIBLIOGRAFÍA.....	53

## ABREVIATURAS

5-HT	5-hidroxitriptamina
AchE	Acetilcolinesterasa
AR	Ácido Retinoico
bHLH	Del inglés, “basic Helix-Loop-Helix”
BMP	Del inglés, “Bone Morphogenetic Protein”
CCE	Células de Carcinoma Embrionario
CE	Cuerpos Embrioides
CGE	Células Germinales Embriónicas
CTE	Células Troncales Embriónicas
CTN	Células Troncales Neurales
Dlx	Del inglés, “Distal Less”
dpc	Días post coito
EGL	Eminencia Gangliónica Lateral
EGM	Eminencia Gangliónica Media
Emx	Del inglés, “Empty Spiracles”
Fgf8	Del inglés, “Fibroblast Growth Factor 8”
GABA	Ácido $\gamma$ -aminobutírico
GAD	Del inglés, “Glutamate Descarboxylase”
GFP	Del inglés, “Green Fluorescent Protein”
IsO	Organizador Istmico
LIF	Del inglés, “Leukemia Inhibitory Factor”
MAP2	Del inglés, “Microtubule- Associated Protein 2”
MCI	Masa Celular Interna
NeuN	Del inglés, “Neuronal Nuclei”
Ngn	Neurogenina
Pax	Del inglés, “Paired Box”
PFA	Paraformaldehído
r	Rombómero
Shh	Sonic Hedgehog
SNC	Sistema Nervioso Central

TGF- $\beta$	Del inglés, "Transforming Growth Factor Beta"
TH	Tirosina Hidroxilasa
vMN	Del inglés, "ventral Motoneurons"

## RESUMEN

Hoy en día, nuestras habilidades para dirigir la diferenciación de las células pluripotentes hacia un linaje específico son muy limitadas. Aunque se han desarrollado una gran variedad de protocolos con el propósito de inducir a las Células Troncales Embriónicas (CTE) hacia un fenotipo neuronal particular, debido a que aún no se conocen todos los factores que influyen en estos procesos, la eficiencia de diferenciación es muy baja. Para solucionar este problema, en nuestro grupo se diseñó una estrategia experimental basada en el implante de células en cultivos de explantes del cerebro embrionario, donde se demostró que las células de los Cuerpos Embrionarios (CE) son capaces de responder a las señales del cerebro medio y generar neuronas dopaminérgicas eficientemente. No obstante, aún no podemos concluir qué tan amplio es el potencial de diferenciación de las CTE, ya que podría ser que estas células tengan un sesgo y solo logren generar eficientemente neuronas dopaminérgicas.

El propósito de este trabajo fue determinar si las células de los CE tienen el potencial de responder a las señales inductivas de los explantes de cerebro anterior y posterior. Inicialmente, se observó que se está llevando a cabo neurogénesis en los explantes evaluando el patrón de expresión de varios marcadores neuronales. Además, se detectaron marcadores de neuronas específicas de telencéfalo ( $GAD_{65/67}$  y  $Foxg1$ ) y de cerebro posterior (serotonina) lo que demuestra que hay un desarrollo de estos fenotipos neuronales en los explantes muy similar al normal. Después se analizó la diferenciación de las células de los CE implantadas en los explantes. Las células que se integran a los explantes de cerebro anterior y posterior diferencian a neuronas, visto por la expresión de  $\beta$ -III-Tubulina. Además, las células diferenciaron a neuronas GABAérgicas cuando fueron implantadas en la eminencia gangliónica media y lateral. Los datos obtenidos sugieren que los explantes de cerebro anterior y posterior están recapitulando la neurogénesis embrionaria y que las células de los CE son capaces de responder a las señales inductivas en estos explantes.



## ABSTRACT

To date, our abilities to direct pluripotent stem cells within specific differentiation lineages are very limited. A great variety of experimental protocols have been developed in order to induce Embryonic Stem Cells (ESCs) differentiation to a particular neuronal phenotype. However, because all factors that influence the differentiation process are not known, the differentiation efficiency is so far generally low. To overcome these problems, in our laboratory it was designed an experimental strategy based on the transplantation of donor cells to explant cultures of embryonic brain regions. Using this strategy, it was demonstrated that Embryoid Body (EB) precursors are able to respond to midbrain specification signals to efficiently generate dopaminergic neurons. Even though, we cannot conclude how broad the ESC differentiation potential is, as it is possible that these cells have a bias and only able to efficiently generate dopaminergic neurons.

The goal of the present work is to determine whether EB's precursors have the potential to respond to inductive signals within forebrain and hindbrain explants cultures. Initially, we evaluated the expression pattern of neuronal markers to validate if explants present a similar development to that shown in embryos. We observed abundant neurogenesis in forebrain and hindbrain explants. In addition, detection of GAD, which identifies GABAergic neurons in the forebrain, Foxg1, a specific forebrain marker, and serotonin, which identifies serotonergic neurons in the hindbrain, demonstrated near normal development of specific neuronal phenotypes within the explants. After validating these results, we analyzed the differentiation of EB cells when transplanted to explants. EB's cells integrated into forebrain and hindbrain explants differentiated into neurons as seen by the expression of  $\beta$ -III-Tubulin. Furthermore, EB's precursors differentiated into GABAergic neurons after integration at the lateral and medial ganglionic eminence. Our data suggest that forebrain and hindbrain explant cultures recapitulate embryonic neurogenesis and that EB's cells are able to respond to the inductive signals within the explants.

## I. INTRODUCCION

### a. Desarrollo embrionario temprano en mamíferos y formación del sistema nervioso central

El desarrollo comienza con una célula totipotente, el óvulo fertilizado. Después de la fertilización del óvulo por el espermatozoide se forma el cigoto que comienza a dividirse mitóticamente para formar los blastómeros (células que se les considera totipotentes porque son las únicas capaces de generar al embrión completo y a los tejidos extraembrionarios). Los blastómeros se dividen dando lugar a una estructura que recibe el nombre de mórula, la cual consiste de dos grupos de células, uno interno, y otro externo y más grande que se convertirá en su mayoría en el trofoblasto (que producirá las estructuras no embriónicas como la placenta). Las células internas, junto con algunas células que se separan del trofoblasto, generan la masa celular interna (MCI) (a estas células se les considera pluripotentes porque darán lugar a todas las capas germinales). La distinción entre el trofoblasto y la MCI representa el primer proceso de diferenciación en el desarrollo de los mamíferos. Durante el proceso de cavitación de la mórula, la MCI se posiciona en un lado del anillo formado por el trofoblasto. La estructura resultante recibe el nombre de blastocisto. En el blastocisto, la primera segregación de células dentro de la MCI forma dos capas: la capa inferior, el hipoblasto, da lugar al endodermo extraembrionario, que a su vez formará el saco vitelino; y la capa superior, el epiblasto. El epiblasto generará el ectodermo amniótico, que cubre la cavidad amniótica; y el epiblasto embrionario, que contiene las células que generarán la diversidad celular presente en el embrión [1].

El proceso siguiente en el desarrollo del embrión es la gastrulación, la cual es crítica en los vertebrados. En mamíferos, esta invaginación produce las tres capas germinales:

1. Endodermo (del griego *endos* “dentro” y *derma* “piel”): es la capa más interna del embrión, produce el epitelio del tubo digestivo y sus órganos asociados.

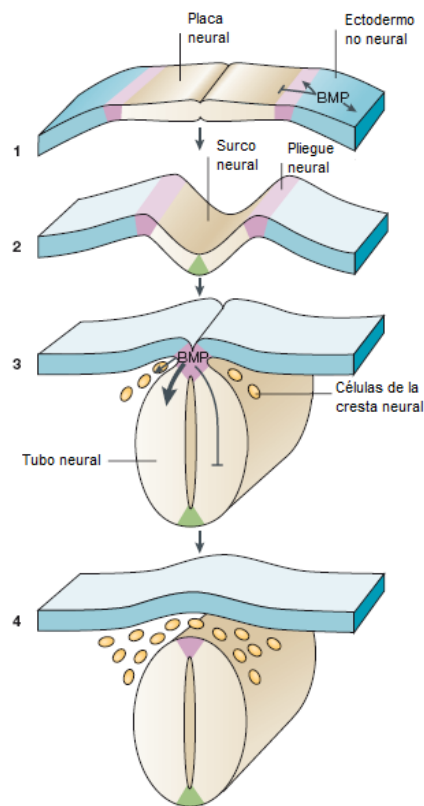
2. Mesodermo (del griego *mesos* “en medio”): de esta capa se derivan la sangre, el corazón, los riñones, las gónadas, los huesos, los músculos y el tejido conectivo.
3. Ectodermo (del griego *ektos* “afuera”): genera las capas exteriores del embrión, produce la piel y da origen al tejido neural.

Una consecuencia clave de la gastrulación en los cordados es la formación de la notocorda, integrada por un agregado del mesodermo, que define la línea media del embrión. El ectodermo que se encuentra inmediatamente arriba de la notocorda es llamado neuroectodermo, que es de donde se genera todo el sistema nervioso. Además de determinar la posición del sistema nervioso, la notocorda es requerida para enviar las señales inductivas a las células del neuroectodermo para que los precursores neurales se especifiquen a lo largo del eje dorso-ventral [2]. Las células pluripotentes del epiblasto pasan por cuatro estadios para convertirse en células precursoras neurales o neuroblastos:

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

Debido a este proceso de diferenciación, la parte media del ectodermo se engruesa y se distinguen sus células por su apariencia de columna. Esta región del embrión es llamada placa neural. Los márgenes laterales de la placa neural posteriormente se doblan para transformar la placa en un tubo, mediante un proceso llamado neurulación (Fig. 1). Existen dos mecanismos, principalmente,

que convierten a la placa neural en el tubo neural. Uno de ellos es la neurulación primaria, en la cual las células que rodean la placa neural inducen la proliferación de las células que integran la placa, que posteriormente invagina para separarse de la superficie y formar un tubo hueco. El otro es la neurulación secundaria, en donde el tubo neural se forma a partir de una cuerda sólida de células que se hunden en el embrión y que posteriormente cavitan para formar un tubo hueco. En general, la región anterior del tubo neural se crea por neurulación primaria, mientras que la parte posterior lo hace por neurulación secundaria [1].



**Figura 1. Formación del tubo neural por la neurulación.** El SNC proviene de un epitelio especializado, la placa neural (1). El plegamiento de la placa neural para formar el surco neural es desencadenado por la formación de un punto de doblamiento en la región ventral (la placa del piso; 2). Al final de la neurulación, los bordes laterales de la placa neural se funden (3) y se separan del epitelio no-neural para formar el tubo neural (4). La placa del techo y la placa del piso forman la línea media dorsal y ventral del tubo neural, respectivamente (Modificado de [3]).

## **b. La diferenciación del tubo neural**

Un conjunto de vesículas se desarrollan en la parte anterior de este tubo, indicando el patrón neural a lo largo del eje antero-posterior: el prosencéfalo o cerebro anterior, el mesencéfalo o cerebro medio, y el romboencéfalo o cerebro posterior. Simultáneamente, el tubo neural se divide a lo largo de su eje dorsoventral, influenciado por el tejido meso-endodermal subyacente, así como por el efecto de estructuras ectodermales no neurales. Así, la placa del piso, la placa basal, la placa alar y la placa del techo se desarrollan en el tubo neural de la región ventral a la dorsal. Como resultado de estos eventos, una gruesa red tridimensional de identidades posicionales se establece en el eje neural embrionario, montando las bases de toda la especialización regional.

### **i. El eje dorso-ventral**

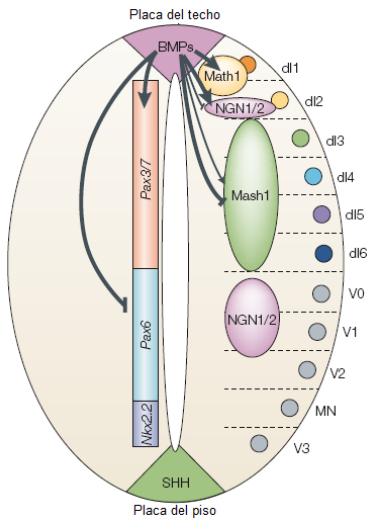
El establecimiento del patrón a lo largo del eje dorsoventral del tubo neural depende de la concentración de factores de dorsalización de la superfamilia de TGF- $\beta$  ("Transforming Growth Factors") de la cual forman parte las BMP ("Bone Morphogenetic Protein"), que emanan del ectodermo no neural; y de factores de ventralización como Sonic Hedgehog (Shh), que son producidas por la notocorda y la placa del piso.

Shh establece un gradiente en el tubo neural, y la diferencia de concentraciones causa la formación de distintos tipos celulares. Esta proteína es procesada mediante un rompimiento mediado por el colesterol, y su forma activa (la parte del amino-terminal) es secretada de la notocorda e induce la formación de la placa del piso del tubo neural, cuyas células también secretan Shh, lo cual forma un gradiente con la mayor concentración en la zona más ventral del tubo neural. Las concentraciones en gradiente de Shh provocan que diferentes grupos de precursores neurales expresen distintos tipos de factores transcripcionales. Estos factores transcripcionales, en consecuencia, activan genes cuyas proteínas les dan identidad a las células. Sonic Hedgehog podría actuar también activando una

vía represora sobre la expresión de genes que codifican factores de transcripción del tubo neural dorsal, lo cual evita que estos genes sean expresados a través de todo el tubo neural [4].

Los destinos dorsales del tubo neural se establecen por proteínas de la superfamilia de TGF- $\beta$ , especialmente BMP4 y BMP7, dorsalina y activina. Inicialmente los BMPs se encuentran en la epidermis. Así como la notocorda establece un centro de señalización secundario, las células de la placa del piso, la epidermis establece otro centro de señalización, la placa del techo, inducido por la expresión de BMP4. La proteína BMP4 es secretada por las células de la placa del techo lo cual produce una cascada de TGF- $\beta$  en las células adyacentes. Los gradientes temporales y de concentración de TGF- $\beta$  inducen la expresión de diferentes tipos de factores de transcripción en células a diversas distancias de la placa del techo, generando diferentes identidades [5].

El primer indicativo de la determinación dorso-ventral es la expresión estereoespecífica de las familias de genes con caja homeótica *Pax* ("Paired Box") y *Nkx* en los progenitores celulares de la médula espinal (Fig. 2). *Pax3* y *Pax7* se expresan en los progenitores dorsales, y *Pax6* lo hace en la región ventral intermedia. Los progenitores ventrales (localizados en la región adyacente a la placa del piso) expresan *Nkx2.2*. Posteriormente, los progenitores neurales se subdividen, como lo muestra la expresión de diferentes factores de transcripción pertenecientes a la familia de bHLH ("basic helix-loop-helix") y con homeodominios como *Math*, *Mash* y *Neurogenina*. Gracias a esto surgen poblaciones específicas de neuronas diferenciadas (interneuronas dorsales (dl) 1-6, interneuronas ventrales (v) 0-3, y motoneuronas) de estos distintos dominios establecidos por los factores de transcripción. La expresión específica de estos factores está definida por las señales provenientes de las proteínas de la familia TGF- $\beta$  y de Shh [3].



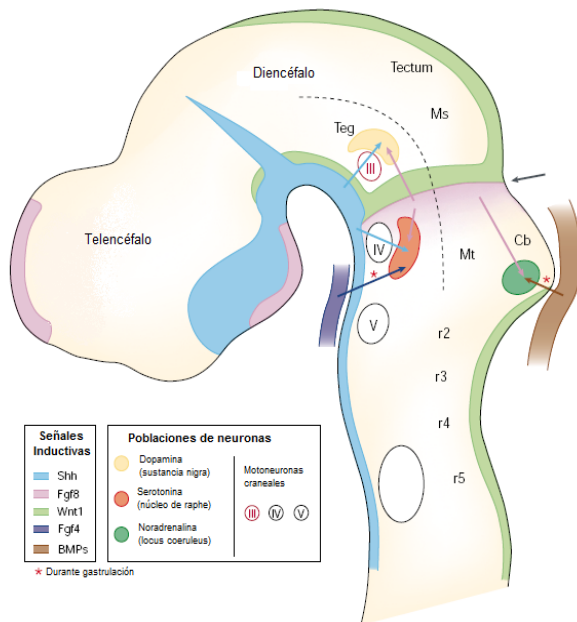
**Figura 2. Especificación de la médula espinal a lo largo del eje dorsoventral.** Esquema de la placa del techo que expresa BMPs, así como otras proteínas de la familia de los TGF- $\beta$ ; y la placa del piso, la cual expresa Shh. Los progenitores neurales están divididos en dominios ventrales muy amplios, gracias a la expresión diferencial de los genes *Pax*. Después, la médula espinal se subdivide por la expresión de los factores de transcripción de la familia bHLH y factores de transcripción con homeodominio. La regionalización de los precursores lleva a la formación de distintos tipos neuronales dorsales y ventrales, llamados interneuronas dorsales (di1-6), interneuronas ventrales (V0-3) y motoneuronas (MN) (tomado de [3]).

## ii. El eje antero – posterior

En sus etapas más tempranas, el tubo neural se divide en tres vesículas primarias: cerebro anterior (prosencefalo), cerebro medio (mesencefalo), y cerebro posterior (romboencefalo). El prosencefalo se subdivide en dos: la región más rostral, el telencefalo, y la más caudal, diencefalo. El telencefalo eventualmente formará los hemisferios cerebrales y el diencefalo, el tálamo e hipotálamo, que reciben estímulos nerviosos de la retina (la cual también se deriva del diencefalo). El mesencefalo no sufre ninguna subdivisión, y su lumen eventualmente se convierte en el acueducto cerebral. El romboencefalo se divide en mielencefalo, la parte posterior, y en metencefalo, más anterior. El mielencefalo se convertirá en la médula oblongata, cuyas neuronas generan los nervios que regulan los movimientos respiratorios, gastrointestinales y cardiovasculares. El metencefalo forma el cerebelo, la parte del cerebro responsable de coordinar los movimientos, la postura y el balance. El romboencefalo desarrolla un patrón segmental que especifica los lugares donde se originan ciertos nervios. Los rombómeros, engrosamientos periódicos, dividen al romboencefalo en pequeños compartimentos; estos rombómeros representan “territorios” separados de desarrollo en los cuales las células de cada rombómero se mezclan libremente entre sí, pero no con células de los adyacentes.

El establecimiento del patrón en el eje antero-posterior (A-P) aún no está bien comprendido. Se cree que la compartimentalización en unidades morfogénéticas, las cuales mantienen su identidad posicional debido a una restricción clonal, tiene lugar, al menos en parte, para el establecimiento y mantenimiento de patrones más refinados en el romboencéfalo y posiblemente en el prosencéfalo. Además, centros de señalización secundarios podrían estar actuando para refinar las identidades locales a lo largo de todo el eje A-P. Se sabe de la presencia de dos centros de señalización en la placa neural. Uno es la cresta anterior neural que se encuentra en la conexión entre el prosencéfalo y el ectodermo anterior, y es necesaria para el mantenimiento de las identidades del cerebro anterior. El segundo, es el organizador del istmo (IsO), que yace entre el cerebro medio y el posterior, el cual es necesario y suficiente para el desarrollo de las estructuras mesencefálicas y metencefálicas (Fig. 3).

La integración de las señales antero-posteriores y dorsoventrales alrededor de los ejes de organización determinan la inducción de fenotipos neuronales específicos en el sistema nervioso central de manera dosis y tiempo dependientes.



**Figura 3. La interacción de las señales que especifican a las neuronas en los ejes D-V y A-P en la frontera entre el cerebro medio y el posterior.** Vista sagital de un ratón E11. Las señales inductivas mostradas (factores secretados, flechas) se originan de la placa neural en la unión mes-metencefálica (Fgf8) y la placa del piso (Shh), así como de tejidos no neurales durante la gastrulación (Fgf4 del mesodermo anterior, y BMPs del ectodermo dorsal no neural). Las motoneuronas del nervio craneal III y las neuronas dopaminérgicas del tectum responden a la combinación de Shh y Fgf8. Las neuronas serotoninérgicas del puente requieren la señalización temprana de Fgf4, seguida de Shh y Fgf8. Las neuronas noradrenérgicas del locus coeruleus requieren Fgf8 y Bmp4. La flecha indica la frontera entre el cerebro medio y el cerebro posterior. (Cb, cerebelo; Ms, mesencéfalo; Mt, metencéfalo; r, rombómeros; Teg, tectum; Tel, telencéfalo)

(tomado de [6]).



### c. La diversidad neuronal

La diversidad neuronal se establece por mecanismos que operan en espacio y tiempo durante el desarrollo del SNC. Las señales locales inductivas determinan el patrón espacial de expresión de los factores de transcripción a lo largo de los ejes dorso-ventral y antero-posterior del tubo neural; así, los progenitores neuronales que se encuentran en distintas posiciones adquieren diferentes identidades moleculares.

El fenotipo final de una neurona comprende características neuronales genéricas que son compartidas por todas las neuronas, características comunes a varios tipos neuronales, o características únicas de una clase de neuronas, como la proyección de axones a una región específica. Así, el desarrollo neuronal envuelve una diferenciación tanto estructural como molecular. Cada neurona debe activar los genes que codifican las enzimas que sintetizan el neurotransmisor específico del sitio donde se localizan. Algunas neuronas desarrollan la habilidad de sintetizar y secretar acetilcolina, mientras otras neuronas desarrollan las rutas enzimáticas para sintetizar y secretar adrenalina, noradrenalina, serotonina, ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA), dopamina, o algunos otros neurotransmisores.

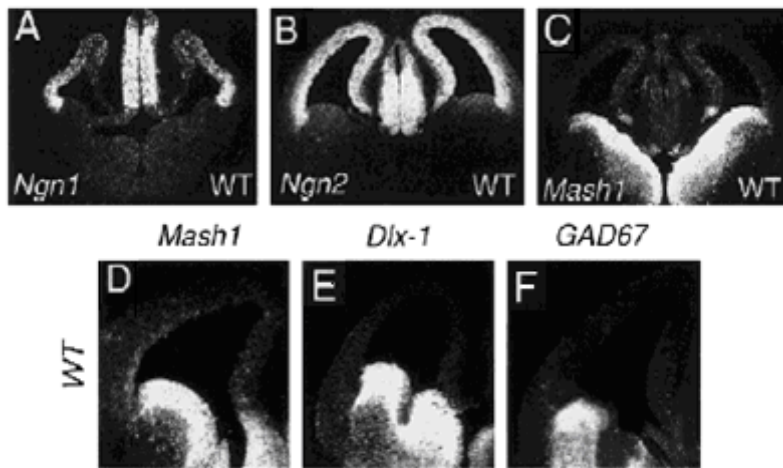
#### i. Diferenciación GABAérgica y glutamatérgica en el cerebro anterior

Las interneuronas GABAérgicas en la corteza cerebral forman una parte del conjunto neuronal que tiene funciones tanto sensoriales como de la formación de la memoria. En una de las mayores enfermedades humanas, la epilepsia, se observa una deficiencia de las interneuronas GABAérgicas, lo que provoca una desregulación en la función de los circuitos corticales neuronales. En el cerebro adulto de los mamíferos, dañado por tal enfermedad, no se observa una regeneración espontánea de las neuronas corticales.

En el telencéfalo embrionario, el cual da lugar dorsalmente a la corteza cerebral y centralmente a la ganglia basal, los genes con caja homeótica *Emx1*, *Emx2*

(“Empty Spiracles”) y *Pax6* se expresan exclusivamente en los progenitores dorsales, mientras que los ventrales expresan los genes *Nkx2.1* y *Dlx1/2* (“Distal-Less”). Las neuronas postmitóticas también tienen distintos fenotipos moleculares en estas dos subdivisiones del telencéfalo. Por ejemplo, *Gad1/2*, que codifica para la enzima ácido glutámico descarboxilasa requerida en la biosíntesis de GABA, es expresada por las neuronas telencefálicas ventrales de la ganglia basal, mientras que los factores de transcripción bHLH *NeuroD*, *Math2*, *Nsc1/2* y el gen con caja T *Tbr1* se expresan solo neuronas dorsales de la corteza cerebral [7].

En el ratón, en el día embrionario 12.5 la expresión de *Neurogenina1/2* (*Ngn1* y *Ngn2*) está restringida a la zona ventricular del telencéfalo dorsal. *Mash1* se expresa mayoritariamente en los progenitores ventrales localizados en la eminencia gangliónica lateral y en la media (EGL y EGM, respectivamente) y, en bajos niveles, en el telencéfalo dorsal (Fig. 4) [8].

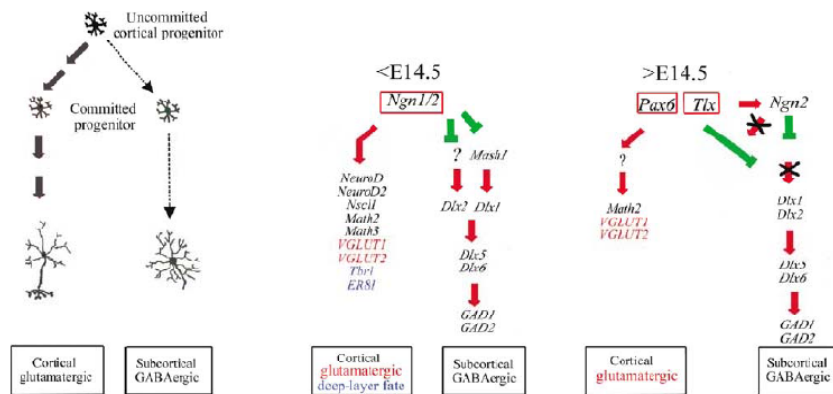


**Figura 4. Expresión de marcadores en el telencéfalo.** (A-C) Secciones coronales de ratón silvestre E12.5, (A) Distribución de los transcritos de *Ngn1*, (B) *Ngn2*, (C) *Mash1*, (D-F) Secciones coronales de telencéfalo de ratón silvestre E13.5, (D) Distribución del transcrito de *Mash1*, (E) *Dlx-1*, (F) *GAD67* (Modificado de [8]).

Una de las funciones de las neurogeninas es evitar la expresión de *Mash1* en los progenitores dorsales. En experimentos realizados con el doble mutante de ratón *Ngn2;Mash1* se ha observado que los marcadores de progenitores dorsales (*Gli3*, *Pax6*, *Emx2*, *Lhx2*, *Foxg1*, *Otx1*) no alteran su expresión en E13.5, no así los factores de transcripción específicos de neuronas corticales (*Math2*, *Nsc1*, *NeuroD*, *Tbr1/2*), los cuales bajan su expresión normal. Los genes que codifican

para los transportadores vesiculares de glutamato 1 y 2 (VGLUT1/2), que se expresan específicamente en neuronas dorsales que usan glutamato, también sufren una disminución en su expresión [9]. De forma inversamente proporcional, muchos de los componentes de la diferenciación GABAérgica (*Mash1*, *Dlx1*, *Dlx2*, *Dlx5*, *Brn4*, *GAD1/2*) son activados ectópicamente en el mutante [8, 9]. Por esto se cree que las neuronas corticales eligen entre un fenotipo glutamatérgico y el GABAérgico.

Estudiando los patrones de expresión de los marcadores corticales y ventrales en el ratón mutante *Ngn2;Mash1* se ha concluido que las neurogeninas activan directamente la ruta de diferenciación cortico-glutamatérgica, ya que la pérdida de las neuronas con características corticales en los mutantes de *Ngns* es independiente de la sobreexpresión de *Mash1*. Así, *Ngn1/2* especifican fenotipos regionales y de neurotransmisores vía múltiples mecanismos, incluyendo la activación de rutas dorsales-corticales específicas, y la represión de programas telencefálicos ventrales que son *Mash1*-dependientes e independientes [9] (Fig. 5).

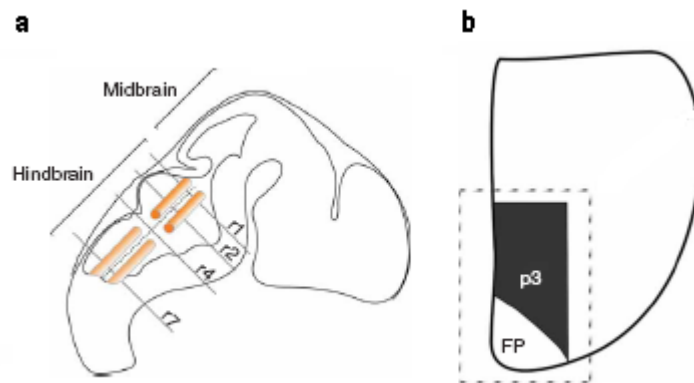


**Figura 5. Modelo de dos fases de especificación neuronal en la corteza.** Cascada celular y genética de la especificación del fenotipo neuronal en la neocorteza. La etapa temprana (<E14.5) es dependiente de *Ngn1/2*, la cual induce la expresión de los programas cortical, glutamatérgico y la especificación de las capas más bajas; simultáneamente, reprime la diferenciación de la diferenciación GABAérgica. La fase tardía (>E.14.5) ocurre en ausencia de *Ngn1/2* y es dependiente de la interacción entre *Tlx* y *Pax6*, los cuales especifican las identidades glutamatérgicas y corticales mientras reprime el fenotipo GABAérgico [9].

- ii. Diferenciación de motoneuronas y neuronas serotoninérgicas en el cerebro posterior

Las motoneuronas ventrales (vMN) y las neuronas serotoninérgicas en el cerebro posterior emergen de un mismo grupo de progenitores neuronales a distinto tiempo durante el desarrollo. Las vMN inervan a los músculos craneales y contribuyen a los circuitos autonómicos. Las neuronas serotoninérgicas, las cuales utilizan el neurotransmisor serotonina (5-hidroxitriptamina, 5-HT, sintetizada a partir del triptófano), regulan varios procesos psicológicos. En el ratón, las vMN nacen primero, entre el día E9 y E10.5, posteriormente se generan las neuronas serotoninérgicas entre E10.5-E12 (Fig. 6). Este patrón de generación neuronal se ve alterado en dos niveles antero-posteriores: en el rombómero (r)1, donde aproximadamente la mitad de todas las neuronas que se forman son serotoninérgicas y no hay una fase previa de generación de vMN; y en el r4, donde solo se generan vMN [10].

**Figura 6. Localización de los grupos de motoneuronas y neuronas serotoninérgicas en el cerebro posterior** (a) Esquema de una vista lateral del tubo neural en un ratón. b) Esquema de la localización del dominio p3. FP, placa del piso. (Modificado de [11]).



Las vMN y las neuronas serotoninérgicas tienen un origen común, una pequeña población de progenitores en el dominio p3 en el neuroepitelio del cerebro posterior ventral. La señal de Shh, que emana de la placa del piso, especifica a los progenitores nacientes de p3 e induce la expresión del factor de transcripción *Nkx2.2*, el cual parece ser suficiente para inducir la diferenciación de las vMN y de las neuronas serotoninérgicas. *Nkx2.9* también comienza su expresión al mismo tiempo que *Nkx2.2* en los progenitores y se cree que podría tener un papel compensatorio [12].

Para que se lleve a cabo la transición de motoneuronas a neuronas 5-HT en los r2-r3 y r5-r7 se requiere un cambio en el patrón de expresión de  $Nkx2.2^+/Nkx2.9^+/Phox2b^+$  a  $Nkx2.2^+/Nkx2.9^-/Phox2b^-$  [12]. *Phox2b* mantiene una identidad inicial de vMN reprimiendo a *Foxa2*. El cambio a la neurogénesis serotoninérgica se inicia por represión recíproca de *Phox2b* por *Foxa2*, y se consolida por la activación de los determinantes serotoninérgicos que se encuentran río abajo de *Foxa2* [11]. En el r1, *Phox2b* no es necesario (de hecho nunca se expresa) y la generación de al menos un grupo de neuronas serotoninérgicas es independiente de *Nkx2.2*. En r4, la formación de neuronas 5-HT se previene gracias al mantenimiento de la expresión de *Phox2b* por *Hoxb1* (cuya expresión, a su vez, es mantenida por *Nkx6.1/6.2* y *Hoxb2*) (Fig. 7) [10].

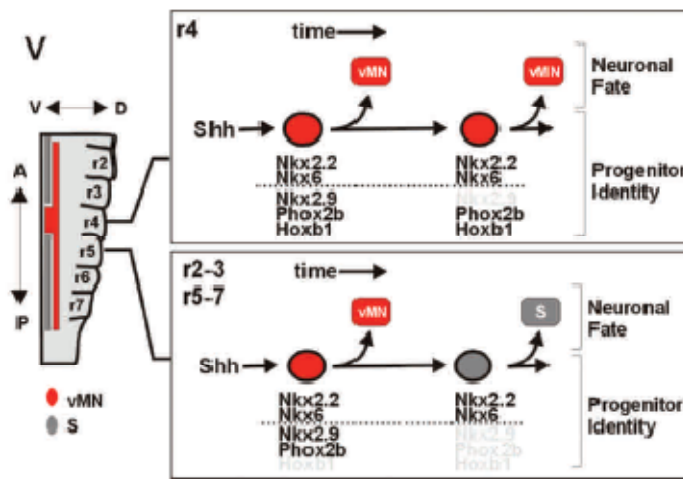


Figura 7. Perfil de expresión espacial y temporal de la generación de motoneuronas y neuronas 5-HT en el cerebro posterior. (Modificado de [12]).

El gen *Mash1* se coexpresa con *Phox2b*, pero su función de especificación es suprimida por *Phox2b* y su función proneuronal solo se revela hasta que baja la expresión de *Phox2b*; sin embargo, para que se produzcan neuronas postmitóticas (vMN o serotoninérgicas) se requieren ambas proteínas [10]. *Nkx2.2* y *Mash1* se requieren para la especificación del fenotipo 5-HT, aunque, debido a que en otros progenitores no serotoninérgicos se expresan ambos genes, al menos un tercer determinante debe estar actuando. Se conocen al menos tres factores de transcripción que están río abajo de *Nkx2.2* y *Mash1*. Estos tres factores *Gata3*, *Pet1* y *Lmx1b* se encienden en los precursores postmitóticos y

todos son requeridos para la síntesis de 5-HT. Estos no constituyen una cascada transcripcional, si no que son encendidos paralelamente de una manera complicada según las observaciones [10].

#### **d. El sistema nervioso central y las células troncales**

Una característica intrínseca del sistema nervioso central es su enorme diversidad celular. Las células troncales neurales (CTN), que son células multipotentes (que solo son capaces de generar células del linaje neuronal), son la fuente de todos estos tipos neuronales. Estas células aparecen durante la formación de la placa neural y posiblemente constituyen el grupo más grande de células del neuroectodermo. Cuando se forma el tubo neural, las CTNs se vuelven menos abundantes y emergen progenitores celulares más restringidos. Posteriormente, cuando las estructuras del sistema nervioso están más definidas, comienza una migración compleja de las células guiada por patrones de diferenciación, lo que definen los circuitos neuronales estereotípicos del sistema nervioso [13].

El saber de la presencia de CTNs en el cerebro adulto ha incitado a los investigadores a considerar la posibilidad de activar endógena o exógenamente a las CTNs con el propósito de recuperar la pérdida de neuronas específicas. Para esto, es esencial determinar el potencial de diferenciación de células troncales neurales del embrión y del adulto, así como caracterizar los ambientes neurogénicos en el cerebro.

El desarrollo embrionario es un proceso altamente organizado que involucra la expresión espacio-temporal precisa de las señales correctas. Las células troncales embrionarias (CTE) han sido utilizadas como plataforma para estudiar la regulación de la diferenciación a un linaje específico con el fin de entender el desarrollo normal y de diversas patologías, así como el potencial terapéutico de células diferenciadas derivadas de las CTE.

La habilidad de las células troncales pluripotentes para dar lugar a una amplia variedad de células, es la razón por la que se cree que podrían ser útiles para su

uso en terapias basadas en células. Se han aislado tres tipos de células troncales pluripotentes de mamíferos: células de carcinoma del embrión (CCE), células troncales de tumores testiculares; células troncales embriónicas (CTE) derivadas de la masa celular interna; y células germinales embriónicas (CGE) derivadas de las células germinales primordiales del embrión post-implantación [14].

#### **e. Las células troncales embriónicas**

El atributo más extraordinario de las células troncales embriónicas es que, incluso después de una extensa propagación y manipulación *in vitro*, estas células mantienen su capacidad de participar en la embriogénesis. Consistente con su origen del epiblasto, las CTE contribuyen pobremente al endodermo extraembriónico y raramente al trofoblasto; sin embargo, su habilidad de integrarse al embrión y producir quimeras viables es relativamente consistente. Ninguna preferencia particular es detectada en los patrones de colonización de las células troncales embriónicas, y éstas producen progenie funcional diferenciada en todos los tejidos y órganos [2]. Además, mantienen un cariotipo diploide, lo cual es crucial para la meiosis; debido a esto, las CTE son capaces de colonizar el linaje de las células germinales en una quimera, y generar gametos funcionales.

Las células troncales embriónicas provienen de la masa celular interna del blastocisto previo a la implantación. Se comportan *in vivo* como células del epiblasto y pueden generar todos los tejidos incluyendo las células germinales. En cultivos *in vitro* las CTE proliferan y permanecen en un estado indiferenciado en presencia del factor inhibitorio de leucemia (LIF, "Leukemia Inhibitory Factor") y/o una capa de fibroblastos mitóticamente inactivados (células alimentadoras). Cuando se crecen en suspensión, las CTEs forman agregados celulares, llamados cuerpos embrioides (CE), que reproducen algunos procesos tempranos de la embriogénesis. Si los cuerpos embrioides se cultivan en medios que promueven la diferenciación, pueden generar células de las tres capas germinales [14].

Las CTE pueden ser expandidas rutinariamente y producir poblaciones indiferenciadas y relativamente homogéneas. Su expansión puede continuar indefinidamente, y un gran número de poblaciones ( $10^9 - 10^{10}$ ) de células troncales sustancialmente puras puede regenerarse rápidamente. De hecho, las CTE parecen ser inmortales y no muestran evidencia alguna de senescencia [15].

Sin embargo, el mantenimiento de una célula troncal no diferenciada no es autónomo, un medio que contenga todos los nutrientes necesarios no es suficiente. El requerimiento de células alimentadoras sugería la posibilidad de que éstas proveen un factor que suprime la diferenciación y que promueve la autorrenovación de las células troncales. Después se descubrió que las células alimentadoras podían ser sustituidas por preparaciones de medio condicionado. Esto fue confirmado con el descubrimiento de una LIF un miembro de la familia de las citocinas relacionadas a la interleucina-6, que puede mantener la autorrenovación de las células troncales en ausencia de células alimentadoras [16]. LIF es producido por las células alimentadoras y su expresión es estimulada por la presencia de las CTE. Cuando se elimina el LIF del medio, la proliferación continúa pero se induce la diferenciación, y las células troncales no persisten más allá de algunos días. El efecto sobre la autorrenovación de las CTE es exclusivo de LIF y de un pequeño grupo de citocinas relacionadas, las cuales actúan vía el receptor glicoproteína 130 (gp130) [17]. En resumen, la citocina se compromete con gp130 lo que resulta en el reclutamiento de una JAK – cinasa y en la activación del factor de transcripción STAT3.

Además de mantener a las células en estado indiferenciado, otro reto en las investigaciones de las células troncales embrionicas es elucidar el proceso de la toma de decisión del linaje y tipo celular al que diferencian. En ausencia de factores que inhiben la diferenciación de las CTE, ésta se dirige manipulando las condiciones de cultivo por prueba y error. Esto puede hacerse creciendo las células troncales a alta densidad, cultivándolas en diferentes tipos de células alimentadoras, adicionándoles factores de crecimiento, o creciéndolas en sustratos definidos de materia extracelular. En estas condiciones los tipos de células diferenciadas formados pueden variar. Cuando se crecen en suspensión,



las células troncales forman cuerpos embrioides, estructuras que originalmente se describieron en teratomas, los cuales asemejan el embrión temprano previo a la implantación. Cuando forman cuerpos embrioides, la diferenciación de las células troncales puede proceder en forma similar a la que ocurre en el embrión. Muchos diferentes tipos de células pueden derivarse de las células troncales *in vitro*, incluyendo neuronas, glia, cardiomiocitos, miocitos esqueléticos, adipocitos y células hematopoyéticas [18].

Nuestras habilidades para dirigir a las células pluripotentes a rutas específicas de diferenciación y después mantener la viabilidad y maduración de fenotipos diferenciados individuales *in vitro* son bastante limitadas actualmente. La proporción de productos diferenciados está bajo la influencia de diferentes protocolos pero los resultados han sido mezclas de diferentes tipos celulares.

## II. ANTECEDENTES

### a. Las células troncales embriónicas y la diferenciación neuronal

Se han hecho grandes esfuerzos para diferenciar a las CTE a un tipo neuronal particular adicionando inductores específicos. Cuando las células troncales embriónicas son cultivadas en forma de cuerpos embrioides, en presencia de ácido retinóico (AR) se induce una diferenciación neuronal después de disociarlos y sembrando bajo condiciones adherentes (aproximadamente el 40% de las células se neuraliza en comparación con el 0.3% en los controles) [19-21]. Fraichard y col. (1995) encontraron que agregando AR al medio de cultivo, los cuerpos embrioides pueden generar neuronas colinérgicas, (acetilcolinesterasa, AchE, positivas) y neuronas GABAérgicas, (GAD positivas), y, al final del cultivo, el 90% de las neuronas formadas son neuronas maduras (positivas para la proteína-2 asociada a microtúbulos, MAP2). Además de estos tipos de neuronas, también observaron crecimiento de oligodendrocitos y astrocitos. Sin embargo, la adición de ácido retinoico no solo promueve la neuralización de las células de los CE, también les confiere una información posicional posteriorizante [22]. Debido a esto, se han desarrollado protocolos que no utilizan AR para promover la diferenciación neuronal de los cuerpos embrioides.

La adición de morfógenos como Shh, contribuye a la especificación de las células del CE para generar motoneuronas [23] y también a la formación de neuronas dopaminérgicas cuando se conjunta con la acción de Fgf8 [24]. La neuralización con este método muestra que, primero emerge una población de células troncales neurales y después una de neuronas, lo cual sugiere que la diferenciación de las CTE es comparable al programa que se sigue *in vivo*.

Watanabe y col. (2005) han conseguido inducir la diferenciación telencefálica de las CTE optimizando las condiciones de cultivo que ayudan a la diferenciación selectiva de los agregados de CTE *in vitro*. Utilizando algunos factores importantes para el establecimiento de patrones en etapas tempranas del desarrollo del

telencéfalo, principalmente la inhibición de la señalización de los Wnts, en los tiempos y concentraciones adecuadas, lograron inducir la diferenciación de células que expresan marcadores de telencéfalo ventral (Nkx2.1<sup>+</sup>Foxg1<sup>+</sup>) y de diencéfalo ventral (Nkx2.1<sup>+</sup> Foxg1<sup>-</sup>) [25].

Los experimentos con CTEs en cultivo han mostrado que estas células tienen la capacidad para diferenciar a neuronas de diferentes tipos (dopaminérgicas, GABAérgicas, colinérgicas, etc.); sin embargo, aún falta comprobar si las CTE tienen un amplio potencial de diferenciación *per se*. Esto sería un hecho solo si durante la diferenciación de las CTE, las células no adquieren información posicional u otro tipo de instrucción que comprometa su capacidad de diferenciación. En tal caso se esperaría que factores extrínsecos dirijan su diferenciación neuronal específica.

Debido a que aún no se conocen todos los factores que influyen sobre los procesos de diferenciación tanto *in vivo* como *in vitro*, los protocolos de diferenciación específica de las CTE aún no tienen los resultados esperados ya que el número de células que son exitosamente dirigidas al linaje deseado es muy bajo y la diferenciación varía significativamente dependiendo del medio en el que se cultiven las CTE.

Los factores extrínsecos son las señales que tienen influencia sobre las células troncales neurales a lo largo de los ejes dorso-ventral (D-V) y antero-posterior (A-P) del tubo neural en el sistema nervioso de vertebrados, lo que propicia la diferenciación a diversos tipos neuronales. Existen múltiples cuadrantes que se sobrelapan en tiempo y espacio dentro del sistema nervioso; cada cuadrante recibe señales diferentes que tienen efectos sobre la diferenciación específica de las células troncales neurales [26]. Sin embargo, la diferenciación no define la expresión de marcadores de identidad, los cuales generalmente se adquieren en etapas tempranas del desarrollo. Estos marcadores no son suficientes para promover la diferenciación específica (de neurotransmisor, por ejemplo); más bien, éstos comprometen a las células precursoras para que cuando diferencien, restrinjan los tipos neuronales a los que pueden derivar.

Aunque la expresión de marcadores regionales tempranos puede ser intrínseca a las células troncales, la expresión de marcadores tardíos podría requerir la inducción y/o el mantenimiento por señales definidas de regionalización provistas por otras células. La diferenciación específica está influenciada fuertemente por factores extrínsecos, al grado de que los determinantes intrínsecos pueden ser modificados por ellos. Se desconoce si las células troncales embrionarias o los derivados del cuerpo embriónico contienen información que comprometa su capacidad de diferenciación; o si, en general, ésta pueda modificarse por las señales externas.

Para verificar si la diferenciación de células troncales solo depende de factores intrínsecos dados por el origen de las células troncales, se han realizado pruebas implantando estas células en sitios distintos de donde son obtenidas, para observar los efectos del ambiente donde ocurre la inducción de la diferenciación.

Deacon y col. (1998) transplantaron CTEs, en presencia o ausencia de pretratamiento con ácido retinoico, en el cerebro y en la cápsula de riñón de ratas adultas, y observaron la diferenciación a neuronas dopaminérgicas (tirosina hidroxilasa, TH<sup>+</sup>, positivas) y serotoninérgicas (5-HT<sup>+</sup>, positivas). Estas evidencias sugieren que la neuralización podría ser la ruta automática de las células pluripotentes y que ocurre espontáneamente si la prelágrula no recibe señales de inducción para formar ectodermo, mesodermo o endodermo. Sin embargo, en este experimento, el procedimiento de implantación utilizado podría tener influencia sobre los resultados, ya que los implantes a alta densidad pueden evitar las interacciones célula-célula entre las CTE y las células huésped y disminuir las señales recibidas por las CTE emanadas de las células del sitio de implante.

En otro estudio, se implantaron cuerpos embriónicos en el estriado de ratas adultas lesionadas con 6-hidroxidopamina (6-OHDA, sustancia que mata específicamente a las neuronas dopaminérgicas) y se observó que hay diferenciación a neuronas dopaminérgicas (DA) (~20% del total de neuronas), similares a las neuronas de la zona ventral del mesencéfalo adulto, cuando son transplantadas a bajas

densidades. También se encontraron neuronas 5HT<sup>+</sup> (~10%), que parecen incrementar las conexiones sinápticas de las DA [27].

Cuando se implantan cuerpos embrioides neuralizados con AR en la médula espinal de ratas lesionadas, se observa que las células sobreviven por al menos 5 semanas; éstas pueden migrar aproximadamente 8 mm del sitio donde fueron implantadas; que pueden diferenciar a oligodendrocitos, principalmente, así como astrocitos y neuronas maduras sin formar tumores; y que producen un incremento en la función locomotora [28]. En este estudio no se probó si las células que diferencian son neuronas específicas del sitio de implante, sin embargo, muestra la habilidad que tienen las células troncales embrionicas para diferenciar a tipos celulares neurales y repoblar una zona dañada, pudiendo recuperar la pérdida de funciones provocada por el daño.

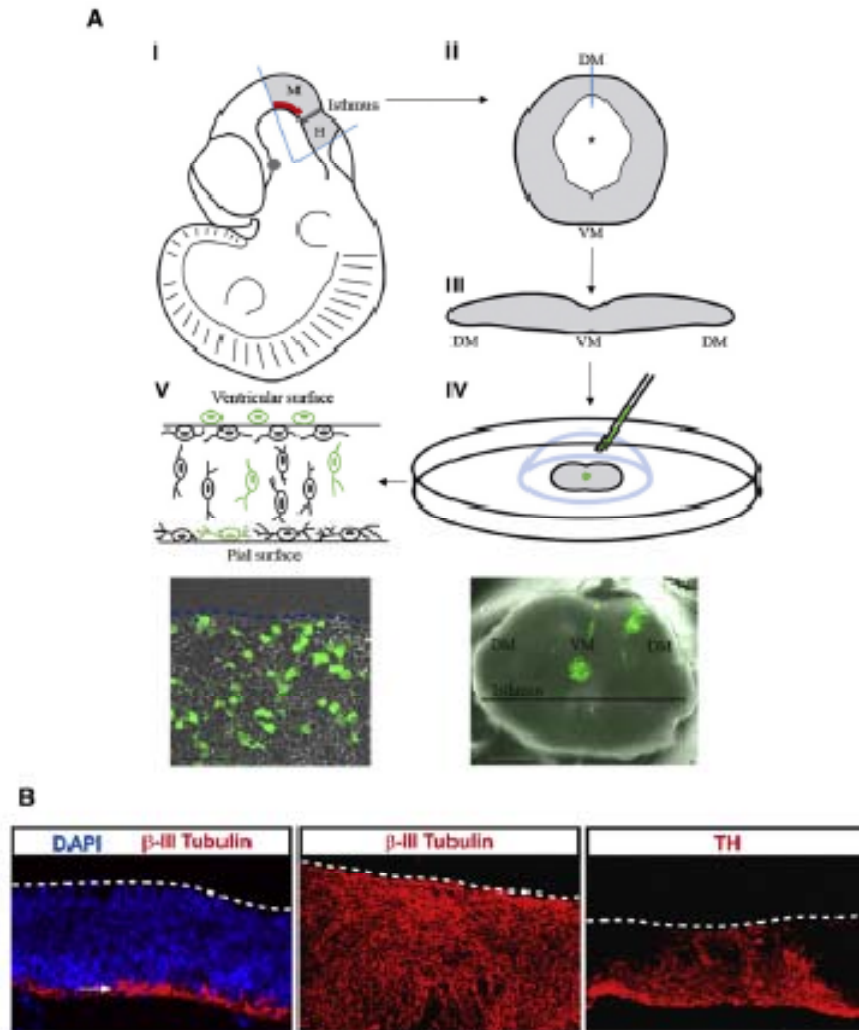
Si bien hay numerosos estudios donde se implantan a las CTE en cerebros adultos, los resultados obtenidos no han sido del todo satisfactorios, ya que muy pocas células logran diferenciar al fenotipo deseado y establecer conexiones con las células huésped; esto puede ser debido a que las señales inductivas que pudieran existir en el cerebro en estas etapas no son suficientes para lograr dirigir completamente al linaje deseado a las CTE que se encuentran en un estado de diferenciación tan primitivo. Para evaluar la diferenciación sitio-específica de las CTE y conocer su potencial real de diferenciación, es necesario exponerlas a todas las señales que inducen la formación de un fenotipo neuronal particular, lo que requiere que sean implantadas en el momento en que inicia la neurogénesis. La técnica del cultivo de explantes, que consiste en disecar una región del tubo neural y cultivarla en una caja de cultivo por varios días, es una herramienta que nos permitiría evaluar el potencial de diferenciación sitio-específica de las CTE ya que es casi seguro que en el explante se encuentran todos los factores necesarios para el desarrollo de las neuronas de esa región del tubo neural.

En el laboratorio se diseñó una estrategia experimental basada en el transplante de CTE a un cultivo de explante de mesencéfalo de E10.5 en colágena (Fig. 8A). Los explantes de mesencéfalos recapitulan el pico de neurogénesis embrionaria,

basados en la expresión de  $\beta$ -III-Tubulina, que se observa desde la zona ventricular hasta la superficie pial del explante; en la expresión de TH, que al inicio del cultivo no se observa y al término de éste aparecen muchas neuronas TH<sup>+</sup> alrededor de la línea media ventral; y en la poca cantidad de células gliales que existe [29] (Fig. 8B). Esto hace a este sistema experimental una herramienta útil para analizar el potencial de diferenciación de las CTE. La competencia para responder a las señales que establecen los patrones en el cerebro medio solo se adquieren después de que las CTE han diferenciado a cuerpos embrioides, ya que las CTE siguen expresando Oct4, factor de transcripción necesario para el mantenimiento de la pluripotencia en las CTE [30], incluso después de su integración al explante.

Los cuerpos embrioides parecen responder a la concentración local de Shh en el sitio de integración en el cerebro medio, ya que las células donantes adquieren específicamente la identidad de las células de los alrededores. Se logran generar neuronas dopaminérgicas mesencefálicas en el dominio de expresión de *Lmx1a* y neuronas GABAérgicas en el dominio de expresión de *Nkx2.2*. La diferenciación de los cuerpos embrioides en el cerebro medio parece estar mediada por mecanismos instructivos, ya que las células no expresan los genes de especificación (*Lmx1a*, *Nkx6.1*, *Nkx2.2* y *Pax7*) antes de ser transplantadas [29].

Los resultados hasta el momento sugieren que la combinación correcta de los factores extrínsecos es suficiente para provocar que los precursores derivados de las CTE recapitulen el desarrollo dopaminérgico a través de la activación de determinantes intrínsecos de las neuronas DA mesencefálicas tempranos (*Lmx1a*) y tardíos (*Pitx3*).



**Figura 8. Procedimiento de “transplante-en-explante”.** (A) Diseño experimental. (I) Representación de la vista lateral de un embrión de ratón E10.5 con el prospecto de explante en gris. (II) Vista frontal del explante aislado; el asterisco indica el lumen del tubo neural. (III) El explante en la posición de “libro abierto”, la región ventral están en medio y la región dorsal está conformada por las dos regiones laterales. (IV) Explante con la superficie ventricular hacia arriba embebido en una matriz de colágena (azul). (V) Representación esquemática de un corte coronal del explante de mesencéfalo; 7 días después del implante, las células GFP<sup>+</sup> han cruzado la superficie ventricular y migrado hacia regiones más piales. La imagen de abajo muestra precursores neurales GFP<sup>+</sup> que se han integrado al explante (la imagen del tejido se tomó en campo claro; la línea punteada azul indica la superficie ventricular). (B) Desarrollo del explante. El mesencéfalo E10.5 muestra solo una pequeña capa de neuronas  $\beta$ -III-Tubulina<sup>+</sup> (flecha) en la superficie pial (imagen de la izquierda). Después de 7 días, los explantes muestran células  $\beta$ -III-Tubulina<sup>+</sup> en todo el grueso del tejido (imagen del medio). Una abundante generación de neuronas TH<sup>+</sup> se observa alrededor de la línea media ventral de los explantes después de 7 días en cultivo (imagen de la derecha). Las líneas punteadas blancas indican la superficie ventricular en todas las imágenes. M, mesencéfalo; H, cerebro posterior; DM, mesencéfalo dorsal; VM, mesencéfalo ventral. Barra de escala: 500  $\mu$ m en IV; 50  $\mu$ m en V (Tomado de [29]).

Mediante esta estrategia se comprobó que las células del cuerpo embrioide son capaces de diferenciar sitio-específicamente hacia neuronas dopaminérgicas del cerebro medio cuando son expuestas a todas las señales de inducción necesarias. No obstante, con esta evidencia aún no podemos concluir qué tan amplio es el potencial de diferenciación de las CTE, ya que podría ser que estas células tengan un cierto grado de compromiso antes de ser expuestas a las señales de diferenciación y por ende, solo logren generar eficientemente neuronas dopaminérgicas.

El presente trabajo pretende resolver esta pregunta induciendo la diferenciación de las células del cuerpo embrioide hacia el fenotipo GABAérgico del telencéfalo y serotoninérgico y de motoneuronas del cerebro posterior, utilizando la estrategia del explante de la misma manera que se hizo para evaluar la diferenciación dopaminérgica [29], pero haciendo los explantes de cerebro anterior y de cerebro posterior de manera independiente.



### **III. HIPOTESIS**

Las células de los cuerpos embrioides diferencian a neuronas específicas de la región del tubo neural donde se integran.

### **IV. OBJETIVO GENERAL**

- Determinar el potencial de diferenciación neuronal de las células de los cuerpos embrioides implantados en el cerebro anterior y posterior.

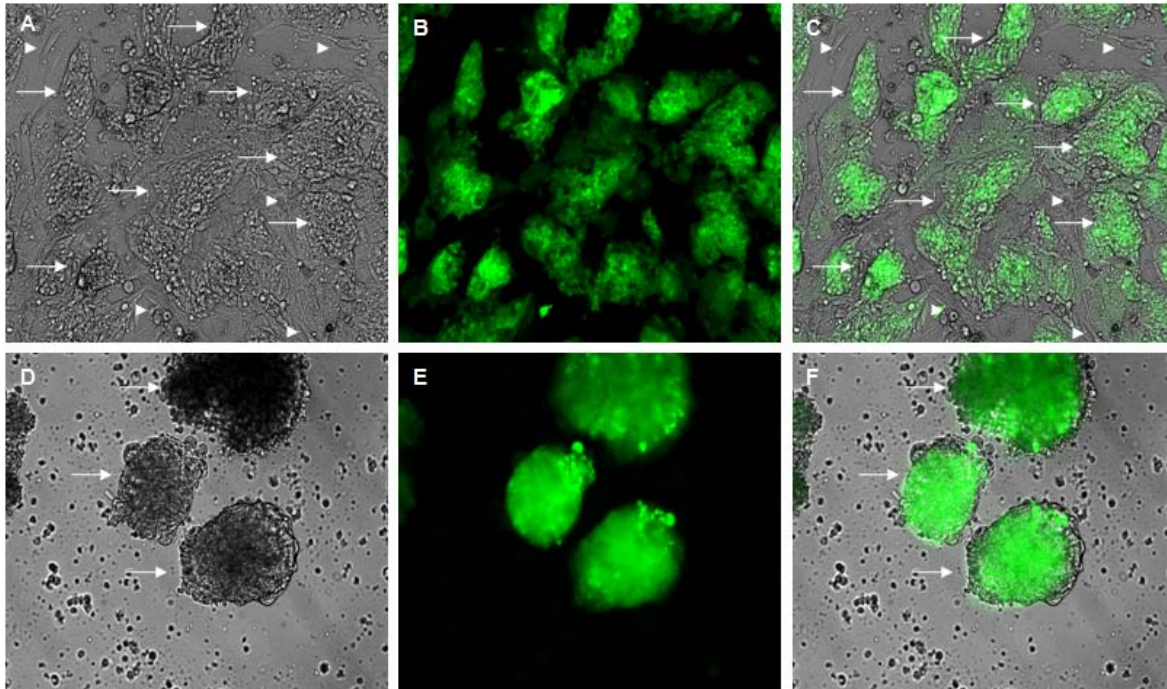
#### **a. Objetivos Particulares**

- Evaluar la diferenciación neural y neuronal de las células de los cuerpos embrioides implantados en el cerebro anterior y posterior.
- Evaluar la diferenciación neuronal sito-específica de las células de los cuerpos embrioides implantados en el cerebro anterior y posterior.

## V. METODOLOGIA

### a. Cultivo de células troncales embriónicas y formación de cuerpos embrioides

La línea de células troncales embriónicas R1B5 (donada por el Dr. Andras Nagy), la cual expresa constitutivamente la proteína verde fluorescente (GFP), se usó en todos los experimentos. Para producir los cuerpos embrioides se siguieron los siguientes pasos: se propagaron las CTE en cajas de cultivo gelatinizadas (Covance, USA) (gelatina de porcino al 0.1%; Sigma, USA) con una monocapa de células alimentadoras (fibroblastos embrionarios, línea STO, mitóticamente inactivados con Mitomicina; Invitrogen, USA) hasta que las CTE llegaron a semiconfluencia (fig. 9A-C); posteriormente se subcultivaron  $2.5 \times 10^6$  células en una caja de 10 cm gelatinizada (condiciones adherentes), sin células alimentadoras, por 4 días en presencia de 1000 U/ml de LIF (Millipore, USA) y cambiando el medio de cultivo diariamente. Este medio (M15) se compone de DMEM, aminoácidos no esenciales 1X, Piruvato de sodio 1x, 15% de suero fetal bovino (todos de Gibco, USA), 0.55 mM 2-β-Mercaptoetanol (Sigma) y GPS 1x (glutamax 200 mM; Gibco; penicilina 3 mg/ml y estreptomycin 5 mg/ml; ambos de Sigma). Después de los 4 días con LIF, se sembraron  $2.0 \times 10^6$  de CTE en cajas bacteriológicas no adherentes (SyM Laboratorios, México) de 10 cm y se cultivaron durante 4 días más en el medio M15 (cambiando el medio al segundo día) para promover la agregación de las células y la formación de los cuerpos embrioides (Fig. 9D-E).

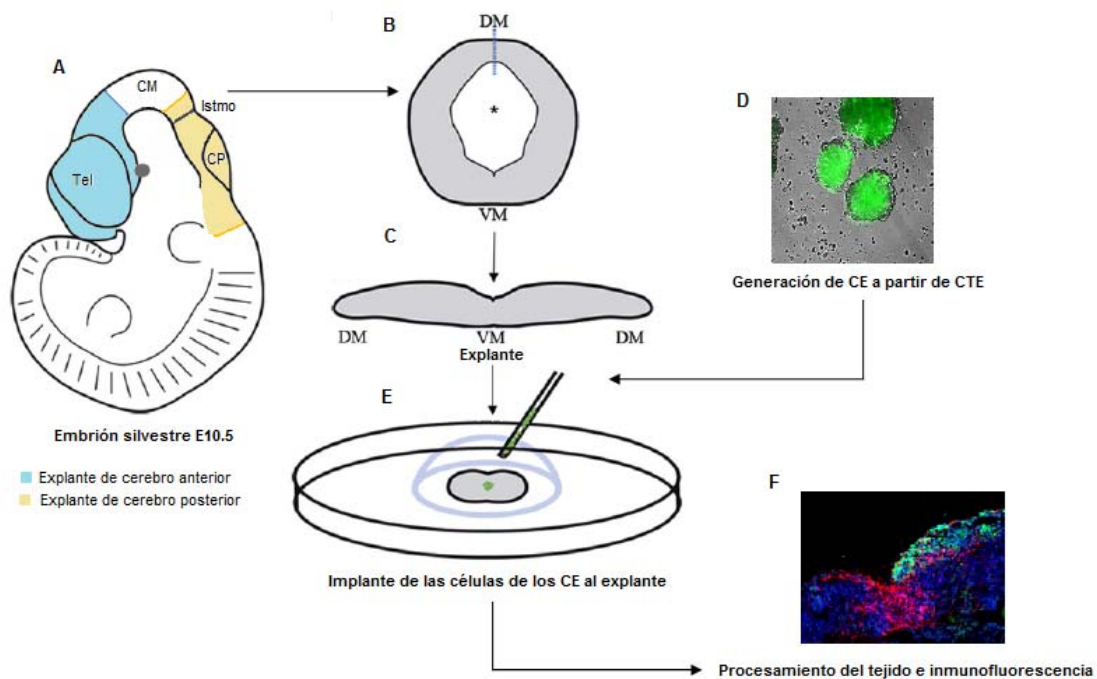


**Figura 9. Células Troncales Embriónicas y sus derivados en cultivo.** (A-C) CTE con 2 días de cultivo en células alimentadoras. (A) Campo claro, 10x. (B) Colonias de CTE GFP<sup>+</sup>, microscopía de fluorescencia 10x. (C) Superposición. Las cabezas de flecha señalan células alimentadoras, las flechas indican colonias de CTE. (D-F) Cuerpos embrioides con 4 días de formación. (D) Campo claro, 10x. (E) Cuerpos embrioides expresan GFP, fluorescencia, 10x. (F) Superposición. Las flechas señalan cuerpos embrioides generados.

## b. Cultivo de explantes

Los explantes de cerebro anterior y cerebro posterior se disecaron de embriones de ratón E10.5 de la cepa CD-1 como se ha descrito previamente [29]. El explante de cerebro anterior se obtuvo cortando en el límite posterior diencéfalo (Fig. 10A en azul), el de cerebro posterior se obtuvo cortando una pequeña parte de cerebro medio adyacente al istmo hasta aproximadamente el rombómero 7 (Fig.10B en amarillo). La línea media dorsal de los explantes se cortó y el tejido se embebió en una matriz de colágena con la superficie ventricular boca arriba. La matriz de colágena contiene: colágena de rata (100  $\mu$ l; donada por el Dr. Alfredo Varela), NaCl 1.5 M (10 $\mu$ l; Sigma, USA), NaHCO<sub>3</sub> al 7.5% (10 $\mu$ l; Sigma, USA) y medio para explantes (300  $\mu$ l). El medio para explantes se compone de Optimem con

Glutamax (72% v/v), DMEM-F12 (25% v/v) (ambos de Gibco, USA), Glucosa 2M (2% v/v; Sigma, USA) y GPS 1x. Los explantes embebidos en la colágena fueron incubados a 37°C por 1 hora para permitir que la colágena polimerizara, después se agregó el medio para explantes de forma que cubriera totalmente los tejidos. Los explantes se mantuvieron en la incubadora (condiciones: 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de humedad) durante 7 días, cambiando la mitad del medio cada dos días. La estrategia general seguida se ilustra en la figura 10.



**Figura 10. Estrategia experimental.** (A) Representación de la vista lateral de un embrión de ratón E10.5 con el prospecto de explante de cerebro anterior (en azul) y cerebro posterior (amarillo). (B) Vista frontal del explante aislado; el asterisco indica el lumen del tubo neural. (C) El explante en la posición de "libro abierto", la región ventral está en medio y la región dorsal está conformada por las dos regiones laterales. (D) Previamente, los cuerpos embrioides son generados a partir de CTE y se hace una suspensión celular con ellos. (E) La suspensión de CE se implanta en el explante que se encuentra con la superficie ventricular hacia arriba embebido en una matriz de colágena (azul). (F) Inmunofluorescencia en un corte coronal del explante; 7 días después del implante, los precusores neurales GFP<sup>+</sup> se han integrado al explante (Modificado de [29]).

### **c. Implantes en los explantes**

Los explantes con la superficial ventricular boca arriba fueron embebidos en la matriz de colágena como se mencionó anteriormente. Las células del cuerpo embrioide se disociaron con tripsina (Gibco, USA) y se concentraron en 20  $\mu$ l de medio M15, después se aspiraron con la punta de una pipeta Pasteur previamente adelgazada para formar un capilar. La punta de la pipeta Pasteur fue introducida en la matriz de colágena y se depositó un pequeño volumen de la suspensión celular sobre la superficie del explante; después de 3 horas de incubación a 37°C, para permitir que las células se adhieran al tejido, se agregó cuidadosamente el medio de explantes [29].

### **d. Procesamiento de los tejidos e inmunofluorescencia**

Los explantes de cerebro anterior y posterior fueron fijados en 4% de paraformaldehído (PFA; Sigma, USA) por 2 horas a 4°C, lavados 3 veces (15 min cada una) en PBS (NaCl 136 mM, KCl 2.6 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.76 mM; todos de Sigma, USA) y después crioprotegidos con sacarosa al 30% (Sigma) durante toda la noche. Posteriormente, los explantes fueron cortados en un criostato (Leica CM1850) con un grosor de 10  $\mu$ m y puestos en laminillas (Corning, USA) cubiertas con gelatina al 1%. Las laminillas fueron cubiertas con la solución de bloqueo, consistente en 0.1% de Tritón X-100 (Bio-Rad Laboratories, USA) 1% de suero de cabra y 0.01% de azida de sodio, por 10-30 min a temperatura ambiente. Los anticuerpos primarios fueron diluidos en la solución de bloqueo y se incubaron con los cortes durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente, los cortes se lavaron 3 veces con PBS y después se incubaron con los anticuerpos secundarios, diluidos en la solución de bloqueo, durante 1 h a temperatura ambiente. Finalmente, las laminillas se lavaron 3 veces con PBS y se les agregó la solución de montaje, constituida de 0.1 M de buffer de carbonato de sodio (Sigma, USA) (pH9) 1:1 con glicerol (J. T. Baker, USA). Los anticuerpos

primarios utilizados fueron:  $\alpha$ -Nestina (1:500; ratón),  $\alpha$ -NeuN (1:200; ratón),  $\alpha$ -5-HT (1:200; rata),  $\alpha$ -GAD<sub>65/67</sub> (1:500; conejo), todos de Millipore (Billerica, MA); y  $\alpha$ - $\beta$ -III-Tubulina (1:1000; conejo) de Covance (Princeton, NJ). Los anticuerpos primarios fueron detectados con los siguientes anticuerpos secundarios: cabra- $\alpha$ -ratón IgGs acoplado a Alexa Fluor 488, 594 y 647, cabra- $\alpha$ -conejo IgGs acoplado a Alexa Fluor 488, 594 y 647 todos de Molecular Probes (Eugene, OR) y cabra- $\alpha$ -rata IgGs de Rockland (Gillbertsville, PA). Las imágenes confocal se tomaron con el microscopio ZEISS LSM 510.

#### **e. Cuantificación y análisis de datos**

Para cuantificar las células se analizaron todos los planos ópticos generados de las imágenes confocales de forma independiente. Solo las células que claramente expresaban los dos marcadores fueron contadas. Cada imagen fue dividida con una cuadrícula para evitar contar dos veces la misma célula. Las células implantadas fueron obtenidas de al menos tres cultivos independientes. Después del implante, la cuantificación se hizo calculando el porcentaje promedio de las células transplantadas positivas para un marcador específico en al menos tres explantes distintos con ayuda del programa *GraphPad Prism 5*.

## VI. RESULTADOS

### a. Cultivo de explantes

#### i. Cerebro anterior

El cultivo de explantes de mesencéfalo embrionario resultó ser una herramienta muy útil para estudiar la diferenciación dopaminérgica de las células de los cuerpos embrioides cuando éstas son implantadas en él [29]. Por tal motivo, decidimos probar si esta misma forma de cultivar explantes podía utilizarse con otras regiones del cerebro embrionario para poder evaluar la diferenciación hacia otros tipos neuronales. Se utilizó la misma metodología descrita anteriormente [29] para hacer explantes de cerebro anterior y de cerebro posterior, independientemente.

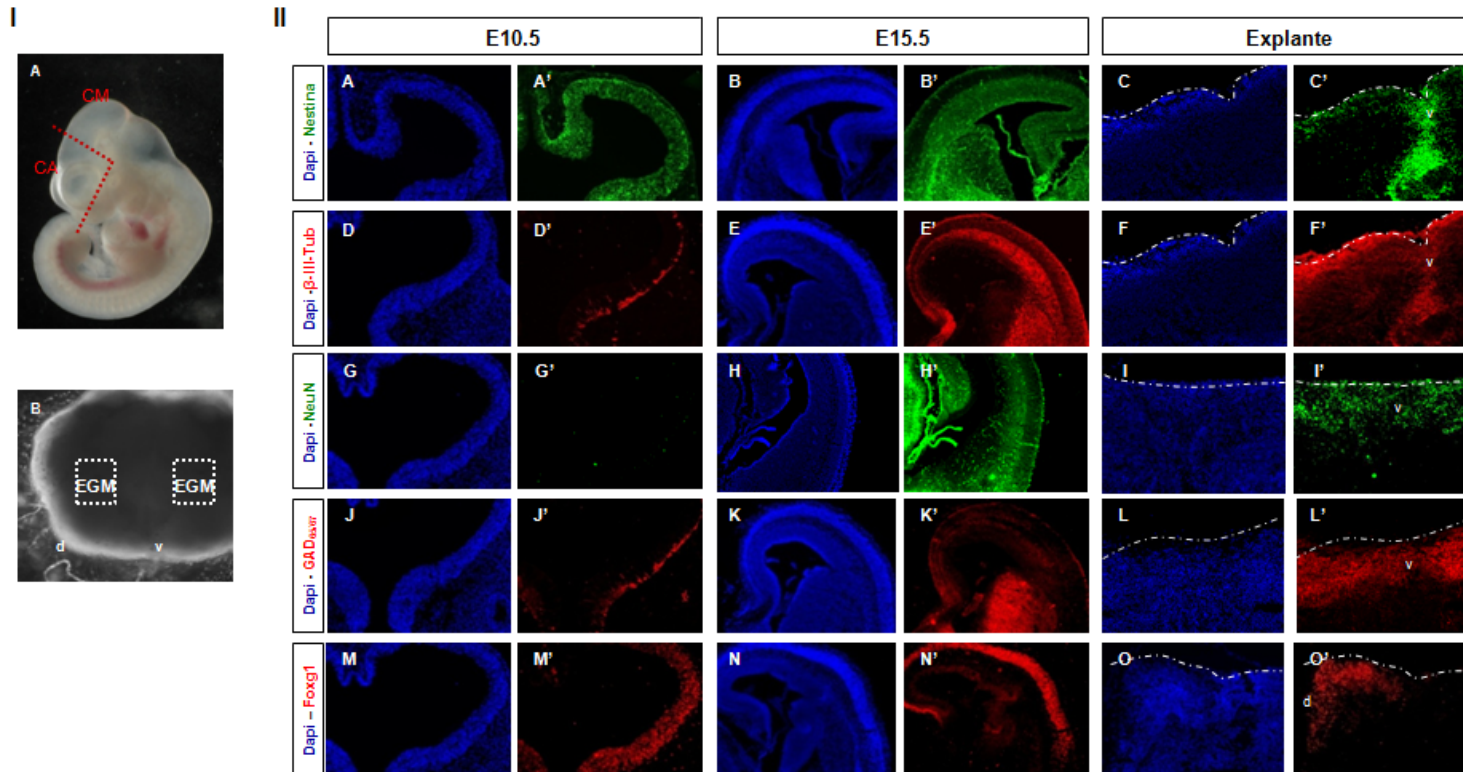
La región del cerebro anterior fue disecada de embriones de ratón de E10.5 (fig. 11 IA), como se describe en la metodología. En esta etapa el marcador de precursores neurales, Nestina, se observa desde la zona ventricular hasta la pial (Fig. 11 IIA-A'), mientras que  $\beta$ -III-Tubulina se localiza en la parte más pial, donde están emergiendo las primeras neuronas inmaduras (Fig. 11 IID-D'). En esta etapa del desarrollo, aun no hay neuronas maduras en el cerebro anterior, por lo que no se detectó la presencia de NeuN (Fig. 11 IIG-G').  $GAD_{65/67}$  se observa en la zona más pial del cerebro anterior desde la región ventral hasta la media lateral (Fig. 11 IIJ-J'), coincidiendo con la localización de  $\beta$ -III-Tubulina, lo que nos dice que GAD comienza a sintetizarse hasta que las células se comprometen al linaje neuronal y dejan de ser precursores neurales. El marcador de células telencefálicas *Foxg1* se detecta en todo lo ancho del tejido, desde la región ventricular hasta la pial (Fig. 11 IIM-M'), coincidente con la localización de Nestina, lo que hace suponer que *Foxg1* se expresa desde la etapa de progenitores neurales.

Para el día 15.5 dpc, la presencia de Nestina se excluye de la zona más pial quedando solo en la región media y la ventricular (Fig 11 IIB-B'), donde siguen

proliferando los progenitores neurales [31]. La distribución de  $\beta$ -III-Tubulina se extiende, mostrándose más fuertemente en la región media y en menor medida en la zona pial (Fig. 11 IIE-E'). NeuN se observa en las regiones media y pial (Fig. 11 IIH-H'), lo que indica que los progenitores se encuentran en las zonas ventriculares y, mientras el proceso de diferenciación avanza, las neuronas maduras van migrando hacia regiones más distales. La expresión de GAD en el telencéfalo está restringida a la eminencia gangliónica media y la eminencia gangliónica lateral (Fig. 11 IIK-K') que es donde se encuentran los progenitores que originan a las neuronas GABAérgicas [8], además de neuronas colinérgicas y oligodendrocitos [32]. En esta etapa, Foxg1 se observa en la zona apical (Fig. 11 IIN-N') excluyéndose de la región ventral del telencéfalo donde se encuentran las neuronas GABAérgicas [33].

Conociendo los patrones de expresión de los diferentes marcadores en el desarrollo embrionario, se prosiguió a estudiarlos en los explantes de cerebro anterior para analizar si en cultivo el explante seguía un desarrollo similar al mostrado *in vivo*. Después de 7 días de cultivo del explante (Fig. 11 IB) vemos que Nestina solo está presente en la región ventricular, preferentemente en la zona más ventral del telencéfalo (Fig. 11 IIC-C'). La expresión de  $\beta$ -III-Tubulina se ve más robusta observándose desde la región ventricular hasta la región pial del explante (Fig. 11 IIE-E'), lo cual muestra que la mayoría de las células ya son neuronas inmaduras. El marcador de neuronas maduras, NeuN, se localiza en la región ventricular del explante, a lo largo de todo el eje dorso-ventral (Fig. 11 II I-l'). Aunque GAD se expresa muy poco al inicio del explante, después de los 7 días de cultivo se pueden encontrar muchas células GAD<sup>+</sup> en la zona ventricular, a ambos lados de la línea media ventral del explante (lo que sería la eminencia gangliónica media), excluyéndose de las zonas más dorsales (Fig. 11 IIL-L'). Foxg1 solo se detecta en las regiones dorsales del explante (Fig. 11 IIO-O'), lo cual se asemeja a al patrón de localización de esta proteína en el embrión de E15.5. Todos estos datos demuestran que los explantes de cerebro anterior recapitulan la neurogénesis embrionaria y que después de los 7 días de cultivo los explantes se asemejan al estadio de 15.5 dpc del embrión de ratón.





**Figura 11. Expresión de marcadores neurales y neuronales en el cerebro anterior.** (I) Explante de cerebro anterior. (A) Vista lateral de un embrión de ratón de E10.5, la región de la que se tomará el explante se encuentra entre las dos líneas punteadas rojas. (B) Explante de cerebro anterior después de 7 días de cultivo, la superficie ventricular se encuentra hacia arriba, la región anterior se encuentra arriba, lateral a la zona ventral se encuentra la EGM (la imagen se tomó en campo claro). (II) Inmunofluorescencia de cortes coronales de cerebro anterior de embriones de ratón de E10.5, E15.5 y explante para observar la presencia de Nestina (A-C'),  $\beta$ -III-Tubulina (D-F'), NeuN (G-I'), GAD<sub>65/65</sub> (J-L') y Foxg1 (M-O'). La expresión de los distintos marcadores evaluados en el inicio (E10.5) y final del explante muestra que la neurogénesis está activa en el explante y que éste está siguiendo un desarrollo similar al que experimenta esta región *in vivo*. La línea blanca punteada muestra la superficie ventricular del explante. CA, Cerebro Anterior; CM, Cerebro Medio; EGM, Eminencia Gangliónica Media; d, dorsal; v, ventral.

## ii. Cerebro posterior

El explante de cerebro posterior se obtuvo disecando embriones de E10.5 desde un poco antes del istmo hasta el rombómero 7 (Fig. 12 IA). Al igual que en el caso del explante de cerebro anterior, se hicieron inmunodetecciones para las mismas proteínas neurales (Nestina) y neuronales ( $\beta$ -III-Tubulina y NeuN), y para la serotonina (5HT) (neurotransmisor de neuronas serotoninérgicas que se encuentran principalmente en esta región, ver introducción). En la etapa de E10.5 se observó que Nestina se localiza desde la zona ventricular donde se encuentran los progenitores proliferando hasta la región pial (Fig. 12 IIA-A').  $\beta$ -III-Tubulina se manifiesta en una franja de la zona pial, excluyéndose de la región ventricular donde se localizan los precursores neurales (Fig. 12 IID-D'). En esta etapa apenas están emergiendo las primeras neuronas serotoninérgicas [11, 12] por lo que no se detectó la presencia serotonina (Fig. 12 IJJ-J'), y tampoco la de NeuN (Fig. 12 IIG-G'), lo que nos dice que aun no hay neuronas maduras en esta región.

En el cerebro posterior de embriones E13.5 la distribución de Nestina se mantiene igual que en E10.5 (Fig. 12 IIB-B'), cabe mencionar que la glia radial también expresa Nestina [34] por lo que la expresión que vemos pudiera ser no sólo debida a los progenitores neurales que se encuentran en esta región. La presencia de  $\beta$ -III-Tubulina aumenta en esta etapa, y se puede observar desde la zona ventricular hasta la pial, con una tinción más fuerte en la región pial, lo que sugiere que en esta zona hay un mayor número de neuronas inmaduras (Fig. 12 IIE-E'). El marcador de neuronas maduras, NeuN, se observa en casi todo el ancho del tejido, excluyéndose de la zona proliferativa, la región ventricular, donde se encuentran los progenitores (Fig. 12 IIH-H'). Para este día ya se observaron neuronas serotoninérgicas en la región ventral del cerebro posterior (Fig. 12 IIK-K') conforme a lo reportado previamente [10, 11].

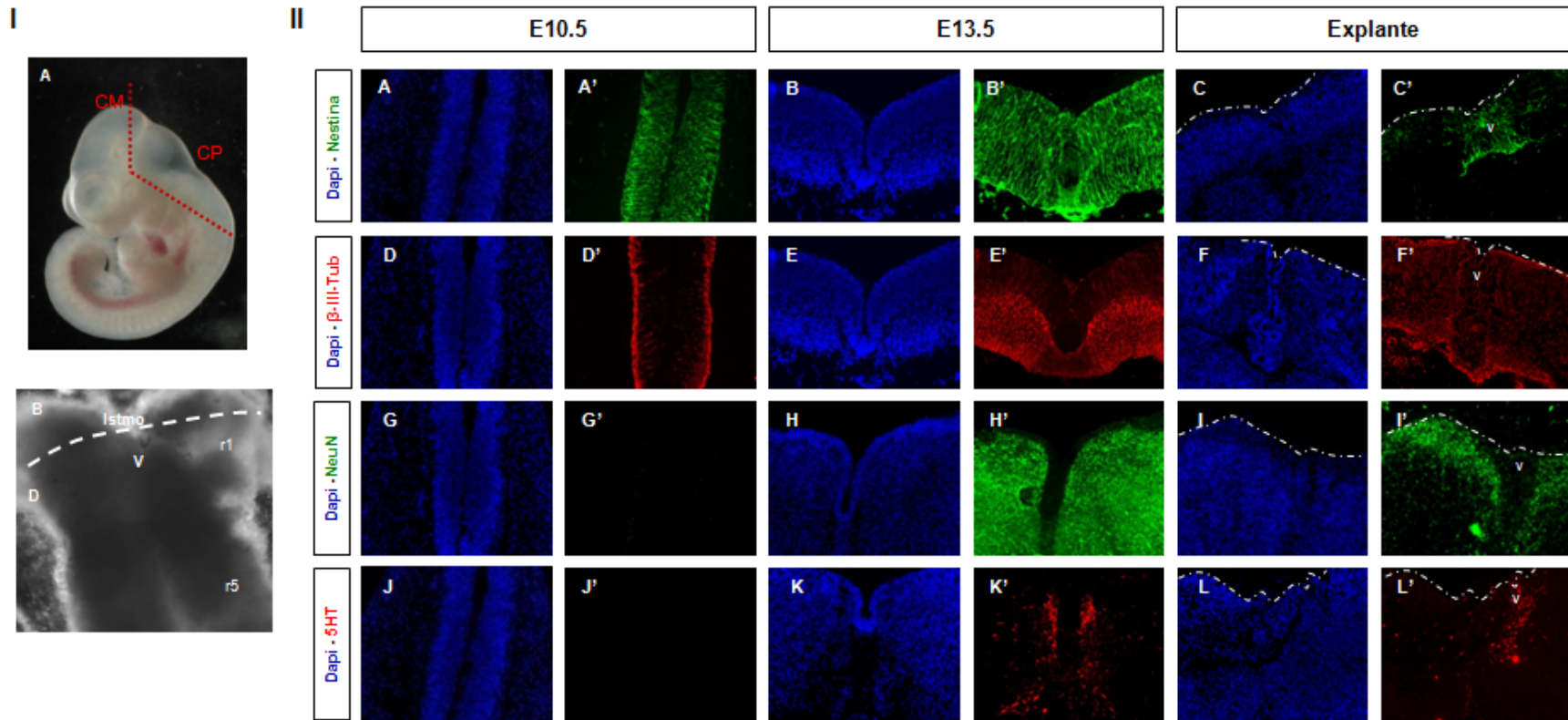
La localización de Nestina en el explante se distingue en la zona ventricular (Fig. 12 II C-C'), donde están los precursores proliferantes. Por otra parte, al término del cultivo del explante de cerebro posterior, la mayoría de las células sintetizan  $\beta$ -III-

Tubulina, las cuales se localizan desde la zona ventricular hasta la superficie pial (Fig. 12 IIF-F'); además, en el explante vemos que hay células NeuN<sup>+</sup>, que se encuentran principalmente en la zona ventricular (Fig. 12 II I-I'), lo que nos dice que el ambiente del explante es permisivo para la maduración de las neuronas. Para el caso de la serotonina, solo logramos detectarla en algunos explantes, en todos los casos en la región ventral, que es donde se encuentran las neuronas serotoninérgicas en el cerebro posterior, aunque solo unas pocas células lograron ser 5-HT<sup>+</sup> (Fig. 12 IIL-L'), lo cual pudiera ser debido a que las condiciones de cultivo para el explante de esta región del cerebro no son las óptimas para el desarrollo y/o sobrevivencia de este grupo neuronal.

#### **b. Cultivo explante-implante**

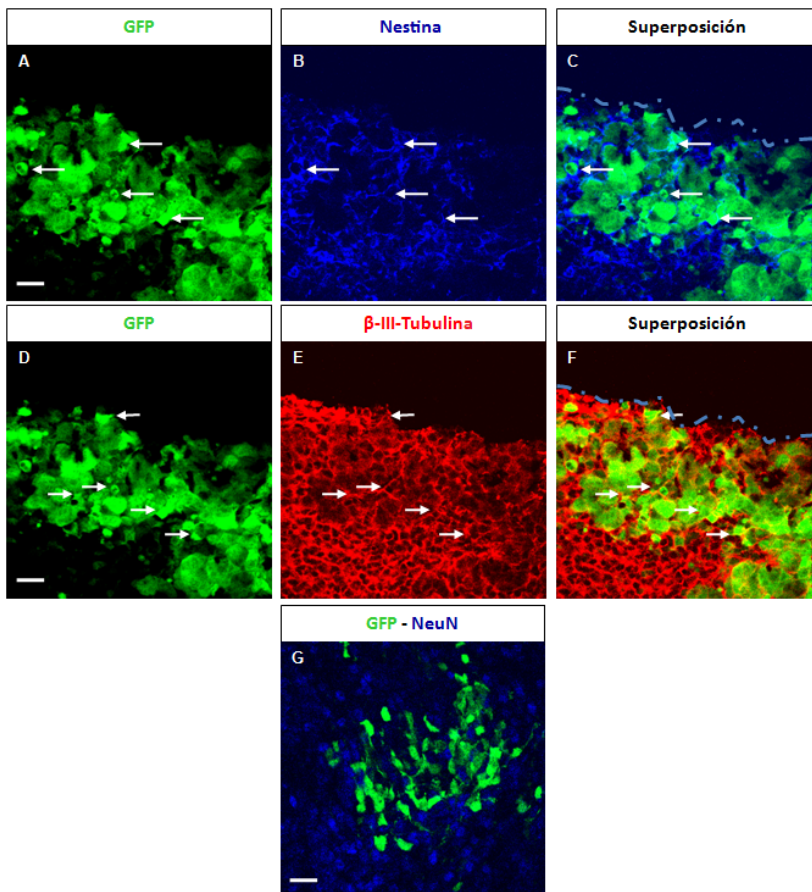
Después de probar que los explantes cultivados de cerebro anterior y posterior recapitulan la neurogénesis, o al menos parte de ella, se procedió a implantar a las células derivadas de los cuerpos embrioides en los explantes. En ambos casos, las células lograron implantarse completamente al tejido.

En los implantes realizados en el cerebro anterior, se observó que algunas de las células implantadas GFP<sup>+</sup> logran sintetizar Nestina ( $8.04 \pm 0.73\%$ , Tabla 1; Fig. 13A-C) en niveles comparados con los precursores endógenos. Al final del cultivo, vemos varias células integradas al tejido que producen  $\beta$ -III-Tubulina ( $16.49 \pm 4.02\%$ , Tabla 1; Fig. 13D-F), la cantidad de células en las que se detecta este marcador es baja comparada con lo observado en los implantes de células en el explante de mesencéfalo ( $66.32 \pm 5.08\%$ ) [29], pero creemos que esta diferenciación, aunque pequeña, es debida a las señales del explante ya que las células de los CE no expresan  $\beta$ -III-Tubulina antes de ser implantadas [35]. En ninguno de los casos se observaron células GFP<sup>+</sup>/NeuN<sup>+</sup> (Fig. 13G), lo que indica que las células implantadas que diferencian hacia el linaje neuronal no alcanzan a madurar en los 7 días que dura el cultivo.



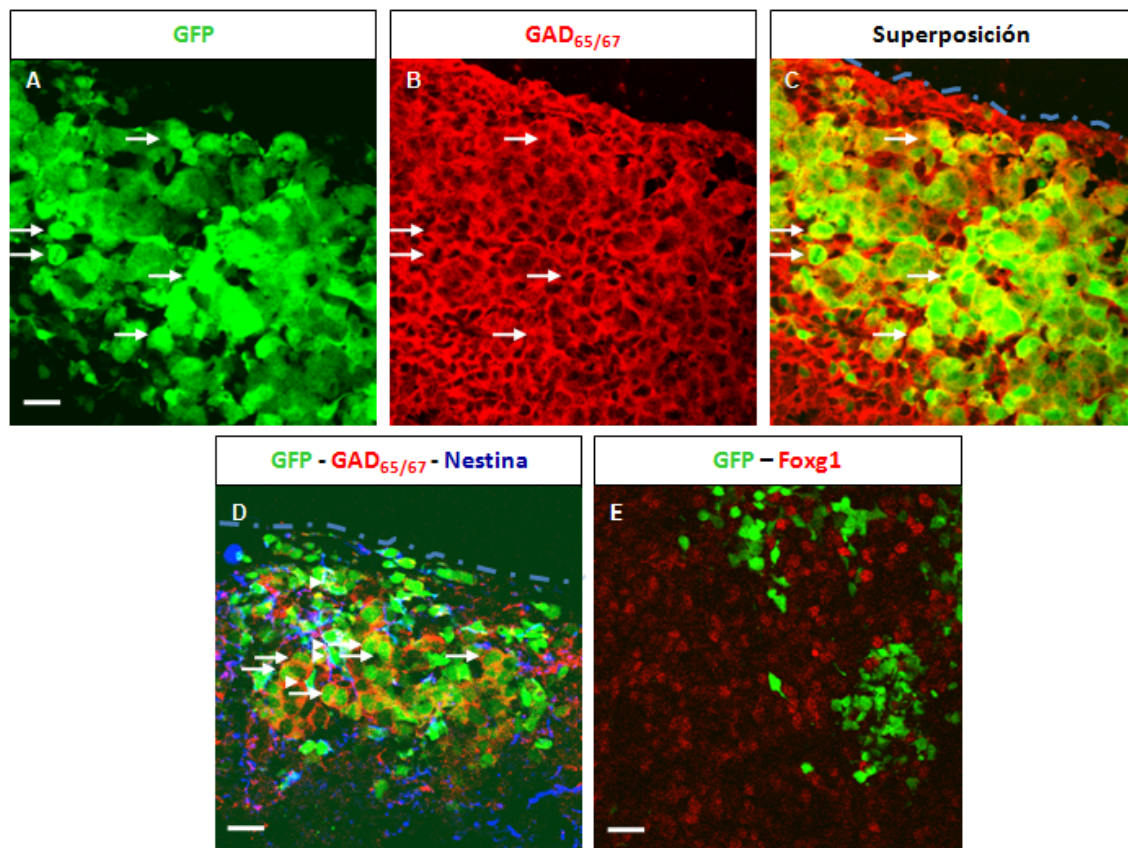
**Figura 12. Expresión de marcadores neurales y neuronales en el cerebro posterior.** (I) Explante de cerebro posterior. (A) Vista lateral de un embrión de ratón de E10.5, la región de la que se tomará el explante se encuentra entre las dos líneas punteadas rojas. (B) Explante de cerebro posterior después de 7 días de cultivo, la superficie ventricular se encuentra hacia arriba, la línea punteada señala el límite del cerebro medio y el posterior (el Istmo) (la imagen se tomó en campo claro). (II) Inmunofluorescencia de cortes coronales de cerebro posterior de embriones de ratón de E10.5, E13.5 y explante, para observar la presencia de Nestina (A-C'),  $\beta$ -III-Tubulina (D-F'), NeuN (G-I') y 5HT (J-L'). La expresión de los distintos marcadores evaluados en el inicio (E10.5) y final del explante, nos muestra que la neurogénesis está activa en el explante, aunque debido a la poca cantidad de células 5HT<sup>+</sup>, el explante no esté recapitulando del todo el desarrollo *in vivo*. La línea blanca punteada muestra la superficie ventricular del explante. CM, Cerebro Medio; CP, Cerebro Posterior; r1, rombómero 1; r5, rombómero 5; d, dorsal; v, ventral.

Para evaluar la diferenciación sitio-específica en el cerebro anterior se implantaron las células en la región ventral, donde se encuentran los progenitores GABAérgicos, y después se hicieron inmunodetecciones para observar la presencia de GAD<sub>65/67</sub>. Después de 7 días de cultivo el 19.02±5.39% (Tabla 1, Fig. 14A-C) de las células implantadas sintetizan GAD en la región GAD<sub>65/67</sub><sup>+</sup> del explante y en niveles comparados con las células endógenas. También se ve que la síntesis de GAD y de Nestina son excluyentes en las células implantadas (Fig. 14D), y que las células GFP<sup>+</sup>/GAD<sup>+</sup> fueron también β-III-Tubulina<sup>+</sup>, lo que concuerda con lo observado *in vivo*, que GAD se expresa hasta que las células dejan de ser progenitores y se convierten en neuronas inmaduras. Además, se observó que la diferenciación de las células de los CE hacia el fenotipo GABAérgico se da de manera sitio-específica, ya que las células implantadas solo expresan GAD en las regiones del explante que expresan la enzima y no en las zonas del explante negativas para GAD; además, las células implantadas no expresan marcadores de otros tipos neuronales, como TH, cuando son implantadas en el cerebro anterior ventral.



**Figura 13. Neuralización de las células derivadas de CE implantadas en el explante de cerebro anterior.** (A-C) Las células implantadas se han integrado al tejido, y algunas son Nestina<sup>+</sup> (flechas). (D-F) Algunas de las células implantadas son β-III Tubulina<sup>+</sup> (flechas). (G) Después de 7 días de cultivo, no se observaron células implantadas NeuN<sup>+</sup>. La línea punteada azul indica la superficie ventricular del tejido. Barra de escala, 20 μm.

Debido a que Foxg1 no se expresa en el dominio GABAérgico en el telencéfalo adulto ni en el de embrión, en el explante, no se pudo utilizar este marcador como prueba de diferenciación sitio-específica del cerebro anterior en las células GFP<sup>+</sup>/GAD<sup>+</sup>. Cabe mencionar que ninguna de las células implantadas en la región ventral del explante expresaron Foxg1. Desafortunadamente, en los pocos experimentos donde las células implantadas se integraron en la región Foxg1<sup>+</sup>, no se observó ninguna célula que expresara este factor de transcripción (Fig. 14E), tal vez porque las células implantadas requieran de más señales o tiempo para lograr expresar esta proteína.



**Figura 14. Diferenciación al fenotipo GABAérgico de las células derivadas de CE implantadas en el explante de cerebro anterior.** (A-C) Algunas células implantadas en la EGM son GAD<sub>65/67</sub><sup>+</sup> (flechas). (D) La presencia de Nestina (cabezas de flecha) y de GAD<sub>65/67</sub> (flechas) es excluyente en las células implantadas. (E) Después de 7 días de cultivo, no se observaron células GFP<sup>+</sup>/Foxg1<sup>+</sup> cuando fueron implantadas en la región dorsal del explante. La línea punteada azul indica la superficie ventricular del tejido. Barra de escala, 20 μm.

Cuando las células se implantaron en el cerebro posterior se observó que pocas de las células GFP<sup>+</sup> son Nestina<sup>+</sup> (10.33±2.16%, Tabla 1; Fig. 15A-C), en porcentaje muy similar al observado en los implantes de cerebro anterior. Así mismo, vemos varias células que sintetizan β-III-Tubulina (21.85±4.92% Tabla 1; Fig. 15D-F). No se observaron células GFP<sup>+</sup>/NeuN<sup>+</sup>, por lo que en este explante, las células implantadas tampoco logran madurar en los 7 días que dura el cultivo. Debido al poco número de explantes donde se logró observar la presencia de 5-HT y a las pocas células 5-HT<sup>+</sup> encontradas en éstos, no nos fue posible evaluar la diferenciación serotoninérgica de las células de los CE implantadas.

**Tabla 1.** Porcentaje de las células de los cuerpos embrioides que expresan marcadores neuronales después del trasplante en explantes de cerebro anterior y cerebro posterior

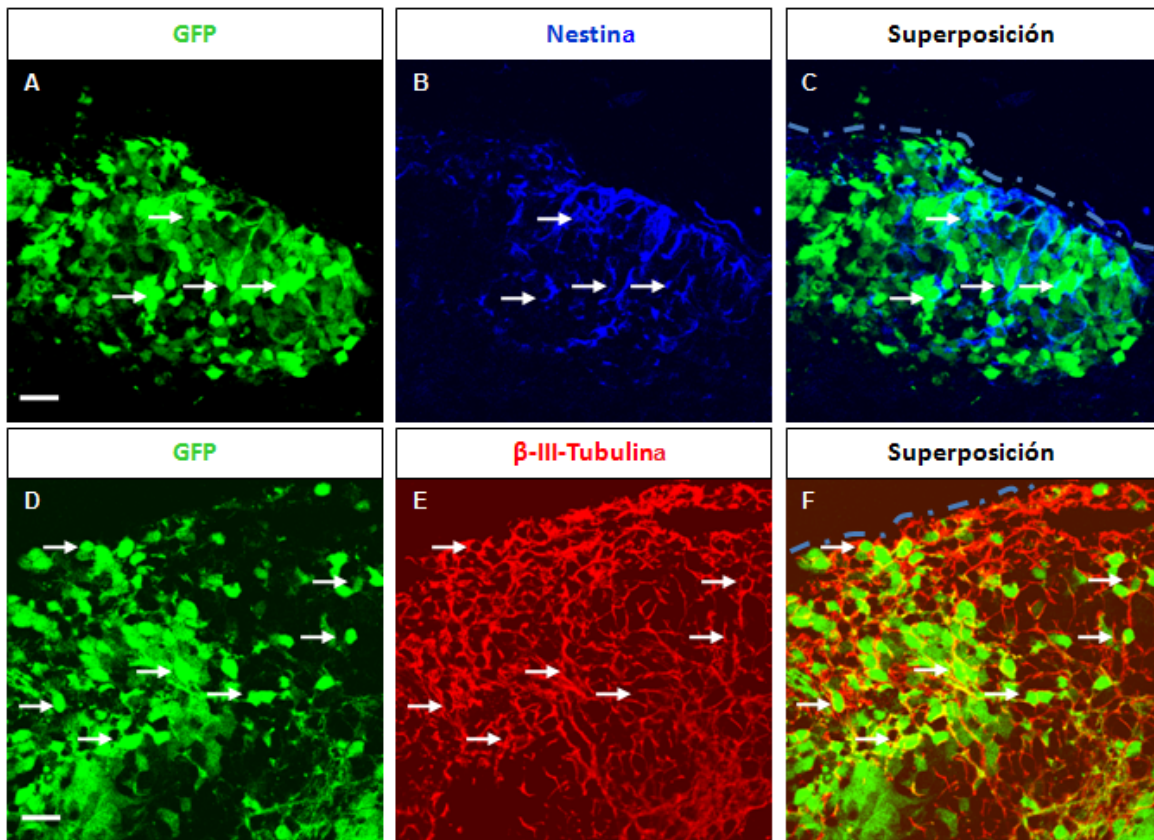
#### Cerebro anterior

<i>Nestina</i>	8.04±0.73%
<i>β-III-Tubulina</i>	16.49±4.02%
<i>NeuN</i>	0%
<i>GAD<sub>65/67</sub></i>	
En el sitio	19.02±5.39%
Fuera del sitio	0%
<i>Foxg1</i>	
En el sitio	0%
Fuera del sitio	0%

#### Cerebro posterior

<i>Nestina</i>	10.33±2.16%
<i>β-III-Tubulina</i>	21.85±4.92%
<i>NeuN</i>	0%
<i>5-HT</i>	ND

Los datos presentados son el porcentaje ± la desviación estándar de las células positivas para un marcador dado, observado en 3 experimentos independientes (n=3)  
 ND. No determinado.



**Figura 15. Neuralización de las células derivadas de CE implantadas en el explante de cerebro posterior.** (A-C) Las células implantadas se han integrado al tejido, y algunas son Nestina<sup>+</sup> (flechas). (D-F) Algunas de las células implantadas expresan β-III Tubulina (flechas). La línea punteada azul indica la superficie ventricular del tejido. Barra de escala, 20 μm.



## VII. DISCUSIÓN

La especificación de un subtipo neuronal en el sistema nervioso central en desarrollo está controlado por la interacción entre las señales inductivas secretadas por los centros señalizadores en el embrión y los factores de transcripción que transmiten la información. Un gran número de los diferentes factores de transcripción que se expresan en el cerebro en desarrollo, lo hacen en patrones temporales discretos y de manera sitio-específica o célula-específica. Estos factores de transcripción, al combinarse de forma compleja, controlan la generación de la diversidad neuronal. Aunque se conocen algunos de los factores involucrados en la especificación de ciertos tipos neuronales, aun se desconoce la combinación espacial y temporal requerida para que se dé una diferenciación en particular. Entender los mecanismos involucrados en el proceso de diferenciación de las CTN durante el tiempo es esencial para desarrollar terapias utilizando células troncales.

Usando el ambiente natural en el que un tipo celular emerge durante el desarrollo, se ha podido evaluar la competencia de los precursores derivados de las CTE para diferenciar, hacia neuronas dopaminérgicas [29], sin necesidad de conocer las complejas redes de moléculas señalizadoras y factores que inducen la diferenciación. Lo anterior ha permitido determinar el potencial de diferenciación intrínseco de las CTE. Utilizando esta misma estrategia, implantamos células de los cuerpos embrioides en explantes de cerebro anterior y posterior para evaluar su capacidad de diferenciación hacia otros fenotipos neuronales distintos del dopaminérgico, y así poder tener un panorama más completo sobre el potencial real de diferenciación de estas células.

Para poder valernos de los explantes como un entorno para la inducir la diferenciación de las células de los cuerpos embrioides era necesario que en éstos se llevara a cabo la neurogénesis de manera análoga a la que ocurre en el embrión en estas regiones del SNC. Comparando la localización de algunos marcadores neuronales al inicio y final del cultivo de los explantes, vimos que los progenitores neurales, que son abundantes al inicio del explante, van madurando

progresivamente hasta que al final del cultivo la mayoría de las células son  $\beta$ -III-Tubulina<sup>+</sup> y varias células llegan a ser neuronas maduras (NeuN<sup>+</sup>) (Fig. 11-12). Lo anterior nos indica que si se están generando neuronas en los explantes, tanto de cerebro anterior y posterior.

Además, en los explantes de cerebro anterior se observó el desarrollo de neuronas GABAérgicas (GAD<sub>65/67</sub><sup>+</sup>) en la región de la eminencia gangliónica media y lateral (Fig. 11 IIL-L'), lugar donde nacen estas neuronas en el telencéfalo embrionario [8]. También se detectó la presencia de células Foxg1<sup>+</sup> en la región dorsal del explante (Fig. 11 IIO-O'), que corresponde a la zona cortical del telencéfalo, lo cual indica que esta región también se está desarrollando de manera similar al embrión. Debido a que Foxg1 no se expresa en el dominio de las neuronas GABAérgicas telencefálicas en la etapa del desarrollo embrionario que es equivalente al final del cultivo del explante, E15.5, Foxg1 no nos sirvió como un marcador de la diferenciación sitio-específica de las células implantadas que lograron sintetizar GAD. Entonces, para poder evaluar la diferenciación telencefálica de las células implantadas habría que buscar un gen que se exprese en las neuronas GABAérgicas del telencéfalo como *Dlx1/2* [8] y, además, un marcador de fenotipo neuronal para la región Foxg1<sup>+</sup> como reelina, que es un marcador de neuronas de Cajal-Retzus que son reelina<sup>+</sup>/Foxg1<sup>+</sup> [33].

En los explantes de cerebro posterior, aunque en muy pocos se logró detectar serotonina y en esos casos muy pocas células eran positivas, la localización de 5-HT siempre fue en la región ventral (Fig. 12 IIL-L'), lugar donde se encuentran las neuronas serotoninérgicas en el embrión [11, 12, 36], lo que nos dice que al menos el dominio serotoninérgico se mantuvo en el sitio adecuado. Una posible explicación para la falta de neuronas serotoninérgicas en los explantes es que las condiciones del cultivo no permiten la proliferación, maduración y/o sobrevivencia de estas neuronas, lo cual podríamos evaluar haciendo un seguimiento del desarrollo del explante con inmunodetecciones contra 5-HT, midiendo la proliferación por la incorporación de algún análogo de timidina y midiendo la muerte celular. Dependiendo de las observaciones, talvez tengamos que iniciar el cultivo del explante en otra etapa del desarrollo donde las condiciones sean más permisivas.

A groso modo, los explantes de cerebro anterior y posterior parecen estar recapitulando la neurogénesis, aunque se requiere evaluar la expresión de más marcadores particulares de cada región para saber si en los explantes se está llevando a cabo la generación de fenotipos neuronales particulares de la misma forma, o muy similar, a como ocurre *in vivo*, con el propósito de poder utilizar esta estrategia para estudios más profundos sobre la diferenciación de un tipo de neuronas en específico.

En el trabajo realizado previamente en el laboratorio, se observó que alrededor del 65% de las células de los cuerpos embrioides implantadas en el explante de cerebro medio logran diferenciar a neuronas [29], lo que es un indicativo de su habilidad para interpretar el nicho después de su integración a los explantes. Sin embargo, en los implantes realizados en este trabajo, el número de células que logran expresar  $\beta$ -III-Tubulina es mucho menor (aproximadamente el 17%, Tabla 1), esta diferencia podría deberse a que en las regiones donde se tomó el explante hay menos señales inductivas (al comparar la presencia de  $\beta$ -III-Tubulina en el explante de mesencéfalo con los de cerebro anterior o posterior, se ve mayor cantidad en el de mesencéfalo), o éstas se mantienen en el explante en tiempos más cortos, los cuales no sean suficientes para que la mayoría de las células logre diferenciar. Aunado a esto, se sabe que en los CE, a los 4 días de su formación, existen progenitores comprometidos a los linajes mesodérmico y endodérmico [37], por lo que algunas de las células de los CE que no lograron neuralizarse en el explante podrían ser progenitores de estos linajes. Aun así, la generación de neuronas inmaduras a partir de los cuerpos embrioides es significativamente mayor que la de precursores neurales, lo que refuerza la idea de que las células de los CE están respondiendo al entorno, ya que en el explante hay mucho más células  $\beta$ -III-Tubulina<sup>+</sup> que Nestina<sup>+</sup>. De cualquier forma, habría que hacer un estudio más detallado de marcadores de proliferación y panneuronales, además de hacer cultivos de explantes tomados de distintas etapas del desarrollo para obtener una respuesta concreta a la interrogante.

En cuanto a la diferenciación sitio-específica, en el trabajo de Baizabal y Covarrubias se vio que las células de los CE responden a las señales locales del

sitio donde se integran, ya que adquieren específicamente la identidad de las células que las rodean. Asimismo, su diferenciación parece estar mediada por un mecanismo instructivo ya que estas células no expresan los genes que dan identidad a los dominios del cerebro medio antes de ser implantadas. Por los datos anteriores, esperábamos encontrar que la diferenciación hacia el fenotipo GABAérgico fuera eficiente, en proporción similar a la diferenciación dopaminérgica en el mesencéfalo (alrededor del 40% de las células implantadas en el cerebro medio expresó TH), sin embargo, el número de células que lograron expresar GAD fue solo el 20% (Tabla 1) por lo que podría pensarse que la diferenciación GABAérgica en este sistema no está mediada por el ambiente sino que es una propiedad intrínseca de las células de los CE. En un estudio de diferenciación de las CTE *in vitro* se mostró que éstas pueden generar células GAD<sup>+</sup>, con un rango del 10-20% del total de neuronas, además de otros tipos neuronales, como colinérgicas [20]. En otro trabajo se observó que las células de los CE pueden diferenciar aleatoriamente a varios subtipos neuronales, incluyendo el GABAérgico, después de transplantarlas en el estriado de ratas adultas [27]. Estos antecedentes nos harían suponer que, en efecto, la diferenciación GABAérgica no depende de factores extrínsecos, sin embargo, en nuestro modelo, las células GAD<sup>+</sup> solo se observaron en la región del explante donde está presente esta enzima y no en regiones adyacentes donde no se detectó GAD; además, en las células implantadas no se detectó la presencia de marcadores de otros tipos neuronales, como TH. En el estudio *in vitro*, referido anteriormente, las CTE fueron neuralizadas previamente con AR, por lo que están más adelantadas en la diferenciación neuronal que las células del CE que nosotros implantamos. En el estudio de implante en el estriado de ratas adultas, la diferenciación es claramente inespecífica ya que generan neuronas de muchos tipos (dopaminérgicas, serotoninérgicas, GABAérgicas y colinérgicas), lo cual no ocurre en nuestro caso. Todo esto, sumado a que previamente en el laboratorio se observó que las células del CE no expresan ningún marcador neuronal antes de implantarse [35], indica que el explante de cerebro anterior es el que está dirigiendo la diferenciación de las células del CE hacia neuronas GABAérgicas.

El que las células implantadas no logren expresar Foxg1 fue una sorpresa, ya que esta es un marcador de progenitores neurales [33], que sería uno de los primeros que pudieran expresar las células implantadas. Una posible explicación es que las células implantadas expresaron Foxg1 en los primeros días de cultivo, pero que al final no se detecta porque las células se encuentran en un estado más avanzado de diferenciación y dejaron de expresarlo; una forma de comprobarlo sería haciendo la doble inmunodetección, para Foxg1 y  $\beta$ -III-Tubulina. Otra posibilidad es que en la etapa en que iniciamos el explante ya no existan todas las señales necesarias para inducir la expresión de Foxg1 en las células implantadas, ya que su expresión empieza desde muy temprano en el desarrollo [38]. Cualquiera que sea la explicación, se necesitan realizar más experimentos para saber si las células implantadas en el dominio Foxg1<sup>+</sup> expresan la proteína en los primeros días del cultivo o si logran neuralizarse al final de éste, además de evaluar la expresión de otros marcadores de subtipos neuronales que se generen en esa región.

Debido a los problemas antes mencionados con la detección de las neuronas serotoninérgicas en el cerebro posterior, no se logró valorar la diferenciación sitio-específica en estos explantes. Además, por la falta de marcadores específicos de neuronas serotoninérgicas de cerebro posterior, tampoco se evaluó si las células implantadas se regionalizaban. Así entonces, la caracterización de la diferenciación de las células de los CE en el cerebro posterior quedará pendiente para estudios futuros.

Los resultados obtenidos en este trabajo, nos dan evidencias para proponer que las células de los cuerpos embrioides tienen un amplio potencial de diferenciación y que logran integrar las señales inductivas del medio donde se encuentren para diferenciarse de manera específica. Y que los explantes de sistema nervioso central son una herramienta útil para determinar el potencial de diferenciación neuronal de distintas poblaciones de células troncales.

## VIII. CONCLUSIONES

- Los explantes de cerebro anterior y posterior parecen estar recapitulando la neurogénesis embrionaria, observada con la expresión de proteínas como Nestina (precursores neurales),  $\beta$ -III-Tubulina (neuronas inmaduras) y NeuN (neuronas maduras).
- En los explantes de cerebro anterior se generan neuronas GABAérgicas,  $GAD_{65/67}^+$ , solo en la región de la eminencia gangliónica media y lateral como ocurre en el desarrollo *in vivo*. También se expresa Foxg1 en las regiones dorsales, donde, en la etapa equivalente al final del cultivo del explante, es donde se expresa este factor de transcripción.
- En los explantes de cerebro posterior se logran generar neuronas serotoninérgicas,  $5-HT^+$ , en la región ventral, donde emerge este grupo neuronal *in vivo*; sin embargo, la expresión de 5-HT no se vio en el 100% de los explantes.
- Las células de los cuerpos embrioides implantadas en los explantes de cerebro anterior y posterior lograron expresar marcadores neurales (Nestina) y neuronales ( $\beta$ -III-Tubulina) lo que indica que las células logran responder al entorno y neuralizarse en el explante, aunque no con mucha eficiencia.
- Las células implantadas en la eminencia gangliónica media y lateral expresan  $GAD_{65/67}$ , lo que sugiere que hay una diferenciación GABAérgica sitio-específica, ya que si se implantan en otras regiones no logran sintetizar la enzima.
- El uso de explantes de cerebro anterior y posterior es una herramienta útil para estudiar la diferenciación de las células de los cuerpos embrioides hacia los subtipos neuronales que en ellos se generan.

## IX. PERSPECTIVAS

- Analizar la expresión en el explante de otros marcadores sitio-específicos para la región cortical del telencéfalo positiva para Foxg1, como reelina o los transportadores de glutamato; y marcadores posicionales del dominio GABAérgico, como Dlx1; para observar si la generación de estas neuronas es similar a su desarrollo *in vivo*.
- Evaluar la expresión de otros marcadores de neuronas serotoninérgicas como Pet1, o de precursores serotoninérgicos como Lmx1b o Foxa2, para corroborar la presencia de estas neuronas en el explante.
- Estudiar la expresión de marcadores de otros tipos neuronales en el cerebro posterior, como Islet 1 para las motoneuronas en la región ventral o la Dopamina- $\beta$ -hidroxilasa para las neuronas noradrenérgicas en la región dorsal, para ver si éstos se están desarrollando de forma normal y descartar que el explante de esta región no pueda desarrollarse correctamente *in vitro*.
- Evaluar la expresión de un marcador posicional en la células implantadas en el dominio GABAérgico, para tener un perfil de expresión completo de estas células y poder definir si son células GABAérgicas telencefálicas. De igual forma, evaluar la expresión de un marcador de fenotipo neuronal en el dominio Foxg1<sup>+</sup>.
- Determinar si las células implantadas en la región Foxg1<sup>+</sup> expresan este factor de transcripción en algún momento en los 7 días de cultivo, para ver si su expresión tiene un patrón temporal como ocurre *in vivo*.
- Analizar si las células de los CE implantadas en explantes de cerebro posterior logran diferenciar sitio-específicamente a neuronas serotoninérgicas, motoneuronas o noradrenérgicas, dependiendo de cuál grupo neuronal se desarrolle mejor en el explante.

## X. BIBLIOGRAFIA

1. Gilbert, S.F., ed. *Developmental Biology*. 6 ed. 2003, Sinauer Associates, INC: Massachusetts, USA.
2. Peterson, D., *Stem cells in brain plasticity and repair*. Neuroscience, 2002. **2**: p. 34-42.
3. Liu, A., and Niswander, L., *Bone morphogenetic protein signaling and vertebrate nervous system development*. Nature Reviews Neuroscience, 2005. **6**: p. 945-954.
4. Roelink, H., Porter, J.A., Chiang, C., Tanabe, Y., Chang, D.T., Beachy, P.Q., and Jessell, T.M., *Floor plate and motor neuron induction by different concentrations of amino-terminal cleavage product of sonic hedgehog autoproteolysis*. Cell, 1995. **81**(3): p. 445-455.
5. Liem, K.F., Tremml, G., Roelink, H., and Jessell, T.M., *Dorsal differentiation of neural plate cells induced by BMP-mediated signals from epidermal ectoderm*. Cell, 1995. **82**(6): p. 969-979.
6. Wurst, W., and Bally-Cuif, L., *Neural plate patterning: upstream and downstream of the isthmic organizer*. Nature Reviews Neuroscience, 2001. **2**: p. 99-108.
7. Lee, J.E., *Basic loop-helix-loop genes in neural development*. Current Opinion in Neurobiology, 1997. **7**: p. 13-20.
8. Fode, C., Ma, Q., Casarosa, S., Ang, S.-L., Anderson, D. J., and Guillemot, F., *A role for neural determination genes in specifying the dorsoventral identity of telencephalic neurons*. Genes and Development, 2000. **14**: p. 67-80.
9. Schuurmans, C., Armant, O., Nieto, M., Stenman, J. M., Britz, O., Klenin, N., Brown, C., Langevin, L., Seibt, J., Tang, H., Cunningham, J. M., Dyck, R., Walsh, C., Campbell, K., Polleux, F., and Guillemot, F., *Sequential phases of cortical specification involve Neurogenin-dependent and -independent pathways*. The EMBO Journal, 2004. **23**: p. 2892-2902.
10. Pattyn, A., Simplicio, N., van Doorninck, J. H., Goridis, C., Guillemot, F., and Brunet, J. F., *Ascl1/Mash1 is required for the development of central serotonergic neurons*. Nature Neuroscience, 2004. **7**: p. 589-595.
11. Jacob, J., Ferri, A., Milton, C., Prin, F., Pla, P., Lin, W., Gavalas, A., Ang, S.-L., and Briscoe, J. , *Transcriptional repression coordinates the temporal switch from motor to serotonergic neurogenesis*. Nature Neuroscience, 2007. **10**: p. 1433-1439.
12. Pattyn, A., Vallstedt, A., Dias, J. M., Samad, O. A., Krumlauf, R., Rijli, F., Brunet, J., and Ericson J., *Coordinated temporal and spatial control of motor neuron and serotonergic neuron generation from a common pool of CNS progenitors*. Genes and Development, 2003. **17**: p. 729-737.
13. Baizabal, J.M., Furlan-Magaril, M., Santa-Olalla, J., and Covarrubias, L. , *Neural stem cells in development and regenerative medicine*. Archives of Medical Research, 2003. **34**: p. 572-588.
14. Donovan, P.J., and Gearhart, J., *The end of the beginning for pluripotent stem cells*. Nature, 2000. **414**: p. 92-97.
15. Smith, A., *Embryo-derived stem cells: of mice and men*. Annu. Rev. Cell. Dev. Biol., 2001. **17**: p. 435-462.
16. Williams, R.L., Hilton, D. J., Pease, S., Willson, T. A., and Stewart, C.L., *Myeloid leukemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells*. Nature, 1988. **336**: p. 684-687.
17. Yoshida, K., and Chambers, T., *Maintenance of the pluripotential phenotype of embryonic stem cells through direct activation of gp130 signalling pathways*. Mechanism of Development, 1994. **45**: p. 163-171.



18. Donovan, P.J., and Gearhart, J., *The end of the beginning for pluripotent stem cells*. Nature, 2000. **414**: p. 92–97.
19. Deacon, T., Dinsmore, J., Costantini, L. C., Ratliff, J., and Isacson, O., *Blastulastage stem cells can differentiate into dopaminergic and serotonergic neurons after transplantation*. Experimental Neurology, 1998. **149**: p. 28-41.
20. Fraichard, A., Chassande, O., Bilbaut, G., Dehay, C., Savatier, P., and Samarut, J., *In vitro differentiation of embryonic stem cells into glial cells and functional neurons*. Journal of Cell Science, 1995. **108**: p. 3181-3188.
21. Bain, G., Kitchens, D., Yao, M., Huettner, J. E., and Gottlieb D.I., *Embryonic stem cells express neuronal properties in vitro*. Developmental Biology, 1995. **168**: p. 342-357.
22. Okada, Y., Shimazaki, T., Sobue, G. and Okano, H, *Retinoic-acid-concentration dependent acquisition of neural cell identity*. Developmental Biology, 2004. **275**: p. 124-142.
23. Wichterle, H., Lieberam, I., Porter, J. A., and Jessell, T. M., *Directed differentiation of embryonic stem cells into motor neurons*. Cell, 2002. **10**: p. 385-397.
24. Lee, S.-H., Lumelsky, N., Studer, L., Auerbach, J. M. and McKay, R. D., *Efficient generation of midbrain and hindbrain neurons from mouse embryonic stem cells*. Nature Biotechnology, 2000. **18**: p. 675-679.
25. Watanabe, K., Kamiya, D., Nishiyama, A., Katayama, T., Nozaki, S., Kawasaki, H., Watanabe, Y., Mizuseki, K., and Sasai, Y., *Directed differentiation of telencephalic precursors from embryonic stem cells*. Nature Neuroscience, 2005. **8**: p. 288-296.
26. Ye, W., Shimamura, K., Rubenstein, J. L., Hynes, M. A., and Rosenthal, A. , *FGF and Shh signals control dopaminergic and serotonergic cell fate in the anterior neural plate*. Cell, 1998. **93**: p. 755-766.
27. Björklund, L.M., Sánchez-Pernaute, R., Chung, S., Andersson, T., Chen, I. Y., McNaught, K. S., Brownell, A. L., Jenkins, B. G., Wanichstedt, C., Kim, K. S., and Isacson, O. , *Embryonic stem cells develop into functional dopaminergic neurons after transplantation in a Parkinson rat model*. PNAS, 2002. **99**: p. 2344-2349.
28. McDonald, J., Liu, X., Qu, Y., Liu, S., Mickey, S., Turetsky, D., Gottlieb, D., and Choi, D., *Transplanted embryonic stem cells survive, differentiate and promote recovery in injured rat spinal cord*. Nature Medicine, 1999. **5**: p. 1410-1412.
29. Baizabal, J.-M., and Covarrubias, L., *The embryonic midbrain directs neuronal specification of embryonic stem cells at early stages of differentiation*. Developmental Biology, 2009. **325**(1): p. 49-59.
30. Niwa, H., Miyazaki, J, and Smith, A. G., *Quantitative expression of Oct3/4 defines differentiation, dedifferentiation of self-renewal of ES cells*. Nature Genetics, 2000. **24**: p. 372-376.
31. Mignone, J., Kukekov, V., and Chiang, A. , *Neural stem cells and progenitor cells in Nestin-GFP transgenic mice*. The Journal of Comparative Neurology, 2004. **469**: p. 311-324.
32. Shen, Q., Wang, Y., Dimos, J. T., Fasano, C. A., Phoenix, T. N., Lemischka, I. R., Ivanova, N., Stifani, S., Morrissey, E., and Temple, S. , *The timing of cortical neurogenesis is encoded within lineages of individual progenitor cells*. Nature Neuroscience, 2006. **9**: p. 743-751.
33. Regad, T., Roth, M., Bredenkamp, N., Illing, N., and Papalopulu, N., *The neural progenitor-specifying activity of FoxG1 is antagonistically regulated by CKI and FGF*. Nature Cell Biology, 2007. **9**(5): p. 531-540.
34. Tang, M., Miyamoto, Y., and Huang, E. J., *Multiple roles of  $\beta$ -catenin in controlling the neurogenic niche for midbrain dopamine neurons*. Development, 2009. **136**: p. 2027-2038.

35. Baizabal, J.M., *Comunicación personal*. 2007.
36. Pattyn, A., Hirsch, M., Goridis, C., and Brunet, J. , *Control of hindbrain motoneuron differentiation by the homeobox gene Phox2b*. *Development*, 2000. **127**: p. 1349-1358.
37. Rathjen, J., and Rathjen, P.D., *Mouse ES cells: experimental exploitation of pluripotent differentiation potential*. *Curr. Opin. Genet. Dev*, 2001. **11**: p. 587-594.
38. Hébert, J.M., and McConnell, S. K., *Targeting of cre to the Foxg1 (BF-1) locus mediates loxP recombination in the telencephalon and other developing head structures*. *Developmental Biology*, 2000. **222**: p. 296-306.