



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

**DETERMINACIÓN DEL POTENCIAL DE DIFERENCIACIÓN DE  
CÉLULAS DERIVADAS DE CUERPOS EMBRIOIDES EN CEREBRO EN  
ETAPA POSTNATAL**

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

**PRESENTA:**  
**BIÓL. MARIA GUADALUPE MAYA ESPINOSA**

**DIRECTOR DE TESIS:**  
**DR. RENÉ DRUCKER COLÍN**  
**INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR UNAM**

**COMITÉ TUTOR:**  
**DR. LUIS COVARRUBIAS ROBLES**  
**INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA UNAM**  
**DRA. MAGDALENA GUERRA CRESPO**  
**INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR UNAM**

**CIUDAD DE MÉXICO, 2019**  
**FEBRERO**



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.

	<b>ÍNDICE</b>
DEDICATORIA .....	3
AGRADECIMIENTOS.....	4
RESUMEN.....	5
ABSTRACT .....	6
ABREVIATURAS.....	7
ANTECEDENTES.....	9
El nicho celular postnatal y las células troncales.....	9
Nichos neurogénicos, neurogénesis adulta.....	10
Zona subventricular-Vía rostral migratoria-Bulbo olfatorio.....	13
Regulación de la neurogénesis.....	20
Factores intrínsecos.....	20
Factores extrínsecos.....	22
Neurogénesis ante daño cerebral.....	28
Células troncales embrionarias.....	29
Características y relevancia.....	29
Formación de cuerpos embriode.....	32
Diferenciación al fenotipo neural.....	37
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	39
HIPÓTESIS.....	40
OBJETIVOS.....	40
MATERIALES Y MÉTODOS.....	41
RESULTADOS.....	50
Caracterización de los cuerpos embrioides.....	50
Diferenciación al linaje neural en la región VRM-Ctz.....	53
Primera etapa, seis días post-trasplante.....	53
Segunda etapa, quince días post-trasplante.....	56
Tercera etapa, veintiún días post-trasplante.....	59
Identificación del del fenotipo neuronal del trasplante en la región VRM-Ctz... 61	61
Evaluación del linaje interneuronal en región VRM-Ctz.....	63
Diferenciación del trasplante en el estriado.....	65
Respuesta inflamatoria en los trasplantes.....	67
Proliferación celular en los trasplantes.....	68
Muerte celular en los trasplantes.....	70
Trasplante en estriado adulto.....	71
DISCUSIÓN.....	73
CONCLUSIONES.....	78
PERSPECTIVAS.....	79
REFERENCIAS.....	80
ANEXOS.....	91

## **DEDICATORIA**

### **A MIS PADRES, GUADALUPE Y JAVIER**

Por criarme en un hogar sencillo y nutritivo en todos los aspectos, porque su trato hacia mí siempre ha sido con absoluta devoción y me han apoyado con entusiasmo; por su generosidad y por respetar mis decisiones, aunque impliquen sacrificios de diversa índole; por su inagotable paciencia ante mi hermetismo. En la distancia nos hemos unido más, ustedes siempre son mi refugio y mi orgullo, es un honor ser su hija.

Mamá, de ti he aprendido todo lo indispensable para sobrevivir y ser independiente, eres capaz de enriquecer y embellecer lo que te rodea, optimizas e improvisas; admiro tu astucia y fortaleza para superar dificultades y por dedicarte por completo a lo que amas.

Papá, me sorprenden tu humildad, voluntad y gusto por trabajar, las distancias que recorres a diario y tu vocación para ayudar a todos; siempre me inspiraste a buscar e ir más lejos, desde temprano pusiste a mi alcance el mundo a través de tus libros, vivencias y sapiencia. A ustedes les dedico este trabajo, por ser magníficos, por su inmenso amor y sus enseñanzas, por su jardín y su fogón. ¡Infinitas gracias!

## AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México y al Instituto de Fisiología Celular por sus espacios generosos y enriquecedores para todo aquel que decida cursar una etapa de formación académica.

Al Dr. René Drucker Colín<sup>†</sup>, por haberme dado la oportunidad de desarrollar mi trabajo en su laboratorio, por haber sido proveedor y orientador durante mi incursión en la investigación científica.

A mi comité tutorial, el Dr. Luis Covarrubias y la Dra. Magdalena Guerra, por su trabajo puntual y crítico para consolidar el proyecto y por sus valiosas enseñanzas.

A mis sinodales, el Dr. Arturo Hernández, Dr. Héctor Mayani, Dr. Iván Velasco y Dra. Leticia Verdugo por su atención y comentarios durante la revisión de esta tesis.

A la Dra. Claudia Rivera de la Unidad de Bioterio por su ayuda al proveer animales para realizar experimentos. A Francisco Pérez Eugenio y Ana María Escalante de la Unidad de Cómputo por su apoyo técnico.

A Tere Torres y Mary Valverde por su alegría y profesionalismo, siempre pendientes y coordinando todo, desde el primer mail para contactar al Dr. y hasta la fecha. A Don Lino, Sarita y Juan por su amabilidad y por mantener todo en condiciones ideales.

A las técnicas-heroínas del laboratorio, por su inagotable disposición para ayudar, organizar y enseñar siempre de la mejor manera, a Marcela Palomero por haber estado al pendiente de mí, apoyándome incluso con asuntos ajenos al trabajo. A Diana Millán, por todos sus consejos, confianza, lealtad, estima y porque siempre has estado ahí para mí.

A los alumnos del AL-201, me impresiono al pensar que atestigüé la etapa final del laboratorio y vi llegar e irse a t-o-d-o-s los estudiantes del Dr. Drucker durante la última década, por eso atesoro haber coincidido con todas esas personas valiosas con las cuales compartí incontables momentos alegres y difíciles pero todos memorables, por acompañarnos en el trabajo y en la cotidianeidad, por hacer del lab un segundo hogar al cual daba gusto llegar, porque sé que siempre estaremos hermanados y habrá motivos y momentos para encontrarnos y seguir compartiendo. ¡Hasta siempre!

A mis amigos, la gran mayoría está lejos pero siempre se muestran presentes y pendientes de mí, por las risas y los llantos, porque a pesar de las metamorfosis la amistad sigue intacta. Especialmente agradezco a Loli, por todas las experiencias que hemos compartido, por la paciencia, por disculparme, por estar al pie del cañón conmigo y por ser la que más ánimos me daba para que yo concluyera esta etapa.

A mi hermano Javo y a mi cuñada Moni, por todos los momentos gratos compartidos y por haberme dado la oportunidad de ser tía de los hermosos Paquito y Sofi.

Este trabajo se desarrolló gracias a los recursos otorgados por CONACyT beca 228016 y fondo 131031, IMPULSA 02, UNAM-DGAPA-PAPIIT IB202112-RR282112 e IN204612 e ICyTDF/170/2012.

## RESUMEN

El cerebro de mamífero en etapa postnatal y adulta conserva nichos neurogénicos, microambientes que mantienen poblaciones de células troncales neurales (CTNs) y regulan su proliferación y diferenciación generando así distintos subtipos de neuronas que se integran a estructuras específicas. Se ha intentado dirigir a las CTNs para regenerar circuitos dañados, sin embargo, han resultado insuficientes en cantidad y potencial de diferenciación, por lo cual se ha recurrido diversos tipos celulares para ensayar trasplantes en diversos modelos de terapias de reemplazo celular. Se han utilizado ampliamente las células troncales embrionarias (CTEs) que pueden ser diferenciadas al linaje neural *in vitro* adicionando factores específicos que recapitulan la diferenciación *in vivo*; en algunos casos se involucra la formación de cuerpos embrioides (CEs) que son agregados celulares donde se produce la diferenciación de manera espontánea. Las células derivadas de CEs de la línea de CTEs R1B5 de ratón mostraron un gran potencial de diferenciación neuronal sitio-específica, al ser injertadas en explantes de cerebro embrionario de ratón. En el presente trabajo, se realizaron trasplantes de células derivadas de CEs en el cerebro postnatal de rata, con la finalidad de determinar si las señales presentes en el microambiente eran suficientes para promover la diferenciación al linaje neural. Se observó una eficiente diferenciación neuronal en la región adyacente a un nicho neurogénico, la vía rostral migratoria, mientras que en el estriado se observó diferenciación en la cual el linaje glial resultó ser predominante. Los resultados muestran que el patrón de diferenciación de las células de CEs fue dependiente de la región de trasplante, de modo que, las células no comprometidas al linaje neural son capaces de detectar regiones que soportan la diferenciación neuronal en el cerebro postnatal, lo cual representa un paso importante para el desarrollo de terapias de reemplazo basadas en CTEs.

## ABSTRACT

The postnatal and adult mammalian brain preserves neurogenic niches, microenvironments that maintain the neural stem cells (NSCs) and regulate their proliferation and differentiation, thus generating diverse subtypes of neurons that are integrated into specific structures. Attempts have been made to promote and direct NSCs to regenerate damaged circuits; however, they have not been suitable in terms of quantity and differentiation potentials. Several cell sources have been tested in transplantation assays in models of cell-based replacement therapies. Embryonic stem cells (ESCs) have been differentiated towards neuronal lineage *in vitro* by adding specific cues that recapitulate differentiation *in vivo*; Embryoid bodies (EBs) are ESCs aggregates used as a method for promoting spontaneous differentiation. The EBs-derived cells from the mouse ESCs R1B5 cell line display a high potential for site-specific neuronal differentiation when grafted into mouse embryonic brain explants. In this study, EBs-derived cells were transplanted in the postnatal brain to know if the microenvironment cues were adequate to promote differentiation to neural lineage. Neuronal differentiation occurred within an adjacent region to the rostral migratory stream, while in the striatum the differentiation pattern was distinct, the glial lineage was found to be predominant. The results indicated that the differentiation pattern of EBs-derived cells was dependent on the host region, so uncommitted cells can detect regions that support neuronal differentiation within the postnatal brain, which represents an important step for the development of stem cell-based replacement therapies.

## ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
BDNF	Factor neurotrófico derivado del cerebro
BMP	Proteína morfogénica ósea
Calb	Calbindina
Calr	Calretinina
CEs	Cuerpos embrioides
CG	Capa granular
CPG	Capa periglomerular
CTs	Células troncales
CTEs	Células troncales embrionarias
CTNs	Células troncales neurales
Ctz	Corteza
DCX	Doblecortina
DMEM	Dulbeco's modified Eagle médium
Dpt	Días post-trasplante
DRAQ5	1,5-bis[[2-(di-methylamino) ethyl]amino]-4, 8 dihydroxyanthracene-9,10-dione.
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
FGF2	Factor de crecimiento fibroblástico básico
FGF5	Factor de crecimiento fibroblástico 5
GFP	Proteína verde fluorescente
5HT	5-Hidroxitriptamina
GABA	Ácido gama-aminobutírico
GAD67	Ácido glutámico descarboxilasa 67
GFAP	Proteína acídica glial fibrilar
LIF	Factor inhibidor de leucemia



MCI	Masa celular interna
MEC	Matriz extracelular
NeuN	Neuronal nuclei
OAMC	Oclusión de la arteria media cerebral
Oct4	Octamer-binding transcription factor 4
Olig2	Factor de diferenciación de oligodendrocitos tipo 2
p75NTR	Receptor de neurotrofina p75
PanDlx	Pan-Distal less
Pax6	Paired box protein 6
PHH3	Histona H3 fosforilada
RFGF	Receptor del factor de crecimiento fibroblástico
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa
Shh	Sonic hedgehog
Sox1	Sex determining region Y box1
Sox2	Sex determining region Y box 2
SNpc	Substancia nigra <i>pars compacta</i>
TGF $\alpha$	Factor de crecimiento transformante alfa
TH	Tirosina hidroxilasa
TrkB	Receptor cinasa de tropomiosina
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
VL	Ventrículo lateral
VRM	Vía rostral migratoria
Wnt	Wingless int
ZSG	Zona subgranular
ZSV	Zona subventricular

## **ANTECEDENTES**

### **El nicho celular postnatal y las células troncales.**

En organismos adultos, la diversificación celular se completa antes del nacimiento o inmediatamente después del mismo. Sin embargo, los órganos requieren de mecanismos para reponer sus células ante el recambio constante por mantenimiento o como respuesta ante un daño, de esta manera los tejidos en desarrollo conservan reservas de células troncales (CTs) somáticas que retienen la capacidad de autorrenovación pero que finalmente progresan como unipotentes o multipotentes (1,2). El concepto de «nicho celular» fue acuñado a finales de la década de los setentas y definido como: «un microambiente que mantiene CTs y su proliferación en estado indiferenciado» (3).

En la actualidad, al nicho celular también se le atribuye la capacidad de controlar la interacción de las CTs con las poblaciones celulares vecinas, presenta una arquitectura bien definida y provee los nutrientes necesarios a las poblaciones residentes, todo esto para conservar las propiedades básicas de las CTs. (4,5).

Una característica fundamental es que, si bien el nicho genera y retiene CTs hijas, posteriormente éstas producen células completamente diferenciadas; para lograr esta diferenciación se combinan las propiedades intrínsecas de las CTs con los factores extrínsecos de las poblaciones no troncales residentes en el nicho, guiando así la orientación espacial y división de las CTs. Por lo tanto, la correcta interacción entre las CTs con el nicho es crucial para mantener su homeostasis (1,6).

### **Nichos neurogénicos, neurogénesis adulta.**

En el cerebro de los mamíferos las CTs persisten a lo largo del ciclo vital del organismo, este fenómeno fue descrito por Joseph Altman en la década de los sesentas, al evidenciar que ciertas células en el cerebro adulto presentaban actividad mitótica, verificando el proceso mediante el marcaje con <sup>3</sup>H-Timidina, que se localizó con marcadores neuronales (7,8). De este modo, paulatinamente se suprimió el dogma predominante propuesto inicialmente por Santiago Ramón y Cajal que consideraba a la neurogénesis en el cerebro como un proceso que se restringía a la etapa embrionaria (9).

Las CTs del cerebro postnatal se denominan células troncales neurales (CTNs), las cuales son definidas funcionalmente por su capacidad de auto-renovación y de diferenciación a linajes neurales incluyendo células gliales y neuronas, éstas últimas son generadas a través de un proceso secuencial conocido como neurogénesis (10,11). Las CTNs residen en microambientes cerebrales bien delimitados denominados nichos neurogénicos. Los criterios para validar la neurogénesis fueron propuestos en la década de los ochenta y sugerían la verificación de: a) incorporación de marcadores de división celular, b) despliegue de morfología y expresión de marcadores neuronales, c) respuesta electrofisiológica y d) integración a circuitos preexistentes (10).

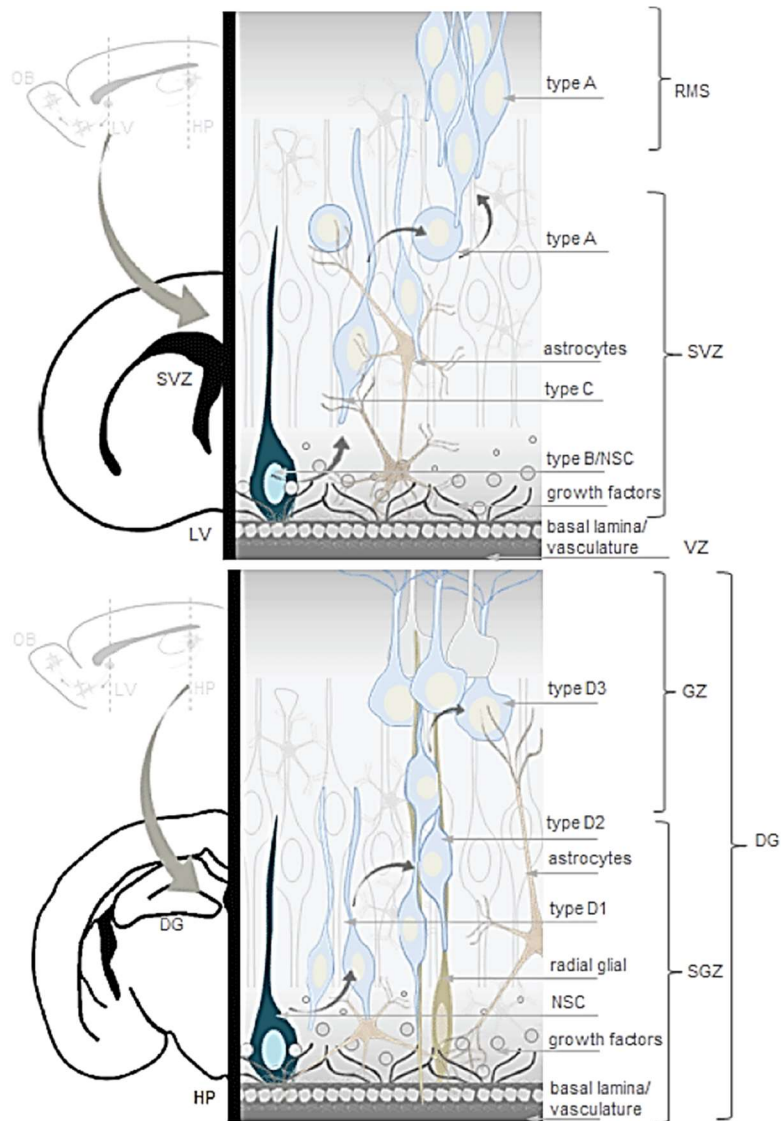
De esta manera, se han identificado y caracterizado dos nichos neurogénicos en el cerebro postnatal, la zona subgranular (ZSG) del giro dentado del hipocampo y la zona subventricular (ZSV) de las paredes de los ventrículos laterales (VL) la cual continúa a través de la vía rostral migratoria (VRM) para culminar en el bulbo olfatorio (BO) (Fig. 1) (12).

En ambos nichos neurogénicos, un conjunto de células derivadas de la glía radial astrocítica representan los precursores primarios en la neurogénesis adulta. Estas células han sido identificadas como astrocitos debido a sus características ultraestructurales, expresión de marcadores y propiedades electrofisiológicas (13). Durante el desarrollo embrionario, la glía radial es la precursora de neuronas y glía, mientras que en la fase postnatal origina únicamente astrocitos, destacando que, exclusivamente aquellos astrocitos retenidos en los nichos neurogénicos son los que preservan las características propias de las CTNs (14–16).

Otra característica que comparten los nichos neurogénicos es que la neurogénesis ocurre en la proximidad con vasos sanguíneos y su relación con la angiogénesis, existiendo una estrecha asociación con células endoteliales (17).

Asimismo, ambas regiones están enriquecidas con proteínas de matriz extracelular (MEC) y una prominente membrana basal para regular la difusión de moléculas y permitir el anclaje, orientación y división de las células (18).

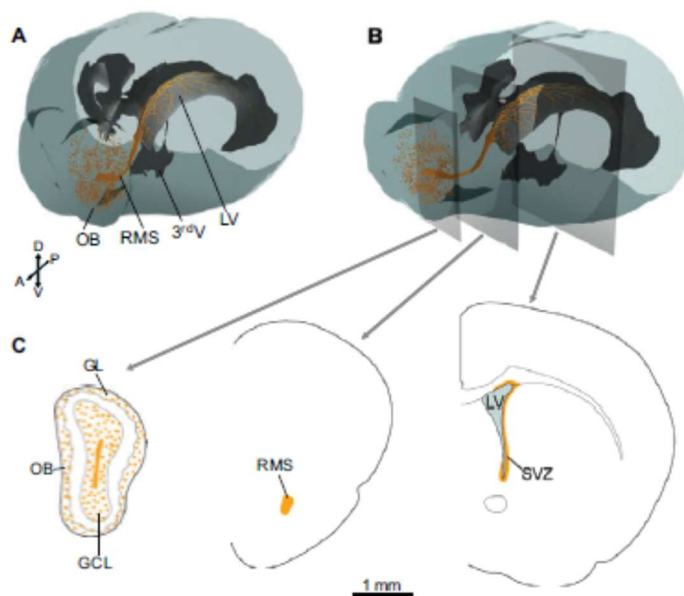
Paralelamente, ya que existe en el nicho la invasión de axones procedentes de regiones distantes, la influencia de la señal de los neurotransmisores parece representar un factor clave para la regulación y amplificación de las poblaciones de CTNs (19,20).



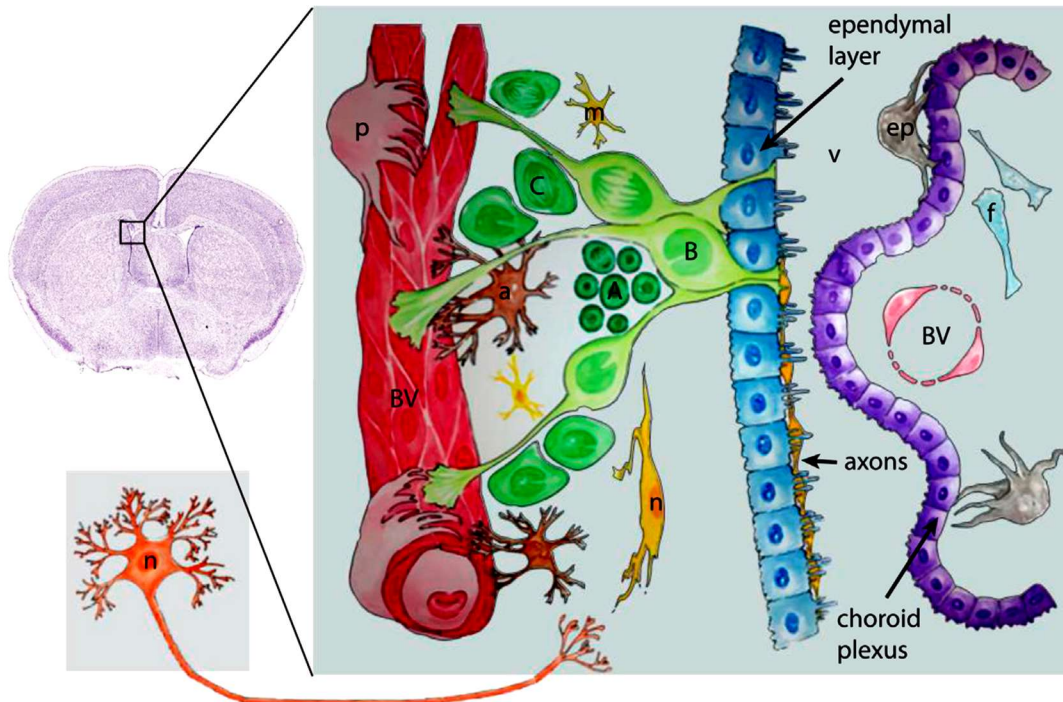
**Fig. 1. Nichos neurogénicos en el cerebro postnatal.** Los microambientes que generan a las CTNs están formados por la membrana basal, la vasculatura y las células de soporte no neurogénicas que aportan factores de crecimiento y por los precursores neurales que pertenecen al linaje glial. **(SVZ)** Zona subventricular; **(RMS)** vía rostral migratoria; **(VZ)** zona ventricular; **(DG)** giro dentado; **(GZ)** zona granular; **(SGZ)** zona subgranular; **(NSC y B)** célula troncal neural; **(A)** neuroblastos migrantes; **(C)** transitorias amplificadoras; **(D1)** célula progenitoras; **(D2)** célula migrante; **(D3)** neuroblasto. Tomado de (12).

## Zona subventricular-Vía Rostral Migratoria-Bulbo Olfatorio, el mayor nicho neurogénico.

En la década de los noventa se realizaron los trabajos pioneros para corroborar que la ZSV de los VL en el cerebro adulto de mamífero retenía la capacidad para generar neuronas nuevas, demostrando que las CTNs se dividían *in vivo*, revisado en (21). La composición y citoarquitectura de la ZSV es sumamente compleja, en ella figuran diversos tipos celulares (Fig. 2 y 3). Los precursores de las células neurales son los astrocitos conocidos como células B o también denominadas CTNs que se clasifican en B1, adyacentes a las células ependimales y las B2, presentes en la interfase con el parénquima estriatal; células C o transitorias amplificadoras; células A o neuroblastos migrantes (21–23). Estos precursores interactúan con las células ependimales, vasos sanguíneos, pericitos, axones dopaminérgicos procedentes de la sustancia nigra, axones serotoninérgicos del núcleo rafé, neuronas catecolaminérgicas propias de la ZSV y microglía (24–26).

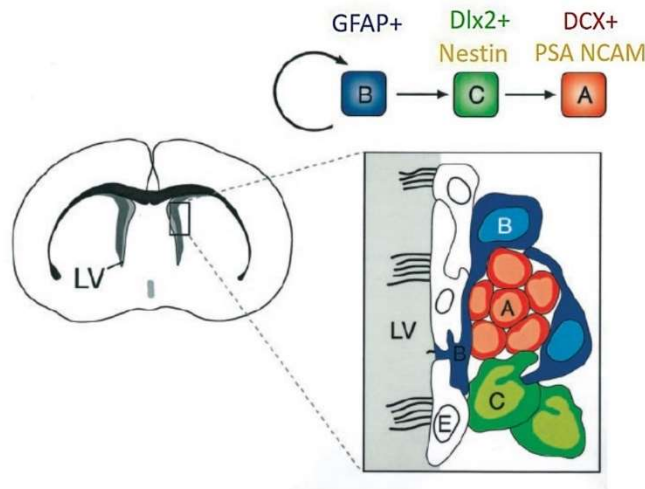


**Fig. 2. Representación de la neurogénesis en ZSV-VRM-BO.** (A) Esquematización 3D del origen de las CTNs (color ocre) en ventrículo lateral (LV, 3<sup>er</sup>V), las cuales se localizan a lo largo del mismo y convergen en la vía rostral migratoria (RMS) para llegar al bulbo olfatorio (OB). (B-C) Planos coronales de las secciones en los tres compartimentos. Tomado de (22).



**Fig. 3. Componentes celulares de la ZSV postnatal.** Este nicho neurogénico se ubica en las paredes de los VL adyacentes al estriado (recuadro superior a la izquierda). El nicho está invadido por axones de la sustancia nigra y del núcleo rafé (n en panel inferior izquierdo), así como neuronas catecolaminérgicas de la SVZ. **B**, CTNs o células tipo B; **C**, células transitorias amplificadoras o tipo C; **A**, neuroblastos migrantes o células A; **m**, microglía; **BV**, vaso sanguíneo; **p**, pericitos; **n**, neurona; **ep**, célula del epiplejo; **a**, astrocito; **f**, fibroblasto. Imagen tomada y modificada de (26).

En contacto directo con la capa epitelial de células endoteliales se encuentran las células tipo B, expresando la proteína ácida glial fibrilar (GFAP), propia de los filamentos intermedios de astrocitos, éstas se dividen para originar a las células tipo C que expresan el factor de transcripción Dlx2 y a su vez proliferan de manera rápida para generar las células tipo A, identificadas por la expresión de la proteína asociada a microtúbulos de neuroblastos migrantes DCX. Las células tipo C forman pequeños grupos que se diseminan y se interponen entre las células tipo B que rodean al conjunto de células tipo A (Fig. 4) (14,27).

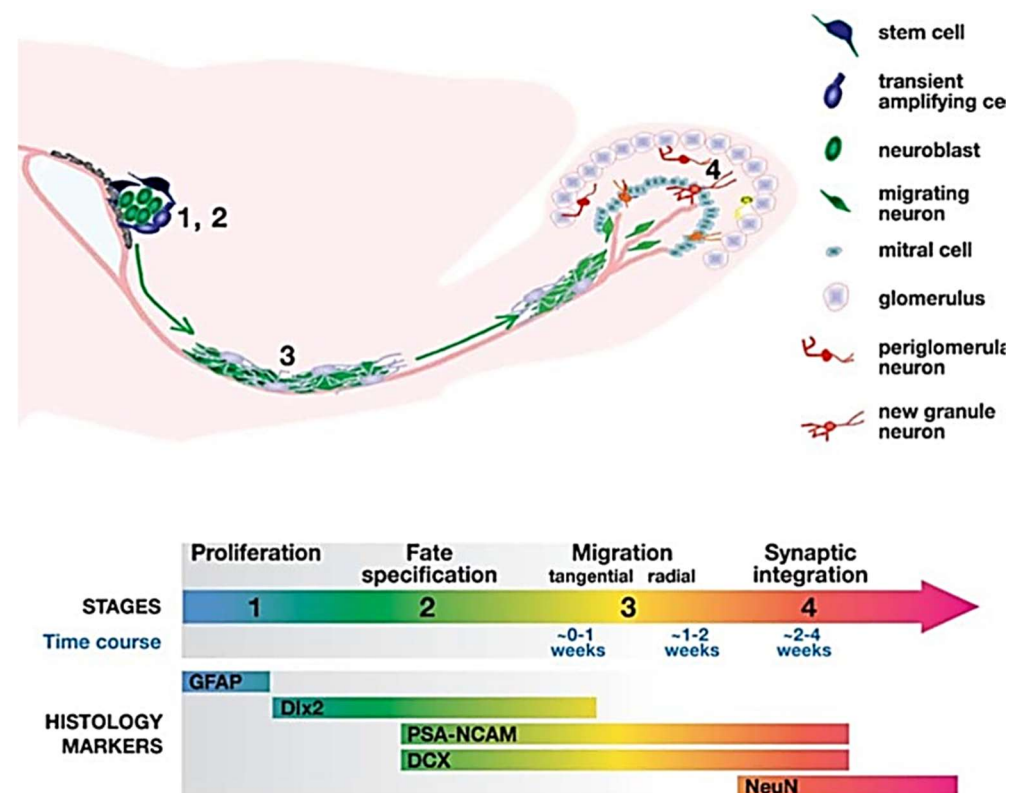


**Fig. 4. Organización y secuencia de diferenciación de las CTNs en la ZSV.** En el recuadro se ilustra la disposición de las células adyacentes a la pared del VL; las células tipo B se encuentran en contacto directo con las endociliales, las células C se agrupan entre las células tipo B y tipo A, estas últimas se disponen en formación en cadena. Las CTNs o células tipo B son astrocitos que expresan la GFAP, éstas pueden permanecer quiescentes o dividirse, generando así a las células tipo C o transitorias amplificadoras que expresan Dlx2 y que a su vez proliferan muy rápidamente para originar a las células tipo A o neuroblastos migrantes que expresan la proteína DCX. Imagen tomada y modificada de (27).

Las células tipo A ubicadas en la extensión rostral del VL (conocida como cuerno del VL) se organizan en cadenas elongadas y continúan en división mientras se desplazan de manera tangencial para integrarse a la VRM; en el cerebro de roedores se estima que alrededor de 30,000 neuroblastos se incorporan diariamente a la VRM y deben recorrer entre 5 y 8 mm de distancia en dirección rostral para arribar al BO (28,29). La formación en cadena de las células tipo A consiste en que los neuroblastos migran deslizándose entre sí en la VRM, ésta es confinada por una estructura tubular de astrocitos y no es guiada por la glía radial como ocurre en la etapa embrionaria (30,31).



Los neuroblastos comienzan a migrar radialmente una vez que alcanzan el BO, posteriormente expresan el marcador de núcleos neuronales NeuN, lo cual confirma la consolidación de la madurez neuronal, posteriormente se diferencian en interneuronas de la capa granular (CG) o de la capa periglomerular (CPG) del BO en donde finalmente se integran a los circuitos funcionales; el lapso entre el nacimiento de las CTNs y su diferenciación-integración en el BO comprende aproximadamente 28 días (Fig. 5) (23,32).

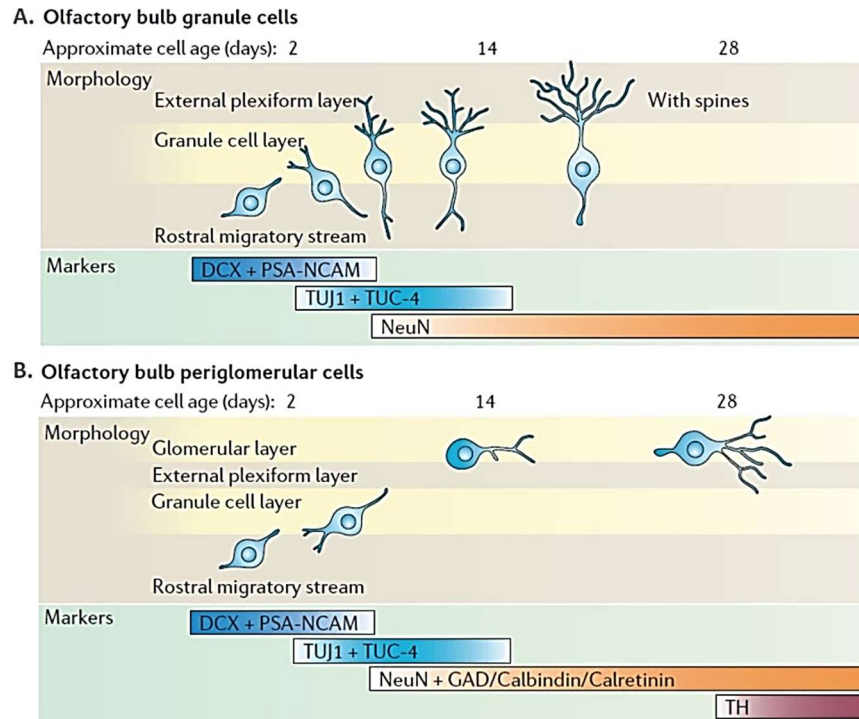


**Fig. 5. Generación de interneuronas en el BO a partir de CTNs de la ZSV.** En la fase 1 las CTNs proliferan en la ZSV. En la fase 2 se especifica el destino neuronal, las CTNs originan a las células transitorias amplificadoras las cuales se dividen y producen neuroblastos. En la fase 3 los neuroblastos migran en cadena a través de la VRM rodeados por astrocitos; al alcanzar el BO, los neuroblastos migran radialmente hacia las capas externas. En la fase 4 se consolida la integración sináptica, los neuroblastos maduran y se diferencian en interneuronas granulares o periglomerulares para interactuar con células mitrales o empenachadas. Imagen tomada y modificada de (32).

La diferenciación neuronal e integración en el BO es un proceso intrincado, las nuevas neuronas adquieren la identidad GABAérgica y una subpoblación desarrolla también el fenotipo dopaminérgico. Sin embargo, esta diferenciación implica una serie de mecanismos que determinan el fenotipo final y su integración a las distintas capas que componen al BO (CG o CPG) (33).

Para el caso de la producción de las interneuronas de la CG (Fig. 6A), se toma como punto de partida o día 0, el momento en que aparecen como CTNs; durante la primera etapa se distingue a los neuroblastos integrando la cadena de migración tangencial entre los días 2 y 7; en la segunda fase, los neuroblastos arriban al BO donde migran radialmente entre los días 5 y 7 y expresan NeuN, confirmando su estado postmitótico; durante la tercera etapa, entre los días 9 y 13, se observan las neuronas con dendritas no ramificadas que no rebasan la capa de células mitrales; en la cuarta etapa, la dendrita con ramificación no espinosa se extiende hasta la capa plexiforme entre los días 11 y 22, sin embargo, la célula ya es considerada morfológicamente completa por haber desarrollado sus principales estructuras; finalmente, en la etapa 5 comprendida entre los días 15 y 30, se observan las nuevas interneuronas completando su madurez al desplegar espinas en sus dendritas (34). La maduración morfológica de las interneuronas de la CPG requiere de un lapso mayor (Fig. 6B), ya que el desarrollo de sus principales componentes se distingue hasta el día 28. Al igual que las neuronas de la CG expresan NeuN al arribar al BO, además coexpresan otros marcadores distintivos: Calbindina (Calb) y Calretinina (Calr), ambas son proteínas reguladoras de la unión a  $Ca^{+}$  (35).

De manera adicional, es importante señalar que la velocidad de migración de los neuroblastos fluctúa entre los 40 y 80  $\mu\text{m}/\text{h}$ , este índice no es constante en cada célula debido a que se alternan periodos de movilidad acentuada y reposo (36).



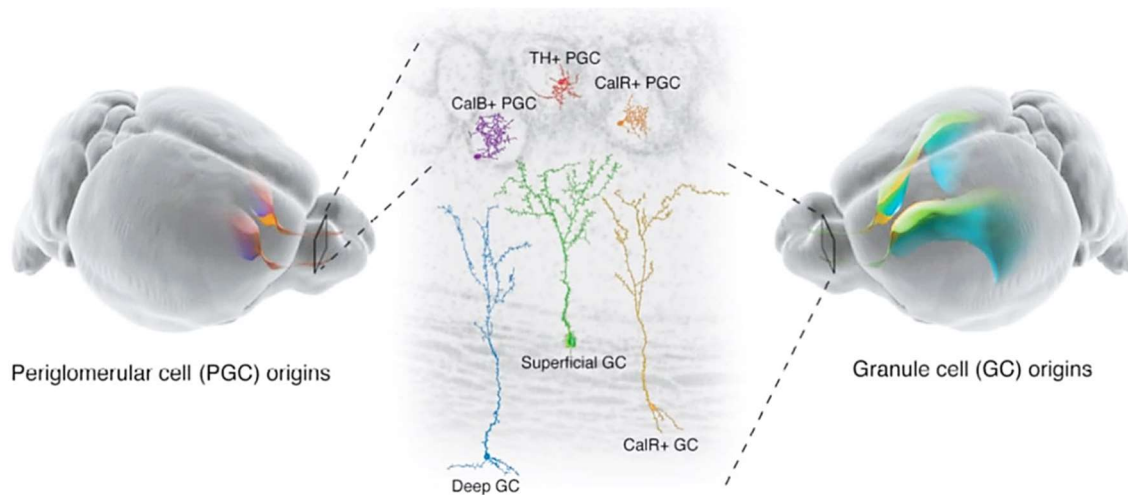
**Fig. 6. Maduración postmitótica de los neuroblastos en el BO.** La complejidad de las neuronas inmaduras aumenta dentro de las primeras dos semanas. (A) Las células de la CG desarrollan dendritas más complejas que alcanzan la capa plexiforme, considerándose morfológicamente maduras en la segunda semana, las espinas dendríticas completamente desarrolladas se aprecian hasta la cuarta semana. (B) Las células de la CPG requieren de aproximadamente cuatro semanas para completar su morfología axonal. Imagen tomada y modificada de (35).

Otra característica que distingue a las poblaciones de neuronas de la CG y la CPG es su sitio de origen; se ha demostrado que la VRM no es una estructura cuya función se limita a confinar y conducir a los neuroblastos migrantes, sino que conjuntamente genera distintas poblaciones de precursores.

Los precursores de las interneuronas de la CG se originan en la ZSV anterior, mientras que los precursores que proliferan dentro de la VRM generan a la mayoría de las interneuronas de la CPG (37).

El conjunto de CTNs que reside en la VRM cuenta con su particular esquema de expresión de factores de transcripción, los cuales son determinantes para originar específicamente a la población de interneuronas dopaminérgicas de la CPG (38,39).

Así pues, los precursores de los diversos subtipos de interneuronas que se integran al BO en la CG y CPG se originan en regiones específicas dentro de la ZSV y la VRM respectivamente (Fig. 7) (40).



**Fig. 7. Producción de interneuronas región-específica en el BO.** Los paneles laterales muestran vistas oblicuas de los nichos neurogénicos, coloreados para señalar la región de origen de las interneuronas de la CPG (panel izquierdo, realzando la VRM) y de la CG (panel derecho, destacando la ZSV). Las células superficiales de la CG (verde) son producidas a partir de CTNs originadas en la región dorsal de la ZSV de los VL mientras que las células profundas de la CG proceden de la región ventral de los VL. Las células de la CG Calr+ (amarillo) provienen principalmente del área medial de la región anterior del VL. Las interneuronas de la CPG Calb+ (morado) y Calr+ (naranja) son producidas por precursores residentes de la región anterior del VL y principalmente por aquellos originados en la VRM, la población dopaminérgica (rojo) surge exclusivamente en la VRM. Imagen tomada y modificada de (40).

## **Regulación de la neurogénesis en la SZV-VRM-BO**

Los mecanismos que regulan la neurogénesis en la ZSV y VRM se clasifican en: factores internos o propios de las CTNs como la expresión génica y en factores externos o señales del microambiente, incluyendo factores de crecimiento, hormonas, neurotransmisores e incluso lesiones. Dichos factores son capaces de influir en la proliferación, migración y diferenciación de las CTNs (Fig. 8) (35).

### *Factores intrínsecos*

-Ephrin/Eph. La familia de receptores transmembranales Eph presentes en células del nicho y los ligandos Ephrin expresados en las células tipo B, interactúan y regulan distintos aspectos de la neurogénesis; su influencia es observada en los astrocitos que rodean la cadena de neuroblastos migrantes a lo largo de la VRM, además, la interrupción de la interacción ligando-receptor Ephrin/EphB2 promueve la proliferación de CTNs y por ende la desorganización de la cadena de neuroblastos (41,42).

-BMP/Noggin. La proteína morfogénica ósea (BMP) y sus receptores son expresados en las CTNs en la ZSV. BMP promueve la diferenciación al linaje glial de las CTNs, mientras que, paralelamente, las células ependimales secretan la proteína Noggin que tiene un efecto antagonista para la señal de BMP e impide la diferenciación al linaje glial promoviendo la sucesión de las CTNs al subtipo transitorio amplificador (43). Adicionalmente, la señal de BMP es regulada por la proteína Smad4 expresada por los astrocitos en la ZSV, la cual es requerida para iniciar la neurogénesis de las CTNs al suprimir la diferenciación de oligodendrocitos (44,45).

-Wnt. La vía de señalización de la proteína Wnt también está presente en la ZSV adulta, se ha demostrado que la activación de la vía canónica Wnt/ $\beta$ -Catenina incrementa la proliferación de las CTNs, mientras que la inhibición de esta vía resulta en una disminución en la neurogénesis y la función olfativa en roedores (46). Por su parte, la vía no canónica de polaridad planar celular está involucrada en la migración de los neuroblastos, ya que la inhibición de Wnt/PCP altera la posición final de las neuronas en el BO y afecta también la formación adecuada de las dendritas (47).

-Notch. La vía de señalización de Notch interviene en la proliferación de las CTNs, por lo tanto, el efector Notch1 reprime la diferenciación neuronal y determina el mantenimiento de las CTNs mediante su auto-renovación; roedores deficientes de esta vía presentan una reducción en la densidad de CTNs en la ZSV (48).

-Shh. La proteína Sonic hedgehog ha sido identificada en extractos de células de la ZSV, mientras que su receptor Patched es encontrado en neuroblastos migrantes en la ZSV y VRM; por lo tanto, Shh ejerce un efecto quimioatrayente sobre los neuroblastos, regulando así la migración celular (49). En roedores carentes de la señalización de Shh la integridad de la ZSV se ve afectada durante la etapa postnatal temprana, inicialmente se agotan las poblaciones de CTNs y de precursores transitorios amplificadores; subsecuentemente, los neuroblastos migrantes disponibles se dividen de manera desordenada y no integran adecuadamente la cadena de migración (50).

-Pax6. El factor de transcripción Paired box-6, es determinante para definir el destino de las CTNs; es escaso en la ZSV, pero es expresado de manera específica en los neuroblastos migrantes originados en la VRM, siendo esta población la precursora directa de las neuronas dopaminérgicas de la CPG (38). Ensayos de trasplante de CTNs con una mutación de Pax6 implantadas en la ZSV demostraron que, si bien las células son capaces de migrar, no desarrollan el fenotipo dopaminérgico ni se incorporan a la CPG (39).

-Olig2. El factor de transcripción de oligodendrocitos tipo 2 es exclusivamente expresado en los precursores transitorios amplificadores confinados en la ZSV, juega un papel crítico para la diferenciación glial y la respectiva restricción del fenotipo neuronal. Su sobreexpresión en las CTNs de la SZV promueve el incremento y la maduración de oligodendrocitos. Respecto a su regionalización y la diferenciación que facilita, Olig2 representa el rol opuesto al ejercido por Pax6 (38,51).

### *Factores extrínsecos*

-VEGF. El factor de crecimiento endotelial vascular es una glicoproteína que regula la proliferación celular en la ZSV, la infusión de este factor en el VL incrementa considerablemente la población de CTNs (52,53). Paralelamente, los astrocitos presentes tanto en la ZSV como en la VRM sintetizan VEGF mientras que el receptor VEGFr se encuentra en los neuroblastos, por lo tanto, su interacción representa una señal promotora de la migración en la VRM (54,55).

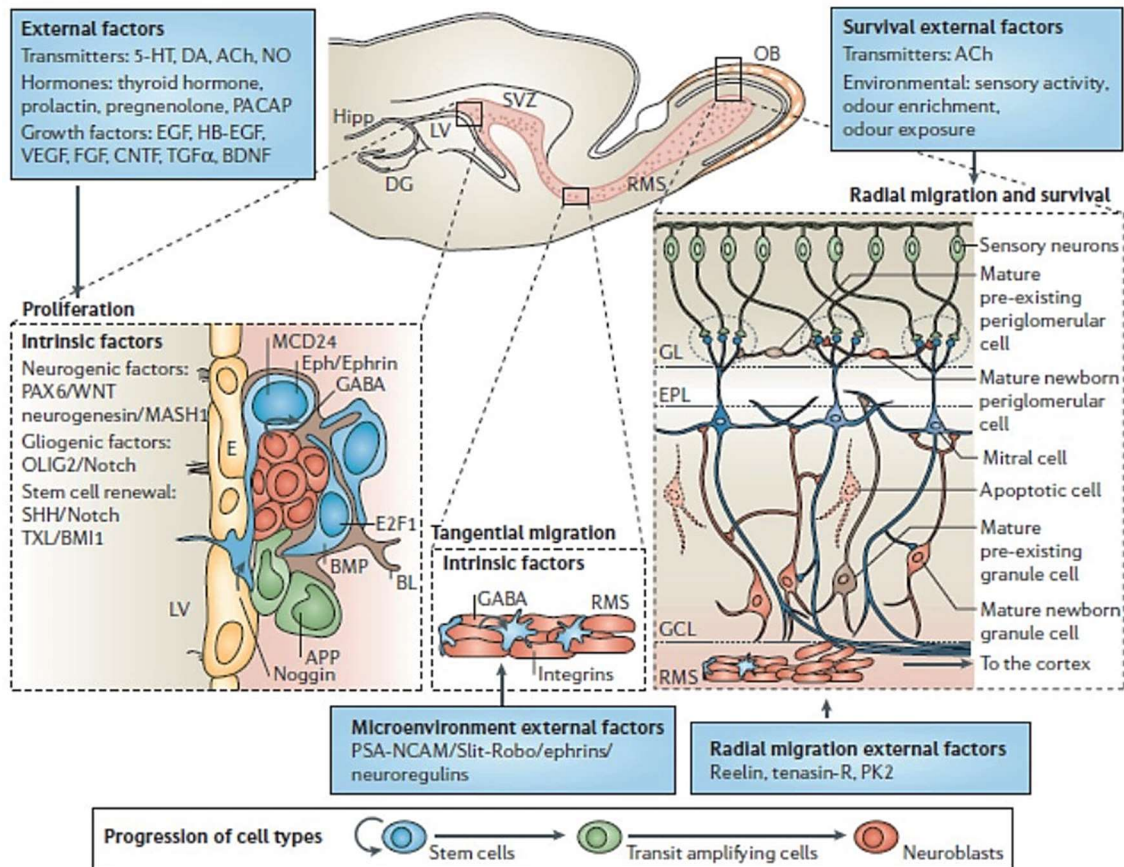
-BDNF. El factor neurotrófico derivado del cerebro es sintetizado por las células endoteliales e interviene en distintos procesos en la neurogénesis; su infusión o sobreexpresión en los VLs incrementa la proliferación y la migración de CTNs, de igual modo promueve la sobrevivencia y diferenciación de las nuevas neuronas en el BO (56). Adicionalmente, los progenitores neuronales se diferencian e integran en el estriado proximal y el septum, lo cual evidencia la capacidad del BDNF para direccionar la migración celular hacia distintos núcleos cerebrales (57,58). Existen dos receptores a BDNF que se expresan en patrones mutuamente excluyentes; TrkB es expresado principalmente en astrocitos de la ZSV mientras que p75NTR se encuentra primordialmente en neuroblastos migrantes en la VRM. La actividad de estos receptores influye en la organización funcional de las células involucradas en el proceso de migración hacia el BO (59,60).

-EGF y TGF $\alpha$ . El factor de crecimiento epidérmico y el factor de crecimiento transformante alfa son mitógenos destacados, su infusión en los VLs incrementa la proliferación celular. Ambos se asocian al receptor EGFR que se encuentra primordialmente en las células transitorias amplificadoras (61). Roedores carentes de TGF $\alpha$  presentan una disminución considerable en la población de CTNs (62). De manera específica, la sobreexpresión de EGF reduce el número de neuroblastos migrantes y de neuronas nuevas reclutadas en el BO, donde de manera paralela se incrementa sustancialmente la generación de astrocitos (63,64).

Posteriormente se demostró que la infusión de EGF en la VRM regula a la población local de CTNs e incrementa la proporción de precursores de oligodendrocitos que migran hacia el BO formando cadenas (65).



-FGF2. El factor de crecimiento fibroblástico básico sintetizado por las células endodimales y el receptor FGFR expresado por los progenitores neuronales, regulan la neurogénesis en la ZSV (66). FGF2 es otro agente que al ser administrado en los VLs estimula la proliferación de CTNs aunque, contrario al efecto de EGF, promueve la generación de neuroblastos y neuronas en el BO (63).



**Fig. 8. Factores reguladores de la neurogénesis en la ZSV y VRM.** La proliferación en la ZSV ocurre en la pared de los ventrículos laterales (LV), las CTNs se dividen y transforman en células transitorias amplificadoras para posteriormente originar neuroblastos que migran a través de la vía rostral migratoria (RMS) para integrarse al bulbo olfatorio (OB). Diversos factores internos expresados por las CTNs controlan la tasa de proliferación y el destino de las células neurales, adicionalmente, elementos del nicho como neurotransmisores, hormonas y factores de crecimiento cooperan con los factores internos de las CTNs para modular dichos procesos.

La migración tangencial a lo largo de la RMS es regulada por la interacción entre neuroblastos migrantes y el microambiente local que incluye proteínas y receptores requeridos para la atracción o repulsión mediada por contacto. Después de alcanzar el OB, la cadena de migración se desintegra y comienza la migración radial que es regulada por factores del nicho como reelin, tesnascin-R y prokineticin2 (PK2). Cuando los neuroblastos invaden las capas superpuestas del OB finalmente diferencian en dos tipos de interneuronas: granulares en la capa profunda CGL y periglomerulares en la capa superficial CG. La sobrevivencia de las nuevas neuronas depende de la entrada sensorial. 5-hidroxitriptamina, (serotonina); (ACh), acetilcolina; BDNF, factor neurotrófico derivado del cerebro; BL, lámina basal; BMP, proteína morfogénica ósea; CNTF, factor ciliar neurotrófico; DA, dopamina; E, célula ependimal; EGF, factor de crecimiento epidérmico; EPL, capa plexiforme externa, FGF, factor de crecimiento fibroblástico, GABA, ácido gama amino butírico; GCL, capa granular celular; GL, capa glomerular; BH-EGF, EGF de unión a heparina; MASH1, achaete-escute homólogo tipo 1 de mamíferos; MCD24, molécula glicosilfosfatidil-inositol-anclada altamente glicosilada; E2F1, factor de transcripción 1; NO, óxido nítrico; OLIG2, factor de transcripción de oligodendrocitos tipo 2; PACAP polipéptido activador de la adenilato-ciclasa de la pituitaria; PAX6, paired box 6; PSA-NCAM, molécula de adhesión celular neuronal ácida poliacilada; SHH, Sonic hedgehog; TGF $\alpha$ , factor de crecimiento transformante alfa; VEGF, factor de crecimiento vascular endotelial; TXL thioredoxin-like. Tomada y modificada de (35).

-Lámina basal y MEC. Los componentes de la MEC son fundamentales para configurar la cito-arquitectura del nicho y regular la difusión de diversos factores involucrados en la neurogénesis.

La lámina basal en la ZSV es un componente extravascular único y altamente rico en laminina y colágeno-I organizado en unidades denominadas “fractones” debido a su arreglo fractal y a su disposición ramificada que entra en contacto con los macrófagos perivascuales y circunda las células de la ZSV para finalmente vincularse con la superficie basal de la capa ependimal, por lo tanto, los fractones poseen un rol estructural y adicionalmente retienen y distribuyen factores neurotróficos (67).

## -Neurotransmisores

-Dopamina. La ZSV recibe terminales axónicas procedentes de la sustancia nigra *pars compacta* (SNc), la liberación de dopamina a partir de dichas terminales regula la proliferación celular ya que las CTNs y las células transitorias amplificadoras poseen receptores dopaminérgicos (68).

Diversos ensayos de lesiones de la SNc con neurotoxinas selectivas como la 6-hidroxi-dopamina (6-OHDA) o el 1-metil-4-fenil-1-2-3-6-tetrahidropiridina (MPTP) mostraron que la disminución del aporte dopaminérgico en la ZSV daba como resultado el descenso de la proliferación de CTNs y por ende, de la diferenciación neuronal (68–70).

Por el contrario, la administración de haloperidol, un antagonista de los receptores dopaminérgicos D2 presentes exclusivamente en las CTNs, origina el aumento de la proliferación celular en la ZSV (71).

El receptor dopaminérgico D3 se expresa específicamente en las células transitorias amplificadoras y su activación incrementa la proliferación de las mismas así como su integración en el BO (72).

La dopamina parece ejercer efectos distintos, inhibiendo la proliferación de las CPNs mientras promueve el incremento de las células transitorias amplificadoras, esto bajo los esquemas de manipulación de la neurotransmisión.

-Acetilcolina: Los neuroblastos migrantes poseen receptores a acetilcolina, los cuales son activados por la señalización de las terminales colinérgicas presentes en el BO, lo cual favorece la sobrevivencia celular en etapa postmitótica y la diferenciación neuronal (73,74).

Posteriormente se demostró que dentro de la ZSV residen poblaciones de neuronas colinérgicas distintas a las que habitan en el estriado aledaño y que su aporte de acetilcolina promueve específicamente la proliferación de las CTNs y de neuroblastos migrantes. (75).

Recientemente se observó que, inhibiendo el receptor colinérgico  $\alpha 7nAChR$  se produce el descenso en la proliferación de nuevas CTNs mientras que se incrementa la diferenciación de las ya existentes, en un modelo de isquemia cerebral en roedores (76).

-Serotonina: La pérdida de aporte de serotonina, provocada por lesiones en el núcleo rafé repercuten directamente en la reducción de la proliferación de las CTNs sin interferir con la diferenciación de los precursores existentes (77). Mediante el uso de agonistas, la activación de los receptores 5-HT<sub>2C</sub> (presentes en el plexo coroideo) se induce el aumento en la proliferación de las CTNs y su diferenciación en el BO (78). Adicionalmente, existen fibras serotoninérgicas en la ZSV y a lo largo de la VRM que liberan el neurotransmisor y promueven la sobrevivencia y diferenciación de los neuroblastos migrantes (79).

## **Neurogénesis ante daño cerebral, restauración mediante CTNs.**

Debido a que las neuronas generadas en la etapa postnatal y adulta se integran a circuitos funcionales significan un potencial recurso para regenerar circuitos dañados. Diversos ensayos han demostrado que al inducir lesiones cerebrales se incrementa la proliferación de CTNs en los nichos neurogénicos, por ejemplo, en modelos de isquemia cerebral donde se daña focalmente el estriado, se observó el aumento de la producción de CTNs en la ZSV y la posterior migración de las mismas hacia la zona afectada, permitiendo incluso la diferenciación de algunos neuroblastos migrantes al fenotipo sitio-específico estriatal regulador de dopamina, confirmado por la expresión de la proteína DARPP-32+ (80). Por lo tanto, se ha evaluado la posibilidad de aprovechar las CTNs para reparar otros circuitos cerebrales dañados, mediante su cultivo *in vitro* y su posterior trasplante. Sin embargo, por lo general se observa una tendencia a la diferenciación astrocítica con escasa o nula diferenciación neuronal (81,82). Se ha intentado también trasplantar específicamente el subtipo neuronal carente en algún modelo de lesión, para esto, las CTNs se cultivan y se diferencian *in vitro* hasta lograr el fenotipo buscado, no obstante solo se consigue una liberación transitoria del neurotransmisor en cuestión sin lograr una adecuada integración celular al circuito (83,84). Otro de los recursos celulares considerados para pruebas de trasplante han sido las CTEs debido a las ventajas que representan su manipulación e inducción a la diferenciación hacia diversos fenotipos neurales.

## **Células troncales embrionarias**

### *Características y relevancia*

Las células troncales embrionarias (CTEs) se obtienen a partir de la masa celular interna (MCI) del blastocisto en etapa de pre-implantación y sus características más relevantes son la pluripotencia y la auto-renovación.

La pluripotencia es la propiedad de las CTEs para diferenciarse hacia cualquier linaje celular derivado de las tres capas germinales (ectodermo, endodermo y mesodermo) que conforman al embrión en desarrollo y subsecuentemente al organismo adulto (85,86). Además, si las CTEs son reimplantadas en la MCI de blastocistos de roedores, también son capaces de incorporarse a todos los tejidos de manera funcional incluyendo la línea germinal y generando de este modo quimeras (87).

La auto-renovación es la capacidad de las CTEs para proliferar mediante divisiones celulares simétricas sin diferenciarse, produciendo así una progenie pluripotente. La pluripotencia de las CTEs es controlada principalmente por tres reguladores clave, los factores de transcripción Oct4, Sox2 y Nanog (87,88).

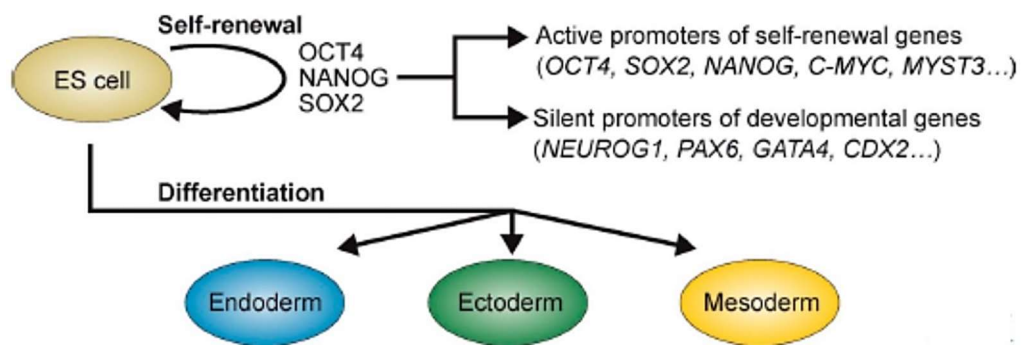
Oct4 es codificado por Pou5f1, su expresión es muy elevada en el cigoto, en el embrión temprano durante la etapa de segmentación y posteriormente solo se mantiene en la MCI, particularmente en el epiblasto (89,90). Sox2 es requerido para regular diversos factores de transcripción que controlan la expresión de Oct4 y de este modo mantenerlo en los niveles requeridos (91,92).

Oct4 y Sox2 sinérgicamente activan enhancers de genes que favorecen concretamente la pluripotencia de las CTEs y por lo tanto contribuyen a reprimir los genes que promuevan la diferenciación celular linaje-específica (86).

El dominio sobre la pluripotencia de Oct4 y Sox2 es tal que su expresión forzada (en conjunto con cMyc y Klf4) ha sido suficiente para reprogramar fibroblastos de ratón adulto a células pluripotentes (93).

Nanog es detectado en el embrión a partir de la etapa de mórula y sus niveles declinan en la fase posterior a la implantación, se encuentra mayormente en el epiblasto en las células que coexpresan Oct4; estos patrones de expresión indican que el descenso en el nivel de Nanog es importante para evitar la expansión descontrolada de células pluripotentes (94).

Unidos, estos factores de transcripción regulan positivamente a sus propios promotores formando así un loop de autorregulación interconectado (Fig. 9).



**Fig. 9. Auto-renovación y diferenciación de las CTEs.** Las CTEs pueden diferenciarse en linajes de las tres capas germinales. Oct4, Sox2 y Nanog constituyen un núcleo transcripcional regulador de la auto-renovación. Estos factores de transcripción co-regulan a muchos genes que pueden ser clasificados en grupos con funciones opuestas dependiendo de la promoción de la auto-renovación o bien de la diferenciación celular. Tomada de (88).

*In vitro*, generalmente las CTEs son co-cultivadas sobre una monocapa de fibroblastos alimentadores en presencia de suero fetal bovino con la finalidad de inhibir su diferenciación, el compuesto activo que impide la diferenciación es el factor inhibidor de leucemia (LIF) (95). Conjuntamente, los fibroblastos también aportan las proteínas Tcf3, Smad 1 y Smad 2/3 de las vías de señalización de Wnt, TGF- $\beta$  y BMP respectivamente (86,96).

Los factores de transcripción asociados con las vías de señalización de LIF (STAT3), Wnt (Tcf3) y BMP (Smad1), contribuyen a la regulación de los factores de transcripción clave ya que tienden a co-ocupar los mismos enhancers (97).

LIF es un miembro de las Interleucinas-6, una familia de citocinas; se une con su receptor (LIFR), específicamente a la subunidad gp130. En el embrión, LIF es expresado en el trofoectodermo y LIFR en la MCI (98).

A partir de la dimerización LIF-LIFR se inicia la actividad de tirosina-quinasa, reclutando al transductor de señal y activador de la transcripción (STAT3) que es fosforilado por Janus Kinasa (JAK), esta activación es suficiente para mantener la auto-renovación de las CTEs evitando su diferenciación espontánea (99,100).

La regulación de la pluripotencia y auto-renovación de las CTEs es crucial para conducir su diferenciación a distintos linajes celulares con la finalidad de simular las condiciones necesarias *in vivo* y así, eventualmente conformar tejidos que presenten una adecuada configuración y sean capaces de mantener sus funciones específicas, todo esto con la finalidad de posteriormente utilizarlas en terapias de reemplazo celular.



### *Formación de cuerpos embrioides.*

La diferenciación de las CTEs *in vitro* es una poderosa herramienta para analizar los mecanismos que conducen al compromiso y especificación del linaje celular.

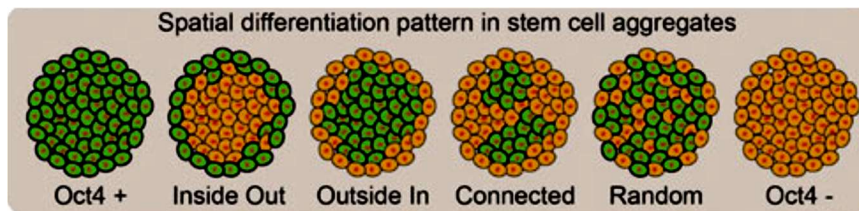
Otra particularidad muy relevante de las CTEs es su capacidad de expansión en todas direcciones al encontrarse en monocapa, en cambio, en suspensión muestran la tendencia de autoorganizarse en estructuras tridimensionales esféricas conocidas como cuerpos embrioides (CEs). Por lo tanto, estos agregados multicelulares han sido ampliamente estudiados por las analogías que presentan con los eventos del desarrollo embrionario temprano (101,102).

La formación de CEs se logra al mantener a las CTEs en suspensión retirando del medio de cultivo el LIF, por lo cual se promueve la agregación celular y se inicia su diferenciación de manera espontánea (103).

Generalmente, la formación de CEs ha sido el método más utilizado para inducir la diferenciación de las CTEs, representando el paso inicial de la mayoría de los protocolos de especificación. En estas estructuras, las células experimentan un proceso de diferenciación con una compleja regulación espaciotemporal y la coordinación de diversos factores fisicoquímicos (104).

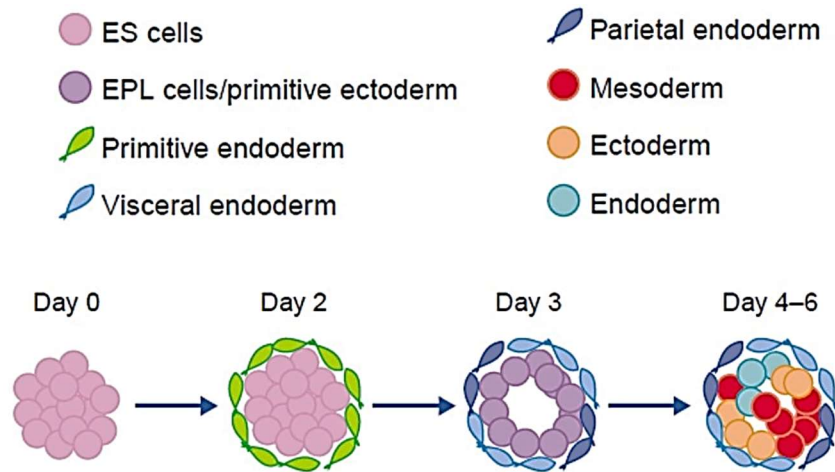
Al analizar la diferenciación espontánea de las CTEs en los CEs, se han obtenido importantes nociones de los factores de transcripción cruciales que dirigen tal proceso y que coinciden con los mecanismos del desarrollo embrionario *in vivo* durante la etapa de pre-implantación en distintas especies de vertebrados.

Por ejemplo, en los CEs derivados de CTEs de ratón, se distingue la expresión de Oct4, uno de los factores de transcripción maestros de la pluripotencia, que representa una referencia importante y contribuye a la clasificación de los CEs según su nivel de expresión en 6 subtipos (Fig. 10), partiendo del punto inicial cuando la totalidad de las CTEs en el CE son Oct4+ y gradualmente disminuye su expresión hasta el estado definitivo Oct4-, proporcional al nivel de diferenciación linaje-específico (104).



**Fig. 10. Patrón espacial de diferenciación en agregados de CTEs respecto a Oct4.** El patrón de expresión de Oct4 fluctúa desde el punto en el que todas las células del agregado son Oct4+ y gradualmente disminuye la proporción hasta alcanzar la ausencia de expresión del factor Oct4-. Tomada de (104).

Por lo tanto, todas las células de los CEs expresan Oct4 al día 0 mientras que en el día 2 integran una capa equivalente al endodermo primitivo que pierde la expresión de Oct4, dicha capa se encuentra dispuesta en la periferia y muestra una morfología epitelial aplanada, mientras que el resto de células del interior se mantiene Oct4+ representando una estructura equivalente al epiblasto que, alrededor del día 3 muestra la co-expresión de Fgf5, lo que representa la integración del ectodermo primitivo arreglado en monocapa mientras que la superficie externa diferencia a endodermo visceral y parietal; finalmente, entre los días 4 y 6 las células del ectodermo primitivo originan precursores endodérmicos, mesodérmicos y ectodérmicos (Fig. 11) (101,105).

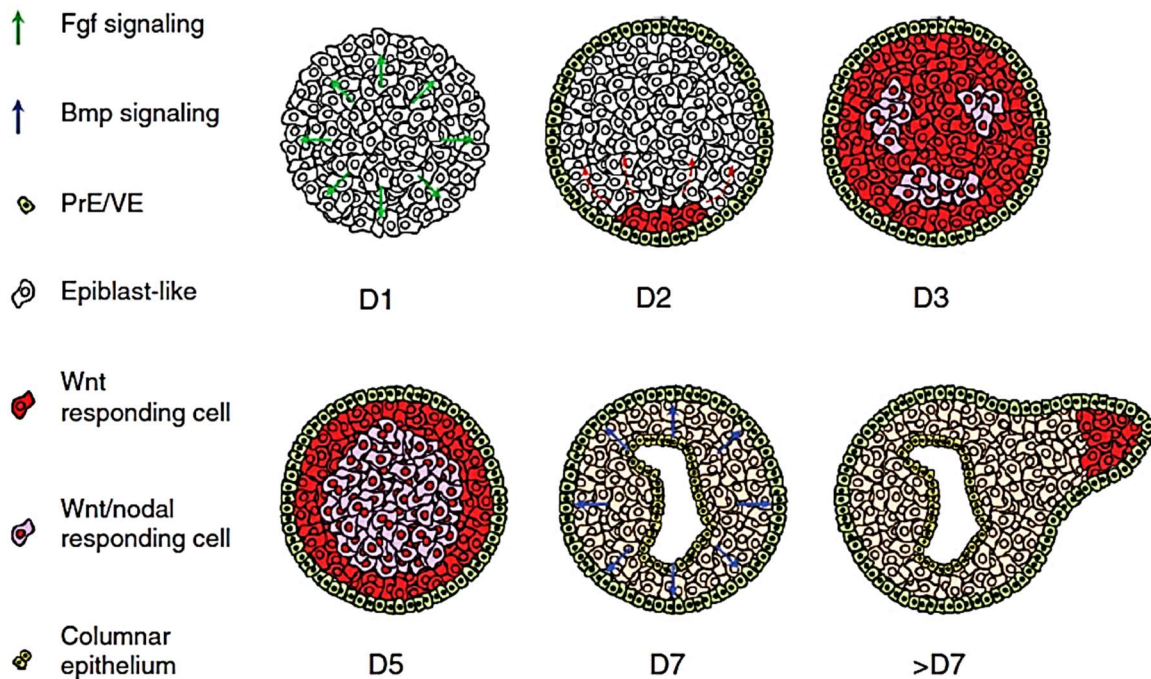


**Fig. 11. Progresión de la diferenciación celular en los CE.** En el día 0 comienza la formación de los agregados de CTEs; para el día 2 las células dispuestas en la periferia de los agregados forman una capa con identidad de endodermo primitivo; durante el día 3 las células del interior generan el ectodermo primitivo en tanto que la capa exterior diferencia a mesodermo visceral y parietal; entre el día 4 y 6 las células internas o del ectodermo primitivo dan origen a precursores del ectodermo, mesodermo y endodermo. Tomada y modificada de (101).

Se distinguen también la señalización de distintas moléculas (Fig. 12), por ejemplo, la activación asimétrica de la señal del factor de transcripción Wnt para la formación del eje anterior-posterior a partir del día 2 de formación, inicialmente Wnt es localizado en puntos discretos que posteriormente se expanden, para finalmente ocupar la mayoría del CE entre el día 3 y 5 de formación, este proceso asemeja el establecimiento del patrón anterior-posterior observado en el embrión (106).

De igual modo, la señal de Nodal se observa en conjuntos celulares reducidos al centro del CE que paulatinamente se extienden, esta señal es importante para la formación del plano lateral (107).

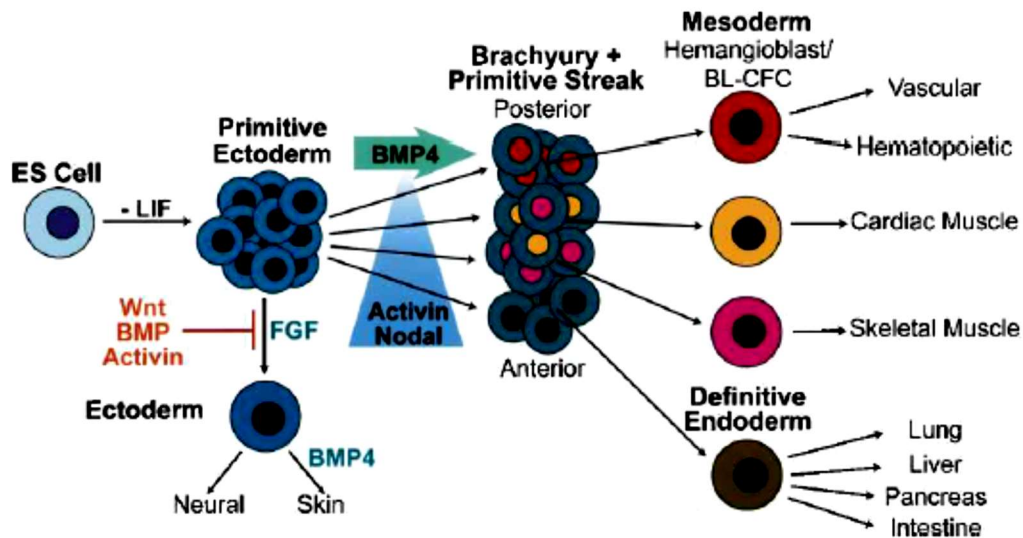
En etapas avanzadas de formación, en el CE comienza a distinguirse la apoptosis de las células internas en respuesta a la señal de BMP4, de este modo se origina una cavidad central análoga a la estructura cilíndrica que aparece durante la etapa de blástula embrionaria y que deriva en la cavidad proamniótica (101,108,109).



**Fig. 12. Señales inductoras de la diferenciación de los CEs en etapas tempranas y tardías.** El endodermo primitivo se forma a partir de las células en la superficie del CE inducida por la señal de Fgf; en el día 2 de formación la señalización focal de Wnt también se distingue, en este punto. La señal de Wnt se expande gradualmente hasta abarcar por completo el CE y simultáneamente se observa la señal de Nodal inicialmente en puntos discretos para después expandirse a toda la región central. En etapas tardías se forma una cavitación inducida por la señal de BMP. Tomada y modificada de (102).

Como ya se mencionó, posterior al día 4 de formación del CE, las células pluripotentes diferencian a tipos celulares correspondientes a las tres capas germinales expresando los marcadores específicos de mesodermo (Brachyury+ y  $\zeta$ -Globina+), endodermo (Afp+, Foxa2+) y ectodermo (Fgf5+). (110–112) .

Subsecuentemente, las células derivadas de CEs pueden diferenciarse en una gran variedad de tipos celulares maduros incluyendo neuronas, cardiomiocitos y células sanguíneas, lo cual también asemeja la progresión del desarrollo *in vivo* (Fig. 13). (102).



**Fig. 13. Diferenciación de CTEs en los CE durante el desarrollo del ectodermo primitivo, origen de las capas germinales y el rol de señales específicas.** Las células Brachyury+ representan las poblaciones que originan el eje anterior-posterior. BMP4 induce la formación del mesodermo posterior y la piel. Un gradiente de Nodal/Activina induce en concentraciones bajas a los derivados de poblaciones de la región posterior o mesodérmicas en tanto que en concentraciones altas origina a los derivados de poblaciones de la región anterior o endodérmicas. Fgf juega un papel de inducción al linaje neural mientras que Wnt, BMP y activina están implicados en la inhibición de este. Tomada de (111).

### *Diferenciación neuronal de las células troncales embrionarias*

*-In vitro.* En los protocolos de diferenciación es importante emular las condiciones *in vivo* y adicionar los factores específicos que recapitulen el desarrollo del linaje neural. Sin la proporción o secuencia adecuadas de los elementos necesarios para dicha diferenciación, el número de células que adquieren el linaje neuronal es por lo general muy bajo con respecto al total de CTEs utilizadas en los protocolos. La inducción neuronal puede iniciarse en cultivos en monocapa o mediante la formación de CEs (113–115). Un factor determinante para inducir la diferenciación de las CTEs a CTNs es el ácido retinoico (113,116), las células diferenciadas posteriormente continúan en cultivo que comprende varias etapas en las cuales se incluyen los morfógenos propios del linaje neuronal que se busque reproducir, un ejemplo es el protocolo de cinco pasos que consiste en iniciar con la expansión de las CTEs para así continuar con la formación de CEs, después son seleccionadas a las CTNs, posteriormente éstas se expanden con FGF2 y finalmente se especifican utilizando FGF8 y Shh, obteniendo así concretamente neuronas dopaminérgicas mesencefálicas (115). Por lo tanto, se pueden inducir *in vitro* diversos fenotipos neuronales completamente diferenciados al agregar los factores particulares de las regiones del cerebro embrionario que especifican a las subpoblaciones neuronales *in vivo*.

En otras aproximaciones *in vitro*, se ha analizado la diferenciación de las CTEs *in situ* empleando explantes de cerebro para analizar el potencial de diferenciación celular en función de los factores presentes en el microambiente.

En un estudio se observó la diferenciación al linaje neuronal y glial de CTEs implantadas en rebanadas de hipocampo de rata adulta, además, las células migraron y establecieron conexiones sinápticas en el giro dentado (117).

Además se ha demostrado que las CE derivadas de CTEs de la línea R1B5 no comprometidas al linaje neural, poseen un elevado potencial de diferenciación neuronal sitio-específica al ser implantadas en explantes de mesencéfalo embrionario de ratón; aproximadamente el 40% de las células diferenció al fenotipo dopaminérgico, esto ocurrió en las células integradas a la línea media del mesencéfalo ventral, el cual es el microambiente inductor de dicho fenotipo, por lo tanto la diferenciación se produjo en respuesta a las señales inductoras del tejido huésped (118).

*-In vivo.* Para identificar el potencial de diferenciación de las CTEs se han realizado trasplantes en cerebro *in vivo*, en distintas etapas del desarrollo.

En el trasplante intrauterino de CTNs derivadas de CTEs a embriones de rata en los ventrículos de la vesícula telencefálica se observó la integración y diferenciación glial y neuronal de las CTNs al revisar el trasplante en etapa postnatal, las células se distribuyeron incluso a las regiones diencefálica y mesencefálica del cerebro (119); aunque exhibieron integración sináptica, no adquirieron la identidad posicional del sitio de trasplante (120).

Asimismo, CTNs derivadas de CTEs humanas trasplantadas en la ZSV lograron migrar a través de la VRM y diferenciarse en neuronas y glía en el BO, sin embargo, no se determinó el fenotipo neuronal específico adquirido (121).

En ratas adultas con lesión en la SNc fueron trasplantadas en baja densidad CTEs indiferenciadas en el estriado denervado, lo cual dio como resultado la diferenciación espontánea de neuronas dopaminérgicas que contribuyeron a la reversión de la asimetría motora propia del modelo de la enfermedad de Parkinson (122).

### **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Las terapias de reemplazo celular han sido concebidas como una alternativa promisorias para reparar el sistema nervioso dañado. Sin embargo, continúa siendo incierta la fuente celular idónea para restaurar los circuitos afectados.

Las CTEs se han perfilado como un recurso celular prometedor, debido a sus diversas propiedades intrínsecas y a su amplia capacidad para diferenciarse a fenotipos neuronales específicos.

Las células derivadas de CEs han mostrado ser competentes para diferenciarse al linaje neuronal en explantes *in vitro* mostrando identidad posicional, no obstante, en trasplantes en el cerebro adulto no se ha definido si la diferenciación neuronal es influida por los factores presentes en el microambiente, o si es resultado de un mecanismo celular predeterminado.

La viabilidad del trasplante no solo dependerá del tipo de células administradas y su grado de diferenciación, sino también de los factores propios del cerebro.



## **HIPÓTESIS**

Las células derivadas de CEs detectan condiciones permisivas o inductivas de los microambientes en el cerebro postnatal para diferenciar al fenotipo neuronal *in situ*.

## **OBJETIVOS**

### **General**

Determinar el potencial de diferenciación al linaje neuronal de las células derivadas de CEs trasplantadas en cerebro postnatal de rata.

### **Específicos**

-Identificar si las condiciones del nicho neurogénico de la ZSV-VRM-BO permiten o promueven la diferenciación neuronal de las células de CEs.

-Comprobar si las condiciones presentes en el estriado, un núcleo sin actividad neurogénica, permiten o promueven la diferenciación neuronal de las células de CEs.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Cultivo de células troncales embrionarias y formación de cuerpos embrioides.**

En este trabajo se utilizó la línea de CTE de ratón R1B5 que expresa constitutivamente la proteína verde fluorescente (GFP) (donada por Andras Nagy). Las células fueron amplificadas sobre una monocapa nodriza de fibroblastos (línea STO) en cajas de 6 cm (Corning) con medio para CTEs (M15) compuesto por DMEM (Dulbecco's modified Eagle medium, Gibco) suplementado al 15% con suero fetal bovino, 1% de Piruvato de sodio, 1% de Aminoácidos no esenciales, 1% de Glutamax/Penicilina/Estreptomina y  $\beta$ -Mercaptoetanol (todos de Sigma). Posteriormente, las células se disociaron con tripsina al 0.25% (Gibco) y se sembraron en cajas de 10 cm (Corning) cubiertos con gelatina, se mantuvieron con medio M15 suplementado con albúmina sérica bovina (Sigma) y 1000 U/ml de factor inhibidor de leucemia (LIF; Chemicon) durante 3 días con la finalidad de amplificar las células R1B5 manteniendo su pluripotencia. Para formar los CE,  $2 \times 10^6$  CTEs fueron sembradas en placas de cultivo bacteriológico no adherentes de 10 cm (Corning, Fisher Scientific) para facilitar la agregación de las células en flotación y se cultivaron durante 3.5 días en ausencia de LIF.

### **Preparación de células de CE para trasplante.**

Los CE al día 3.5 se lavaron con medio M15 y para su disociación se incubaron en 1 ml de tripsina al 0.25% durante 15 min. La tripsina fue inactivada con 4 ml de medio M15 y los CE se disgregaron mecánicamente para asegurar la dispersión de las células, a continuación, se centrifugó la suspensión a 1000 rpm durante

3 minutos, se retiró el sobrenadante y el pellet de células fue resuspendido en 50  $\mu$ l de medio Optimem (Gibco), posteriormente se realizaron los conteos celulares en cámara de Neubauer (Sigma) utilizando azul de tripano (Sigma) calculando así el volumen final de medio requerido para obtener una dilución de  $\approx 150,000$  células/1  $\mu$ l. La suspensión celular se mantuvo en hielo y a resguardo de la luz para fomentar su viabilidad.

### **Animales**

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar al día 24 postnatal (recién destetados) y adultos de 250 g. Los animales fueron mantenidos en un ciclo 12:12 luz/obscuridad con una temperatura controlada de  $22 \pm 1$  °C con acceso a alimento y agua *ad libitum*. Todos los estudios se realizaron de acuerdo a los principios y especificaciones técnicas para el cuidado y uso de animales de laboratorio aprobados por el comité de Bioética local de la UNAM y detallados en la NOM 002-Z00-1999.

### **Definición de coordenadas estereotáxicas en cerebro postnatal de rata.**

Fue necesario estandarizar las coordenadas estereotáxicas de la región VRM-Ctx y el estriado en los animales de 24 días, debido a que los Atlas del cerebro de rata están referidos a animales adultos. Tomando como referencia el punto anatómico Bregma, las coordenadas resultantes para la región VRM-Ctx fueron: +1.8 anterior-posterior (AP), +1.1 lateral (L), -3.5 dorsoventral (DV), mientras que para el estriado: +1.0 (AP), +3 (L), -5.0 (DV).

### **Cirugía estereotáxica.**

Las ratas fueron anestesiadas vía intraperitoneal utilizando una mezcla de Ketamina y Xilacina (ambas de Pisa Agropecuaria) con una dosis de 10 y 1 mg/kg respectivamente. Posteriormente, las ratas fueron colocadas en el aparato estereotáxico para localizar las coordenadas dependiendo de la zona de trasplante. Ubicado el punto de intersección se perforó el cráneo para alcanzar la zona en cuestión e inyectar  $\approx 1 \mu\text{l}$  de la solución con 150,000 células utilizando una jeringa de 5  $\mu\text{l}$  (Hamilton), el volumen fue depositado de manera gradual manualmente, durante el lapso de 2 minutos, después la jeringa se mantuvo 2 minutos adicionales para evitar la reversión del flujo. Finalmente, la herida fue suturada con hilo nylon (Docol Co., Sharon, MA) y se cubrió con solución de violeta de genciana. Se supervisó la temperatura del animal y se monitoreó su recuperación.

### **Oclusión transitoria de la arteria media cerebral**

Los animales adultos fueron anestesiados con Xilacina (8 mg/kg) y Ketamina (100 mg/kg) (Pisa Agropecuaria). Para inducir la isquemia se realizó una incisión en el cuello y posteriormente, las arterias carótida común, externa e interna fueron expuestas. La carótida externa, la arteria occipital y la arteria pterigopalatino izquierdas se cauterizaron. Después, un monofilamento de nylon 4-0 con silicón (Docol Co.) se introdujo cuidadosamente a través de la arteria carótida externa izquierda hacia el lumen de la arteria carótida interna hasta que se alcanzó y se logró la oclusión de la arteria media cerebral (OAMC).

Un clip quirúrgico (Fine Science Tools) fue colocado en la parte inferior de la arteria carótida interna en el momento de la oclusión. Después de 90 minutos el monofilamento fue retirado de la arteria carótida interna y la herida cerrada.

### **Fijación de tejidos**

Los animales fueron sacrificados a los 6, 15 ó 21 dpt mediante perfusión intracardiaca. Inicialmente, los animales recibieron anestesia intraperitoneal con una dosis letal de Pentobarbital (Pisa Lab). Se eliminó la sangre del sistema vascular utilizando una bomba peristáltica que introdujo vía intracardiaca 100 ml de Solución Buffer de Fosfatos (PBS) preparada con  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0.115%,  $\text{K}_2\text{PO}_4$  0.002%, NaCl 0.8%, KCl 0.002% (todos de J. T. Baker) a un pH de 7.4. Para fijar los tejidos se perfundieron 100 ml de Paraformaldehído al 4%. Se extrajeron los cerebros y se almacenaron a 4°C en PFA durante 24 horas para posteriormente postfijarlos mediante deshidratación en solución de Sacarosa (J.T Baker) en gradiente al 10%, 20% y 30% por 24 horas respectivamente.

### **Corte de cerebros**

Los cerebros postfijados fueron embebidos en solución OCT (Fisher Scientific) y se congelaron en hielo seco para su montaje y corte en criostato (Leica CM1900), obteniendo rebanadas de 30-40  $\mu\text{m}$  en plano sagital para el análisis de la coordenada VRM-Ctx y en plano coronal para el caso de la coordenada del estriado. Las secciones se colectaron en cajas de 96 pozos (una sección en cada pozo con la finalidad de mantener el orden secuencial del área del trasplante) y se mantuvieron inmersas en solución criopreservadora compuesta de PBS 50%,

Etilenglicol 25% y Diacilglicerol 25% (ambos de J.T. Baker), por lo cual podían mantenerse almacenadas a -20°C asegurando una eficiente y prolongada preservación.

### **Procesamiento de cuerpos embrioides**

Los CEs fueron procesados para analizar su configuración estructural y grado de diferenciación. Se colectaron de los platos de cultivo a los 3.5 días (simultáneamente y de los mismos lotes de CEs que se trataron para trasplante), fueron depositados en tubos Falcon de 50 ml y se precipitaron al fondo del mismo por gravedad, se retiró el medio de cultivo M15 y se enjuagaron con PBS para después agregar 5 ml de PFA 4% y mantenerlos en suspensión durante 10 min, posteriormente se lavaron 2 veces con PBS y se postfijaron con 5 ml de solución de sacarosa al 30% manteniéndolos a 4°C durante toda la noche. Para realizar los cortes, se eliminó la sacarosa manteniendo precipitados en el fondo del tubo a los CEs, se añadió OCT (Sakura Finetek) en cantidad suficiente para promover la resuspensión de los mismos, la mezcla se congeló con hielo seco para así rebanar en secciones de 30 µm que incluían un gran número de CEs.

### **Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa en tiempo real**

El Ácido ribonucleico (RNA) total fue extraído de los CEs con TRIzol (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. EL ARN purificado se usó como molde para la síntesis de Ácido desoxirribonucleico complementario (cDNA) usando la transcriptasa reversa AMV (Invitrogen) y el cebador oligo-dT<sub>16</sub>. La reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa (RT-PCR) cuantitativa fue

realizada con KAPA SYBR FAST kit (KAPA Biosystems) utilizando el termociclador Rotor-Gene 3000 (Corbett Research, Qiagen). Para evaluar la expresión génica se empleó el método comparativo  $C_t$  ( $\Delta\Delta C_t$ ). Los oligonucleótidos empleados se enlistan en la tabla 1.

GEN	SECUENCIA SENTIDO	SECUENCIA ANTISENTIDO
Dcx	CCATGTGTGTGAGGTGTTGTGAA	TCGATGGAGAACAGAGCTTGAGAG
Fgf4	CGGCTCTACTGCAACGTG	CGGAGAGAGCTCCAGAAGAC
Fgf5	CCTTGCGACCCAGGAGCTTA	CCGTCTGTGGTTTCTGTTGAGG
Gapdh	ACACAGCCGCATCTTCTTGT	CTTGCCGTGGGTAGAGTCAT
GFAP	AGAACAACCTGGCTGCGTATAG	TCTGCAAACCTTAGACCGATACCA
Map2	TTCTTTTGCTTGCTCGGGATT	ATACAGGGCTTGTTTTATTTTCAGAGA
Nanog	CTTACAAGGGTCTGCTACTGAGATGC	TGCTTCCTGGCAAGGACCTT
Ncam	CCGCGGCCAGAACATCCCTC	CGGCATCGTCGATGTTGGCG
Nestina	TGAGAACTCTCGCTTGACAGACAC	GGTCCTCTGGTATCCCAAGGAAATG
NeuN	CCTCTCGCGCCCCTTG	AGCACTAGGTTCTCACAGGC
Oct4	CACGAGTGGAAGCAACTCA	AGATGGTGGTCTGGCTGAAC
Pax6	GACTGCCAGCTTCCATCCA	AGTCTTCTGCCAAGAGCTGG
Sox1	GGCCGAGTGAAGGTCATGT	TCCGGGTGTTCCATCATGTG
Sox2	CATGAGAGCAAGTACTGGCAAG	CCAACGATATCAACCTGCATGG
Sox3	AGCGCCTGGACACGTACAC	ATGTCGTAGCGGTGCATCT
Sox9	CGACTACGCTGACCATCAGA	AGACTGGTTGTTCCAGTGC
Zfx1b	GGAGGAGCTAAGGGAGAGTGT	CATTTCTTCTGGACCGGCTAC
$\beta$ -III.Tubulina	ATCAGCAAGGTGCGTGAGGAG	ATGGACAGGGTGGCGTTGTAG

**Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados en la RT-PCR en tiempo real.**

## Inmunofluorescencia

Para iniciar el protocolo de inmunofluorescencia, las secciones de cerebro se lavaron durante 10 minutos en PBS para eliminar residuos de solución criopreservadora en la que se habían almacenado, posteriormente se lavaron tres veces en PBT (PBS + 0.3% de Tritón X-100 (Sigma)) y se incubaron a 65 °C durante 30 min en buffer recuperador de antígenos 1X con citrato (Bio SB), después se mantuvieron durante 15 min en la misma solución a temperatura ambiente, a continuación se lavaron tres veces con PBT y se incubaron en solución de bloqueo compuesta por PBT, 0.3% de suero de burro (Gibco) y 0.3% de albúmina sérica bovina (Sigma) durante una noche a 4 °C con los anticuerpos primarios correspondientes, enlistados en la tabla 2.

ANTICUERPO 1°	ESPECIE	DILUCIÓN	MARCA
Calbindina	Ratón	1:200	Swan
Calretinina	Conejo	1:200	Swan
DCX	Cabra	1:500	Santa Cruz
FGF5	Conejo	1:100	Santa Cruz
HH3F	Conejo	1:100	Cell Signalling Technology
5HT	Conejo	1:100	Peninsula Laboratories
GAD67	Ratón	1:100	Abcam
GFAP	Ratón	1:2000	Millipore
Oct4	Ratón	1:100	BD Biosciences
NeuN	Ratón	1:200	Chemicon
Pax6	Conejo	1:200	Covance
PanDix	Conejo	1:50	Pasko Rakic, Univ. Yale
Sox1	Cabra	1:200	Santa Cruz
TH	Conejo	1:2000	Chemicon

**Tabla 2. Anticuerpos primarios utilizados en los protocolos de inmunofluorescencia.**



Posteriormente, los cortes se enjuagaron 3 veces durante diez minutos con PBS para proceder a incubar durante 2 horas a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario de burro correspondiente diluido en PBS 1:500: IgG anti-ratón acoplado a AlexaFluor 555, IgGs anti-cabra acoplado a AlexaFluor 555 (ambos de Invitrogen) e IgGs anti-conejo acoplado a DyLight 549 (Jackson ImmunoResearch). Al terminar la incubación con el anticuerpo secundario, las rebanadas se lavaron 2 veces durante 10 min con PBS y para teñir los núcleos celulares se empleó el marcador DRAQ5 (1:5000; Biostatus Limited). Finalmente, los cortes fueron montados en laminillas Superfrost (Fisher Scientific) con medio de montaje para fluorescencia (Dako, Agilent).

### **Análisis de integridad de tejido-trasplante**

Se utilizaron cortes de las coordenadas VRM y Estriado en cada una de las etapas post-trasplante para comprobar su integridad. Se realizó la tinción estándar de Hematoxilina-Eosina para comprobar la respuesta inflamatoria provocada por las células de CEs trasplantadas o a causa de daño mecánico.

Asimismo, se analizó la viabilidad de las células trasplantadas utilizando el Kit de detección de muerte celular *In situ* (prueba de TUNEL) acoplado a fluoresceína TMR-red (Roche). Complementariamente se examinó la proliferación de las células de CEs mediante inmunofluorescencia utilizando el marcador de la histona H3 fosforilada (Cell signalling technology).

## **Microscopía y conteo celular**

Los cortes de los cerebros con trasplante de células de CEs se analizaron uno a uno bajo el microscopio de epifluorescencia Leica DM6000 para comprobar la presencia de células GFP+. Las imágenes de las preparaciones fueron adquiridas en los microscopios confocales Olympus FV1000 o Zeiss LSM 510 y digitalizadas con los softwares Olympus Viewer y Start LSM Image Browser, respectivamente. Para realizar el conteo celular se consideraron tres imágenes del trasplante adquiridas bajo el objetivo de 40X en apilado en el eje Z. Se utilizó un corte de cerebro según la condición y sitio de trasplante para determinar la expresión de cada marcador de diferenciación. Las células GFP+/marcador de diferenciación+/DRAQ5+ fueron contabilizadas manualmente utilizando el software para análisis de imagen ImageJ o directamente en el software del correspondiente microscopio confocal empleado. Los datos del conteo son presentados como el promedio del porcentaje  $\pm$  SD.

## RESULTADOS

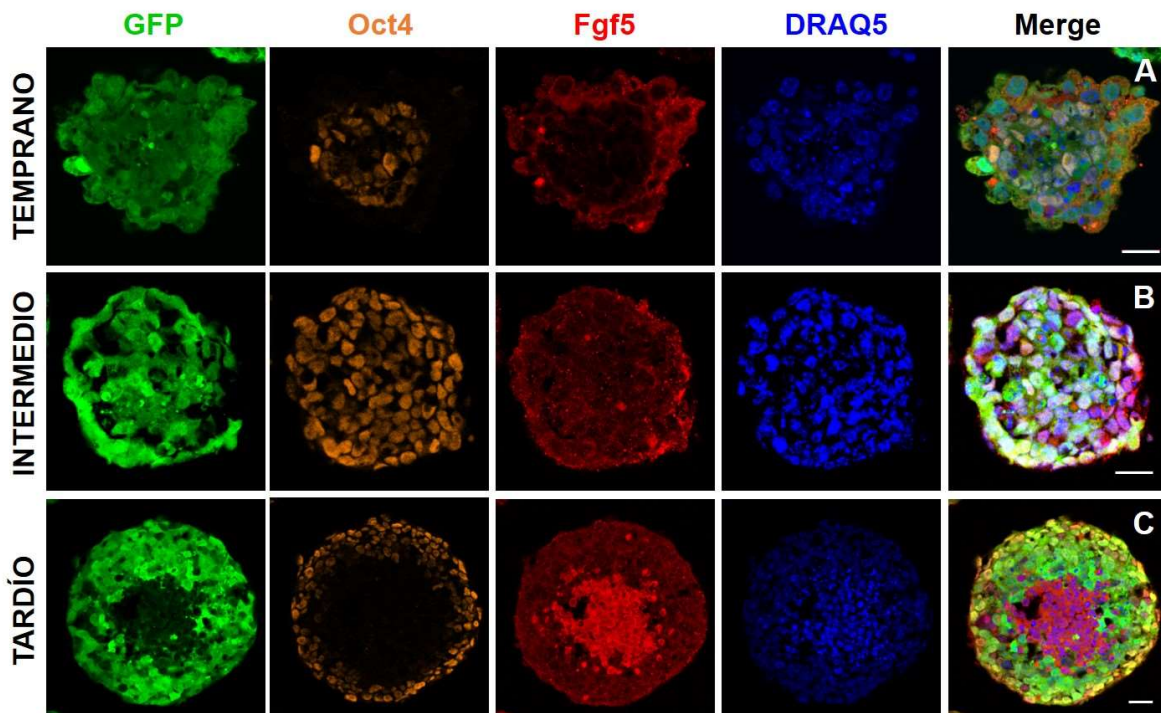
### Caracterización de los CEs.

Los CEs utilizados en todos los experimentos se obtuvieron a partir del cultivo de las CTEs R1B5 durante 3.5 días en libre flotación con privación de LIF.

Se analizó la presencia del factor clave para la pluripotencia Oct4, localizado en el núcleo celular y del marcador de células epiblasticas Fgf5, propio de la membrana plasmática. Considerando la distribución de las células expresando dichos factores de transcripción, los CEs se clasificaron en los subtipos temprano, intermedio y tardío.

Los CEs del subtipo temprano, se caracterizaron por su configuración como agregados pequeños, no tan esféricos, integrados principalmente por células Oct4+ y la formación inicial de una capa periférica de células Oct4-/Fgf5+, análoga al endodermo visceral. Aproximadamente el 16% de los CEs mostró estas características (Fig. 14A). Por su parte, los CEs del subtipo intermedio se constituyeron principalmente por CTEs Oct4+/Fgf5+, indicadoras de la identidad epiblastica, organizadas en una sección compacta (Fig. 14B), la mayoría de los CEs disgregados para los trasplantes, alrededor del 74%, perteneció a esta categoría.

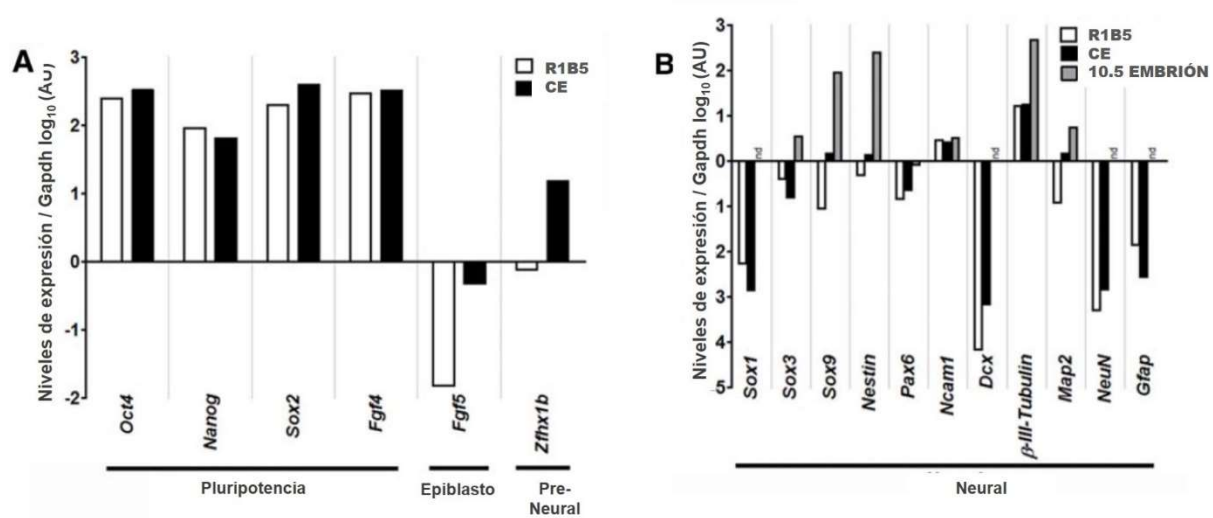
El subtipo tardío fue conformado por aproximadamente el 10% de los CEs, los cuales se caracterizaron por tener un tamaño mayor y por concentrar en la región interna un grupo de células apoptóticas precursoras de cavitación, asimismo mantuvieron en la periferia de dicho núcleo varias capas celulares con la expresión de Oct4+/Fgf5+ que corresponden a la integración del epitelio ectodérmico (Fig. 14C).



**Figura 14. Clasificación de CEs según la distribución de células expresando los factores Oct4 y Fgf5.** (A-C) Los CEs se obtuvieron a partir de cultivos de CTEs en flotación en ausencia de LIF a los 3.5 días. (A) El subtipo temprano incluyó agregados celulares pequeños constituidos mayormente por CTEs Oct4+ y por una capa de células equivalentes al endodermo visceral Oct4-/Fgf5+. (B) La categoría de intermedios resultó la más abundante y dichos CEs se integraron por células Oct4+/Fgf5+, de naturaleza epiblastica. (C) El grupo de CEs tardíos se distinguieron por la fase inicial de una cavitación central representada por la agrupación de células apoptóticas en la región interna y por capas celulares en la periferia Oct4+/Fgf5+, precursoras del epitelio ectodérmico. Las células apoptóticas mostraron núcleo condensado, corroborado por la tinción con DRAQ5, mientras que la aparente señal del Fgf5 parece ser un artefacto producido por tal condensación. Barras de escala 20µm.

Mediante el análisis de RT-PCR en tiempo real se determinó que las células de CEs expresaron más de 30 veces el nivel de Fgf5 en comparación con las CTEs (Fig. 15A). Se detectaron bajos niveles de marcadores de diferenciación neural tanto en CTEs como en CEs (Fig. 15B).

La expresión del factor *Zfhx1b*, que promueve la neuralización, se incrementó alrededor de 20 veces en los CEs en comparación con las CTEs (123) (Fig. 15A). Sin embargo, las células cultivadas en medio neural sin factores de crecimiento no diferencian al fenotipo neural.



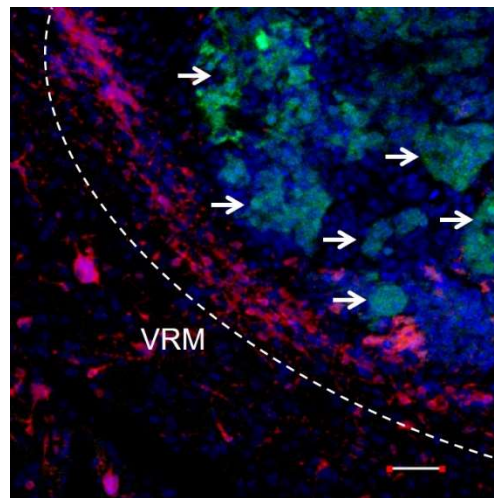
**Figura 15. Expresión de genes de pluripotencia y neurales.** (A) Niveles de expresión de genes de pluripotencia, epiblasto y pre-neuralización; así como genes neurales (B) relativos al nivel de expresión del gen constitutivo *Gapdh* en CTEs R1B5 y en las células CE. En algunos casos, los niveles de expresión en el mesencéfalo ventral (día embrionario de ratón 10.5) fueron determinados (columnas grises E10.5 vMb). Cabe señalar que los genes neuronales ( $\beta$ -III-Tubulina, *Map2*) resultaron bajos debido a que la neurogénesis está iniciando en esta fase del desarrollo.

## Diferenciación al linaje neural de células derivadas de CEs en la coordenada VRM-Corteza del cerebro postnatal.

### *Primera etapa, 6 días post-trasplante*

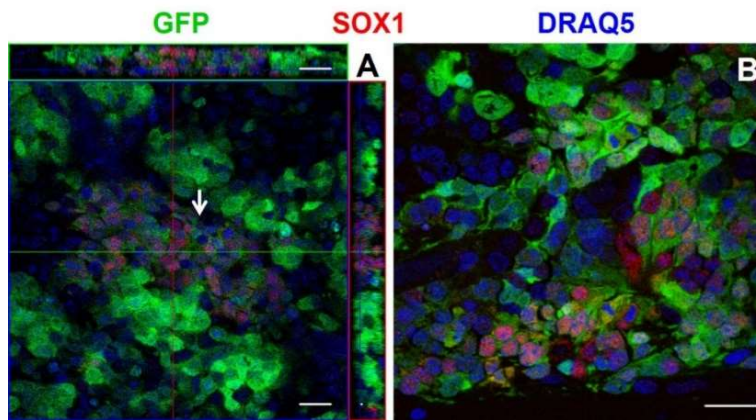
Con la finalidad de determinar si el cerebro postnatal de rata representaba un ambiente favorable para promover la diferenciación neuronal, se trasplantaron células derivadas CEs sin compromiso neural.

Se analizó la sobrevivencia y diferenciación del trasplante de las células de CEs en una fase inicial, a los 6 días post-trasplante (dpt) (n=6). En esta etapa se observó una sobrevivencia importante. La mayoría de las células trasplantadas se mantuvieron formando agregados y presentaron morfología esférica lo cual representa una característica típica de las células indiferenciadas (Fig. 16).



**Fig. 16. Células de CEs trasplantadas en la coordenada VRM-Ctx a los 6 dpt.** Las flechas señalan cúmulos de células trasplantadas GFP+ (verde), el trasplante está asentado en la VRM marcada con DCX (rojo). Barra de escala 100  $\mu$ m.

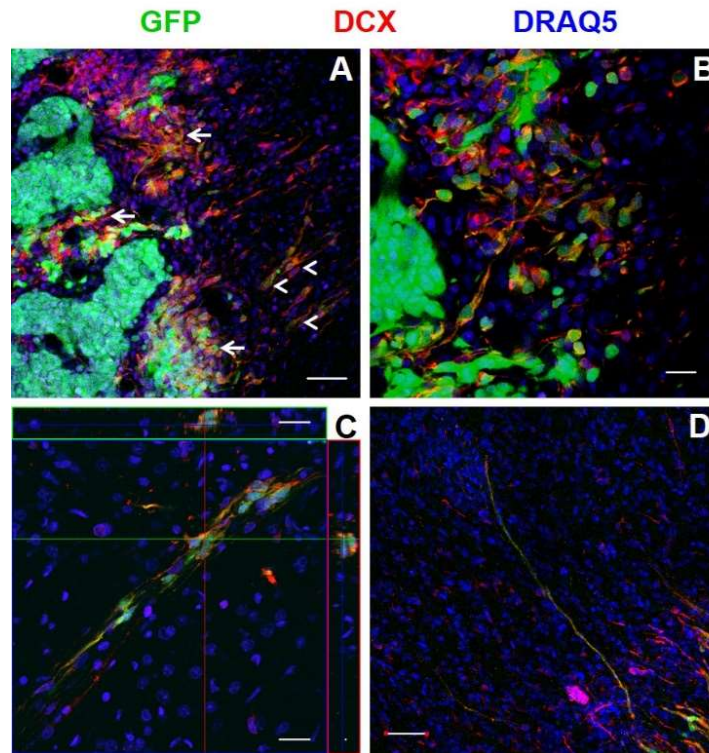
Al comprobar la diferenciación al linaje neural se distinguieron agrupaciones de células expresando Sox1, aproximadamente el 50% (Fig. 17A). La determinación de esta proporción únicamente se estimó de manera indirecta debido a que el conteo resultó de difícil acceso a causa de la agregación de las células (Fig. 17B), el marcaje positivo para este factor indicó que las células trasplantadas se encaminaron hacia el linaje neural en un corto plazo.



**Figura 17. Expresión de Sox1 en las células de CEs trasplantadas en la coordenada VRM-Ctx a los 6 dpt.** (A) Imagen ortogonal de un cúmulo de células con marcaje positivo, señalado por la flecha, el conjunto se encuentra muy agregado y rodeado por otros grupos de células de CEs sin diferenciar cuya morfología es mayormente redondeada. (B) Las células positivas para SOX1 si bien se notan muy unidas la morfología es poligonal. Barra de escala 20  $\mu$ m en ambas micrografías.

Respecto al marcador DCX, proteína asociada a microtúbulos y exclusiva de los neuroblastos migrantes, se observó un número reducido de células positivas que se ubicaron particularmente en la periferia del trasplante (Fig. 18A), probablemente, al encontrarse menos confinadas y en contacto directo con el microambiente del huésped se fomentó su rápida diferenciación a neuroblasto (Fig. 18B).

Se encontró incluso que algunas células se desplazaron fuera del sitio del trasplante (Fig. 18C) y se distinguió el desarrollo de extensiones importantes/considerables (Fig. 18C y 18D).



**Figura 18. Expresión de DCX en células de CEs trasplantadas en la coordenada VRM-Ctz a los 6 dpt.** (A) Grupos celulares positivos al marcaje con DCX se encontraron en la periferia del trasplante (flechas), células migrando (cabezas de flecha). (B) Células GFP+ y DCX positivas se notan menos agregadas, coincidiendo su morfología con la de los neuroblastos migrantes. (C) Proyección ortogonal de un grupo de células que se desplazó fuera del sitio del trasplante. (D) En este caso la proyección de la célula fue muy extensa, 370  $\mu\text{m}$  de longitud. Barra de escala A y D 50  $\mu\text{m}$ , B y C 20  $\mu\text{m}$ .

En esta etapa, no se detectó marcaje positivo para otros marcadores neurales, como el marcador de neuronas maduras NeuN o el de células gliales GFAP, por lo tanto, las células que lograron diferenciarse se encontraban en una etapa neuronal inmadura.



*Segunda etapa, 15 días post-trasplante.*

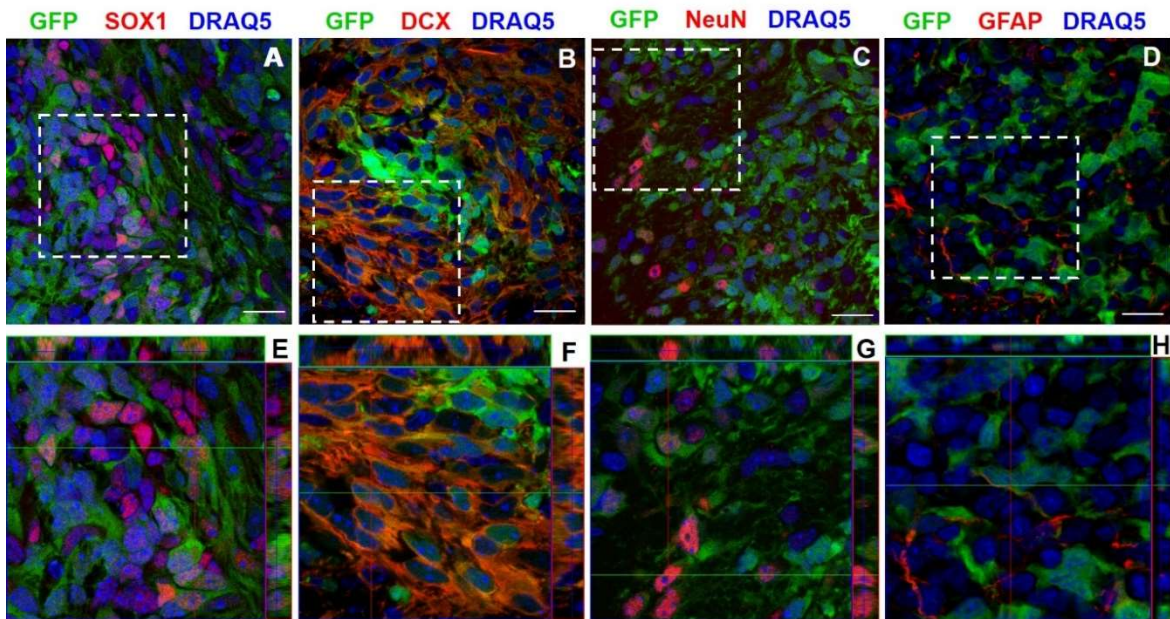
A los 15 dpt (n=6), las células de CEs se encontraron más diseminadas dentro del área del trasplante y la mayoría presentó desarrollo de prolongaciones. Otra característica observada de manera recurrente fue la disminución de la intensidad de la GFP en las células trasplantadas que coexpresaron los marcadores neurales, es decir, este efecto en la expresión de GFP se evidenció mientras progresó la diferenciación.

La proporción del marcador de diferenciación neural temprano Sox1 disminuyó al  $26.56 \pm 5.22\%$ , por lo tanto, la distribución de las células con diferenciación temprana ocurrió de manera no generalizada en el trasplante (Fig. 19A y E).

Por el contrario, la proporción de células con identidad de neuroblasto DCX+ se incrementó considerablemente,  $59.55 \pm 12.22\%$  (Fig. 19B y F).

Adicionalmente, una importante proporción, el  $33.92 \pm 4.89\%$  alcanzó el fenotipo de neurona madura, demostrado por la expresión del marcador del núcleo neuronal NeuN (Fig. 19C y G).

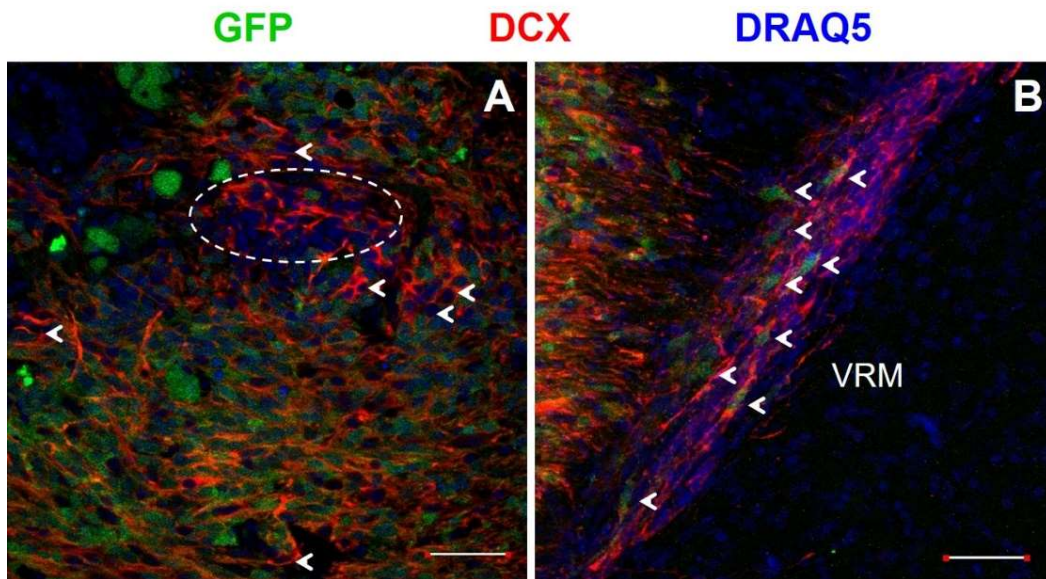
Al examinar si las células trasplantadas se habían diferenciado al fenotipo glial, se comprobó que únicamente pocas células aisladas presentaban la expresión del marcador GFAP (Fig. 19D y H).



**Figura 19. Expresión de marcadores de diferenciación neural en células de CEs trasplantadas en la coordenada VRM-Ctx a los 15 dpt.** (A) Región del trasplante de células de CEs con expresión del marcador neural temprano Sox1. (B) Una importante proporción de células trasplantadas resultaron con marcaje positivo para el marcador de neuroblastos DCX. (C) Expresión del marcador de núcleos neuronales NeuN, lo cual indica que las células de CEs alcanzaron la madurez neuronal. (D) La prácticamente nula expresión de la GFAP demuestra que las células trasplantadas no adquirieron el linaje glial durante esta etapa. Los recuadros en A, B, C y D representan el área comprendida en las proyecciones ortogonales emplazadas al pie de cada micrografía, es decir E, F, G y H respectivamente. Barras de escala 20  $\mu$ m.

Estos resultados indican que los 15 dpt significaron un lapso suficiente para que una alta proporción de las células de CEs trasplantadas se comprometieran al fenotipo neuronal, presentando los marcadores propios de la fase de neurona inmadura (SOX1+ y DCX+) para continuar en transición hacia la diferenciación terminal e incluso alcanzar la madurez (NeuN+).

Otra característica recurrente fue la presencia de células GFP-/DCX+ esparcidas a través del área de trasplante, es probable que estas células procedieran de la VRM proximal (Fig. 20A). Adicionalmente, algunas células trasplantadas migraron y se integraron a la VRM, incluso se alinearon y orientaron en una disposición similar a los neuroblastos migrantes endógenos (Fig. 20B).



**Figura 20. Expresión de DCX en la región VRM-Ctx a los 15 dpt.** (A) La elipse punteada indica una sección con células GFP-/DCX+, estos neuroblastos también se detectaron distribuidos a través del resto del área del trasplante, indicados por flechas. (B) Algunas células de CEs, señaladas por cabezas de flecha, se trasladaron fuera del sitio de trasplante para incorporarse a la VRM, se integraron en la misma dirección que los neuroblastos endógenos. Barras de escala 50  $\mu$ m.

*Tercera etapa, 21 días post-trasplante.*

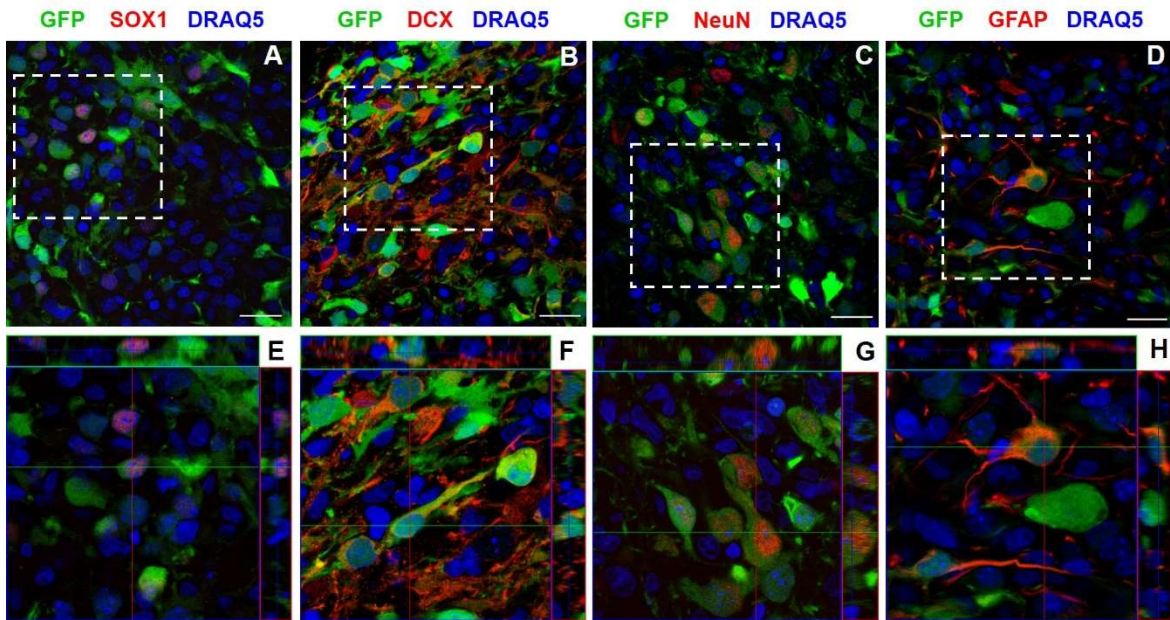
En la etapa de 21 dpt (n=6), el porcentaje de células de CEs Sox1+ osciló en un  $25.76 \pm 5.94\%$  (Fig. 21A y E), mientras que las DCX+ representaron un  $52.82 \pm 11.85\%$  (Fig. 21B y F), estas proporciones resultaron similares a las observadas a los 15 dpt para ambos marcadores, sin embargo, la proporción de células NeuN+ se incrementó, resultando en un  $44.73 \pm 9.98\%$  (Fig. 21C y G).

Adicionalmente, a los 15 dpt la presencia de astrocitos identificados por el marcaje con GFAP fue prácticamente nula, mientras que una semana después la proporción ascendió al  $12.48 \pm 11.42\%$  (evidente solo en dos animales) (Fig. 21D y H).

La mayoría de las células desplegaron extensiones, contrastando con las etapas tempranas del trasplante donde las células exhibían morfología redondeada, además, la agregación de estas se redujo considerablemente.

Dado que las células Sox1+ y NeuN+ conforman poblaciones excluyentes, se estimó que alrededor del 70% de las células de CEs trasplantadas se diferenciaron al linaje neuronal *in situ*.

Estos resultados indican que la región VRM-Ctx significó un microambiente permisivo para la diferenciación neural, cabe enfatizar que el linaje neuronal resultó predominante y la mayoría de las células alcanzaron la etapa postmitótica.



**Figura 21. Expresión de marcadores de diferenciación neural en células de CEs trasplantadas en la coordenada VRM-Ctx a los 21 dpt.** (A) Sitio del trasplante de células de CEs con expresión del marcador neural temprano Sox1. (B) La elevada proporción de células trasplantadas con señal positiva para el marcador de neuroblastos DCX fue similar a la observada en la etapa de 15 dpt. (C) La proporción de células de CEs positivas para el marcador de núcleos neuronales NeuN se incrementó, por lo tanto, en esta fase la madurez neuronal se notó más robusta. (D) La expresión de la GFAP se distinguió solo hasta esta etapa del trasplante, lo cual indica que el linaje glial fue exhibido tardíamente. Los recuadros en A, B, C y D representan el área comprendida en las proyecciones ortogonales dispuestas al pie de cada micrografía, es decir E, F, G y H respectivamente. Barras de escala 20  $\mu\text{m}$ .

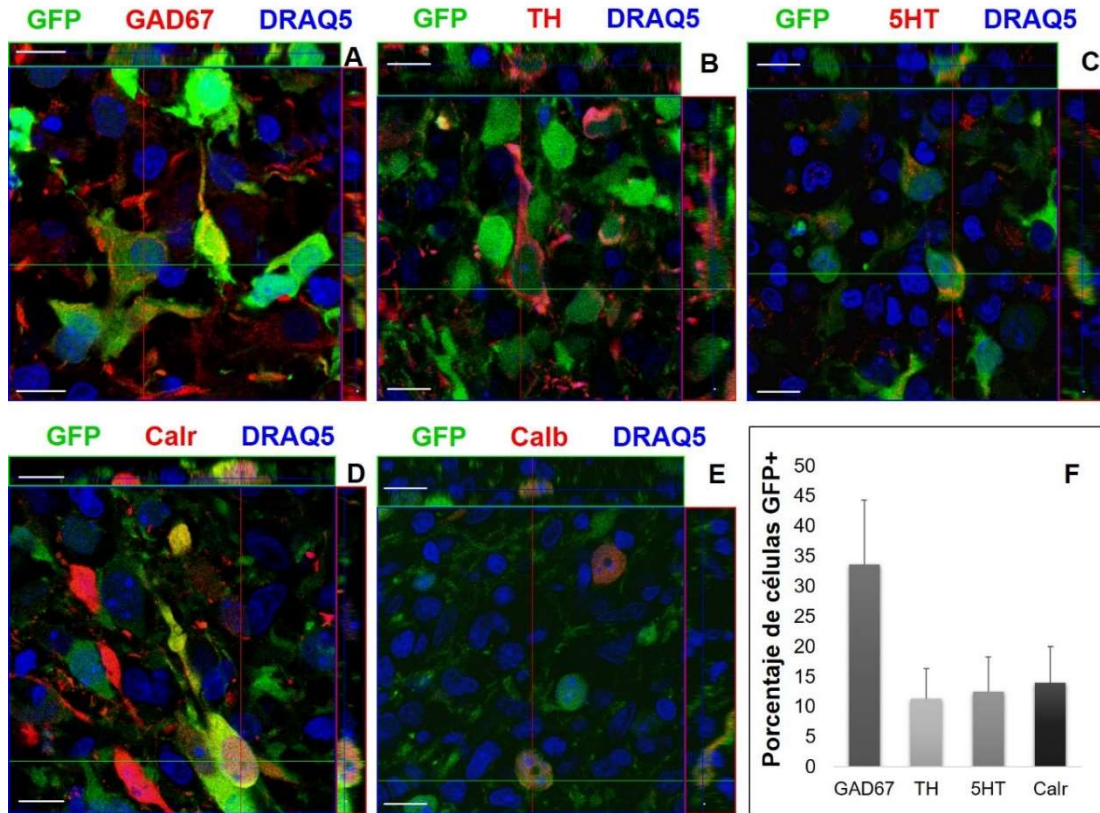
## **Identificación del fenotipo neuronal del trasplante en la región VRM-Ctx**

Como ya se mencionó, se encontró que al menos el 40% de las células de CEs diferenció al linaje neuronal a los 21 dpt, de tal modo resultaba necesario identificar el fenotipo específico.

Era prioritario determinar si ese fenotipo correspondía al que se origina intrínsecamente en el sistema VL-VRM-BO y que es representado en las poblaciones de la capa glomerular del BO con identidad GABAérgica y con coexpresión dopaminérgica e identificadas por la presencia de las enzimas GAD67 y TH respectivamente, además de las subpoblaciones que sintetizan las proteínas de unión a Calcio, Calr y Calb.

Se determinó que, en los trasplantes de CEs, el  $33.71 \pm 10.6\%$  resultó GAD67+ (Fig. 22A y F) y el  $11.41 \pm 4.99\%$  correspondió al marcaje con TH (Fig. 22B y F). Adicionalmente, el  $12.48 \pm 5.8\%$  resultó 5HT+, es decir, de naturaleza serotonérgica (Fig. 22C y F), un  $14.06 \pm 5.8\%$  fue Calr+ (Fig. 22D y F) y se distinguió una muy baja proporción de células Calb+, por lo tanto, no se cuantificó (Fig. 22E).

Por lo tanto, las células GFP+ diferenciadas que se contabilizaron se distribuyeron homogéneamente a través de toda el área de trasplante, además, se diferenciaron en distintos fenotipos terminales, es decir, no se limitaron a expresar exclusivamente los marcadores típicos encontrados de manera endógena en la región del trasplante.



**Figura 22. Identificación de los fenotipos neuronales adquiridos por las células CE trasplantadas en la coordenada VRM-Ctx a los 21 dpt.** A-E, Micrografías en proyección ortogonal. (A) Células de CE con expresión del marcador GABAérgico GAD67. (B) Señal positiva para el marcador dopaminérgico TH. (C) Las células trasplantadas diferenciaron también al fenotipo serotoninérgico al resultar 5HT+. Una discreta proporción de células GFP+ resultó positiva al marcaje con las proteínas de unión al Calcio Calr (D) y en menor número a la Calb (E). Cuantificación de las células trasplantadas positivas para los distintos marcadores fenotípicos, las barras de error representan la SD (F). Barras de escala en las micrografías equivalen a 10 μm.

### **Evaluación del linaje interneuronal en la coordenada VRM-Ctx.**

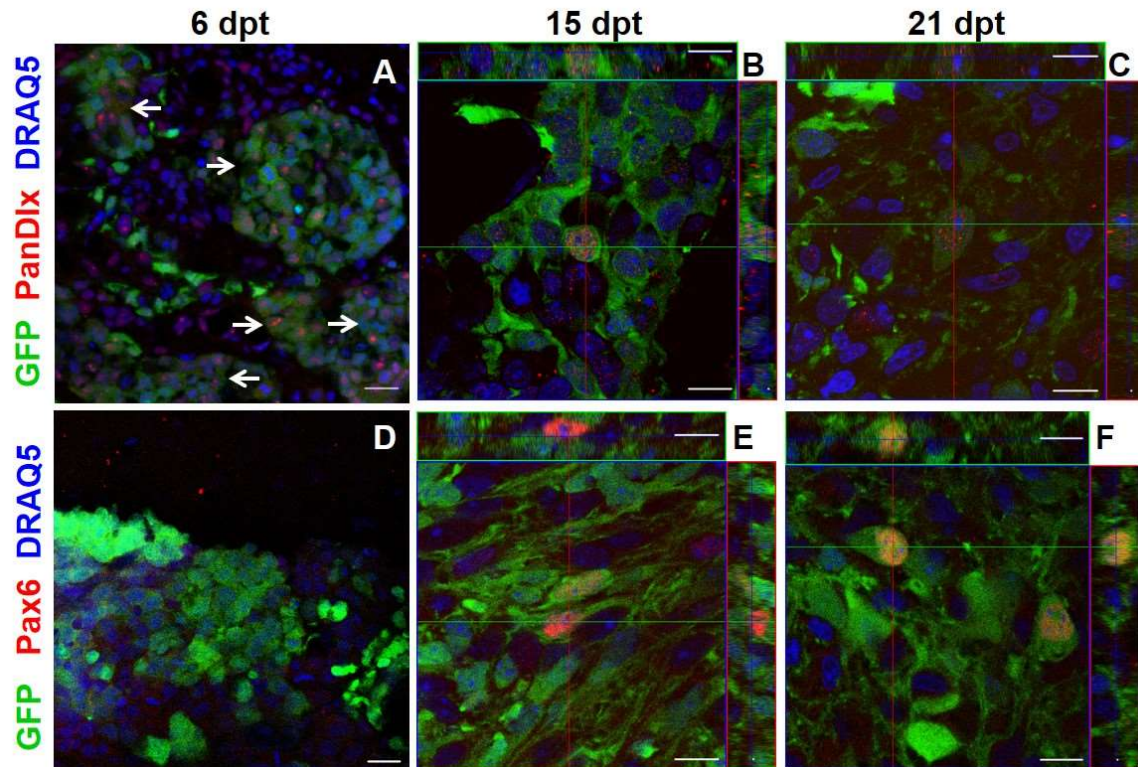
Con la finalidad de establecer si los fenotipos neuronales identificados en las células de CEs trasplantadas correspondían concretamente a los subtipos propios originados en la región del trasplante (VRM), se comprobó la expresión de los factores de transcripción que intervienen en su especificación, es decir, aquellos que se encuentran en los precursores de las interneuronas del BO, tales como Pax6 y Dlx2 que en conjunto son determinantes para adquirir la identidad dopaminérgica. A los 6 dpt, una importante proporción resultó positiva al marcaje de PanDlx (Fig. 23A), mientras que a los 15 y a los 21 dpt únicamente casos aislados fueron detectados para este marcador (Fig. 23B y 23C respectivamente).

Mientras que en el caso de Pax6 las células de CEs positivas fueron muy escasas, no se distinguieron en la etapa de 6 dpt (Fig. 23D) y solo ocasionalmente se encontraron en las fases de 15 y 21 dpt (Fig. 23E y 23F respectivamente).

Lo anterior indica que las células trasplantadas adquirieron predominantemente el fenotipo GABAérgico distinto al originado en la VRM-BO, por lo tanto, la zona de trasplante VRM-Ctx resultó ser permisiva pero no inductiva para la diferenciación neural.

Las células trasplantadas fueron escasamente detectadas en el BO, dificultando así su análisis fenotípico.





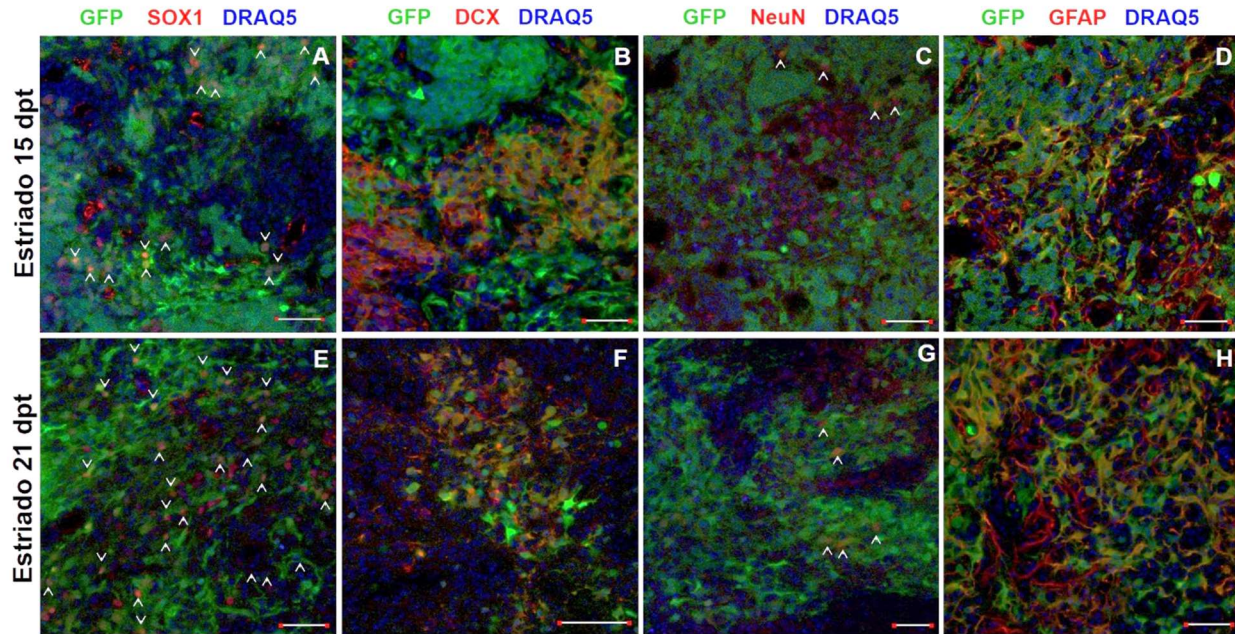
**Figura 23. Identificación de marcadores de especificación de linajes neuronales de la VRM en las células de CE trasplantadas.** (A) Una alta proporción de células GFP+ con expresión del marcador PanDlx a los 6 dpt. Imágenes ortogonales que muestran la progresión en las etapas sucesivas en la cuales disminuyó la expresión de PanDlx a los 15 dpt (B) y 21 dpt (C). La expresión de Pax6 a los 6 dpt no fue detectada (D), posteriormente y de manera aislada se observaron escasas células positivas para tal marcador a los 15 dpt (E) y 21 dpt (F), ambas son proyecciones ortogonales. Barras de escala en las micrografías equivalen a 10  $\mu$ m.

### **Diferenciación del trasplante en el estriado postnatal.**

Se realizó el trasplante de las células de CEs en el estriado postnatal teniendo como objetivo precisar si la tasa y el tipo de diferenciación neural era similar, independientemente del sitio de implante. Teniendo en cuenta que, a diferencia de la región VRM-Ctx, el estriado es un núcleo que no presenta actividad de neurogénesis, por lo tanto, los factores presentes en los microambientes también serían distintos.

A los 6 dpt (n=6) se distinguió sobrevivencia de las células mas no la diferenciación neural. En etapas posteriores, de manera general, se observó que la especificación fue poco uniforme dentro del trasplante y con mucha variabilidad entre cada caso (Tabla 3). A los 15 dpt (n=4) únicamente áreas reducidas dentro del trasplante mostraban en particular la expresión de Sox1 (Fig. 24A) o de DCX (Fig. 24B), sin embargo, NeuN se observó muy escasamente (Fig. 24C), mientras que GFAP apareció más robustamente en parches a través del trasplante (Fig. 24D).

A los 21 dpt (n=4) Las células trasplantadas resultaron positivas a Sox1 y DCX y se observó de nuevo el patrón registrado en la etapa de 15 dpt, es decir, únicamente se encontraron en sitios confinados (Fig. 24E y F respectivamente). Del mismo modo, las células GFP+ con expresión de NeuN resultaron muy escasas (Fig. 24G). Remarcablemente, se distinguió un importante incremento en la expresión de la GFAP, proteína propia de los astrocitos (Fig. 24H), lo cual indicó que en el estriado las células de CEs implantadas diferenciaron mayoritariamente hacia el linaje glial.



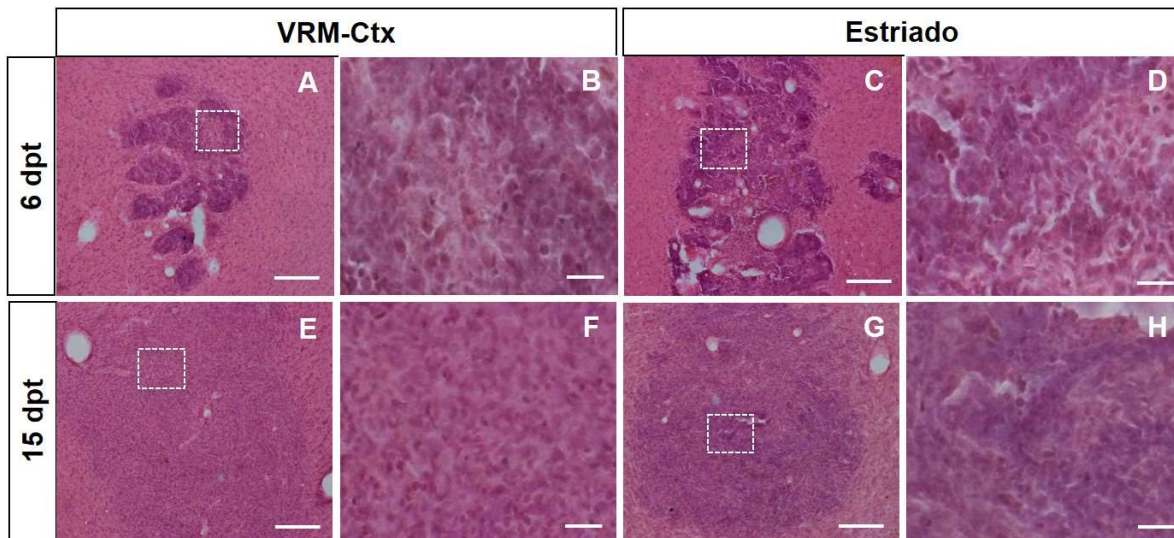
**Figura 24. Expresión de marcadores de diferenciación neural en células de CEs trasplantadas en el estriado a los 15 dpt y 21 dpt.** (A-D) Células de CEs a los 15 dpt. (A) Expresión de Sox1, las células de CEs positivas fueron localizadas en zonas discretas dentro del trasplante, señaladas con puntas de flecha. (B) Marcaje con DCX, las células positivas también se encontraron en parches a lo largo del trasplante, la proporción fue considerable. (C) En el caso de NeuN las células positivas resultaron muy escasas, señaladas con puntas de flecha. (D) Contrastando con lo observado en la coordenada VRM-Ctz la cantidad de células expresando GFAP fue notablemente mayor. (E-H) Células de CEs a los 21 dpt. La proporción y distribución de Sox1 (E), DCX (F) y NeuN (G) se mantuvieron de manera similar a la de los 15 dpt. (G) Se distinguió un aumento de células GFP+ expresando la GFAP. Barras de escala en las micrografías equivalen a 50  $\mu$ m.

MARCADOR	DIFERENCIACIÓN EN ESTRIADO 15 dpt (%)				DIFERENCIACIÓN EN ESTRIADO 21 dpt (%)			
	Rata 1	Rata 2	Rata 3	Rata 4	Rata 1	Rata 2	Rata 3	Rata 4
Sox1	22.04	14.58	12.51	32.38	47.96**	0	9**	32.12
DCX	39.63	27.89	31.05	29.21	29.74	0	46.29	32.87
NeuN	ND	ND	ND	ND	28.31 0	0	22.72**	23.41
GFAP	24.62	28.07	10.01	15.57	52	65.27	7.61	22.62

**Tabla 3. Diferenciación de células de CEs en Estriado postnatal.** El porcentaje es representado por las células positivas al marcador correspondiente; (\*\*) El porcentaje fue determinado en el único parche diferenciado dentro del trasplante; (ND) No determinado, cuando la proporción de células marcadas resultó prácticamente nula.

## Respuesta inflamatoria

Para verificar la presencia de la respuesta inflamatoria inducida por los trasplantes de células derivadas de CEs se realizó la tinción de Hematoxilina-Eosina (H-E), se revisaron ambos sitios de implante en las etapas iniciales. A los 6 dpt en la zona VRM-Ctx (Fig. 25A y B) y estriado (Fig. 25C y D) no se encontraron células propias de infiltración (neutrófilos y monocitos), típicamente observadas en los procesos inflamatorios. Del mismo modo, en el caso de los 15 dpt en las coordenadas VRM-Ctx (Fig. 25E y F) y en estriado (Fig. 25G y H) no se detectaron indicios de inflamación, por el contrario, se distinguió una buena preservación de la citoarquitectura e integración del tejido huésped y las células trasplantadas.



**Figura 25. Tinción de H-E para la detección de la respuesta inflamatoria provocada por las células de CEs en los diferentes sitios y etapas del trasplante.** (A-D) Condición de 6 dpt. (A y B) Trasplante en la coordenada VRM-Ctx; (C y D) trasplante en estriado, en ambos casos no se identificaron células involucradas en procesos inflamatorios. (E-H) Condición de 15 dpt. Tanto en el sitio VRM-Ctx (E y F) como en el estriado (G y H) no se distinguieron indicios de inflamación, por el contrario, el tejido se observa bien preservado y con mayor distribución de las células implantadas respecto a la etapa de 6 dpt. Los recuadros en las micrografías representan el área comprendida en la micrografía con el acercamiento emplazado a la derecha inmediata. Barras de escala (A, E, C y G) 300  $\mu$ m y (B, F, D y H) 50  $\mu$ m.

## **Proliferación celular**

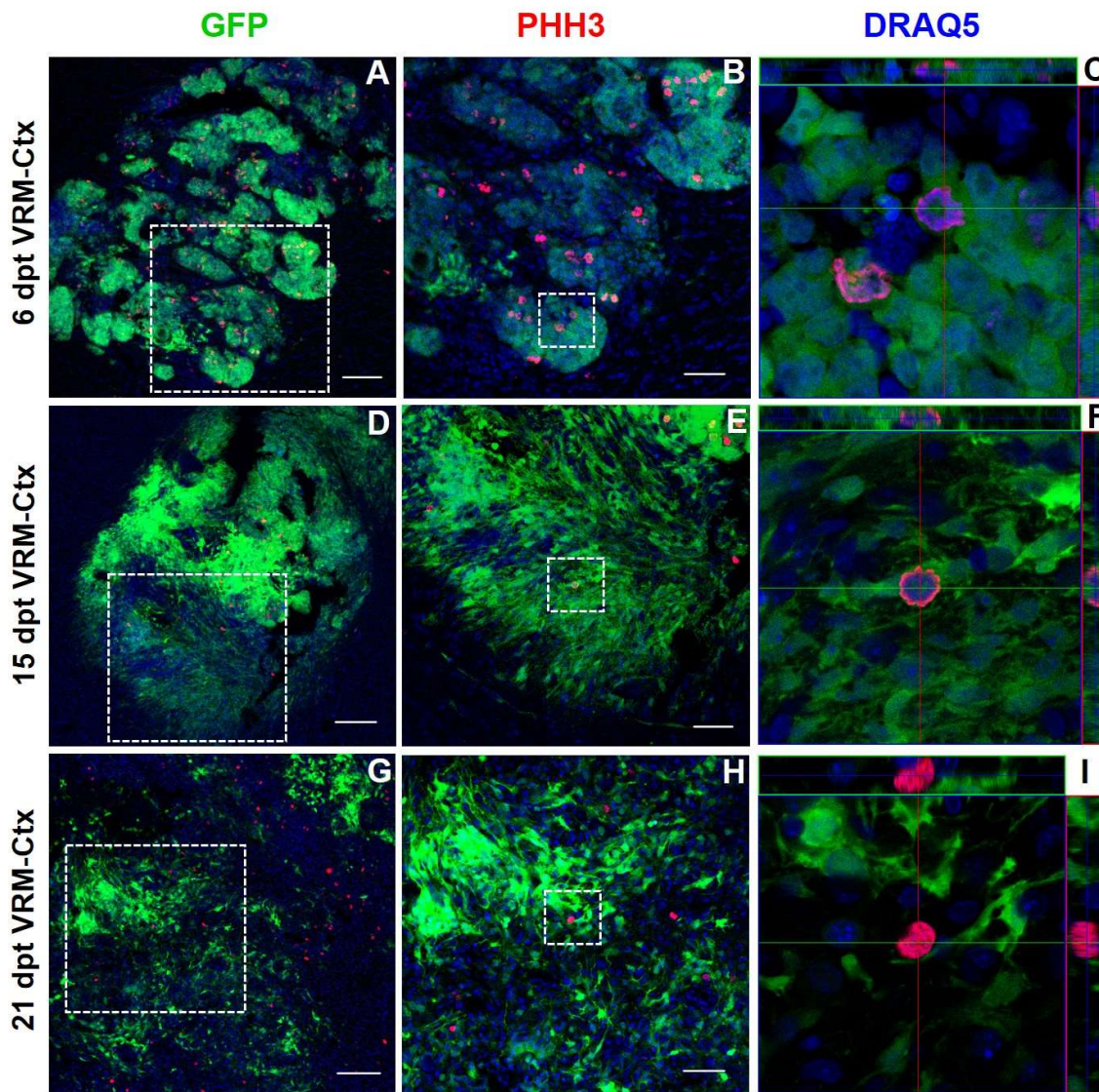
Se examinó la división celular en los trasplantes en la coordenada VRM-Ctx, la actividad mitótica fue detectada mediante el marcador de la Histona H3 fosforilada (PHH3), apreciable durante las fases de la mitosis y correspondiente a la condensación de la cromatina.

A los 6 dpt fue posible distinguir células GFP+/PHH3+ distribuidas a través de todo el trasplante (Fig. 26A), sin embargo, la cantidad de células con actividad mitótica no resultó abundante (Fig. 26B y 26C).

A los 15 dpt se redujeron drásticamente los casos positivos a la PHH3 en los trasplantes, por lo tanto, las células en división se distinguieron al rastrear exhaustivamente la región y pueden ser consideradas como muy escasas y aisladas (Fig. 26D-9F).

A los 21 dpt no se registraron células GFP+/PHH3+, únicamente se detectaron escasas células del tejido huésped dividiéndose (Fig. 26G-I).

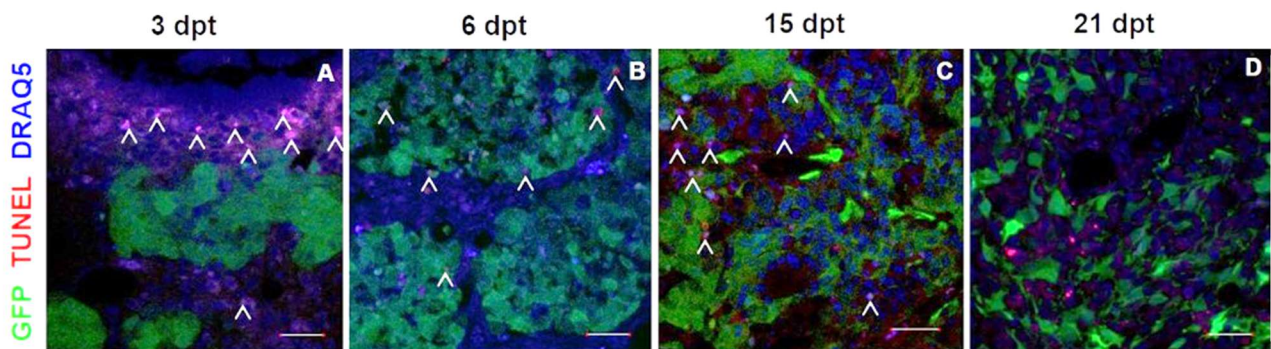
Se analizó de igual modo la división celular en los trasplantes en el estriado, no se distinguieron diferencias en la cantidad de células positivas al marcador de la PHH3 entre los distintos tiempos de trasplante.



**Figura 26. Detección de división celular en células de CEs en las diferentes etapas del trasplante.** Los recuadros en las micrografías representan el área comprendida en el acercamiento sucesivo. (A-C) Expresión de PHH3 en células de CEs a los 6 dpt. (A y B) Trasplante con reducida cantidad de células en división. (C) Proyección ortogonal de células mitóticas GFP+. (D-F) Detección de PHH3 a los 15 dpt. (D y E) La proporción de células en división se redujo considerablemente. (F) Imagen ortogonal de uno de los casos aislados positivos a la PHH3. (G-H) Marcaje de la PHH3 en trasplante de 21 días. (G y H) No fue posible detectar células GFP+ coexpresando la PHH3, únicamente se observaron células del tejido huésped en división. (I) Proyección ortogonal de una célula endógena en mitosis. Barras de escala: A, D y G 100  $\mu$ m; B, E y H 50  $\mu$ m.

## Muerte celular

Se analizó también la muerte celular en las distintas etapas del trasplante en la coordenada VRM-Ctx. La apoptosis celular fue determinada mediante el ensayo de TUNEL, indicador de la fragmentación del DNA. Se analizaron las células de CE a los 3 dpt con la finalidad cubrir un lapso mayor, en este caso la señal TUNEL+ solo se encontró en el tejido huésped circundante a las células trasplantadas (Fig. 27A). A los 6 dpt y los 15 dpt, una reducida cantidad de células TUNEL+ fue detectada. (Fig. 27B y 27C respectivamente). Finalmente, a los 21 dpt no se localizaron células apoptóticas GFP+ (Fig. 27D).



**Figura 27. Detección de muerte celular en células de CE en las diferentes etapas del trasplante en la coordenada VRM-Ctx.** (A) Marcaje de TUNEL en células de CE a los 3 dpt, únicamente se distingue en células endógenas. (B y C) La apoptosis se detectó en células GFP+ en una proporción baja a los 6 dpt y 15 dpt respectivamente. (D) En la condición de 21 dpt no fueron detectadas células trasplantadas positivas para el marcaje de TUNEL. Células positivas señaladas con cabezas de flecha en todas las micrografías. Barras de escala A-C 50  $\mu$ m y D 20  $\mu$ m.

## Trasplante en estriado adulto

Se utilizó el modelo de OAMC para evaluar si las células de CEs eran capaces de diferenciar al linaje neural al detectar las condiciones microambientales del estriado adulto en estado intacto (sin actividad de neurogénesis), así como en estado de lesión, que representa una condición con potencial neurogénico.

El trasplante se realizó en el estriado en la fase subaguda de la lesión (día 8 después de la OAMC) (n=5) y en el estriado sin daño o control (n=3).

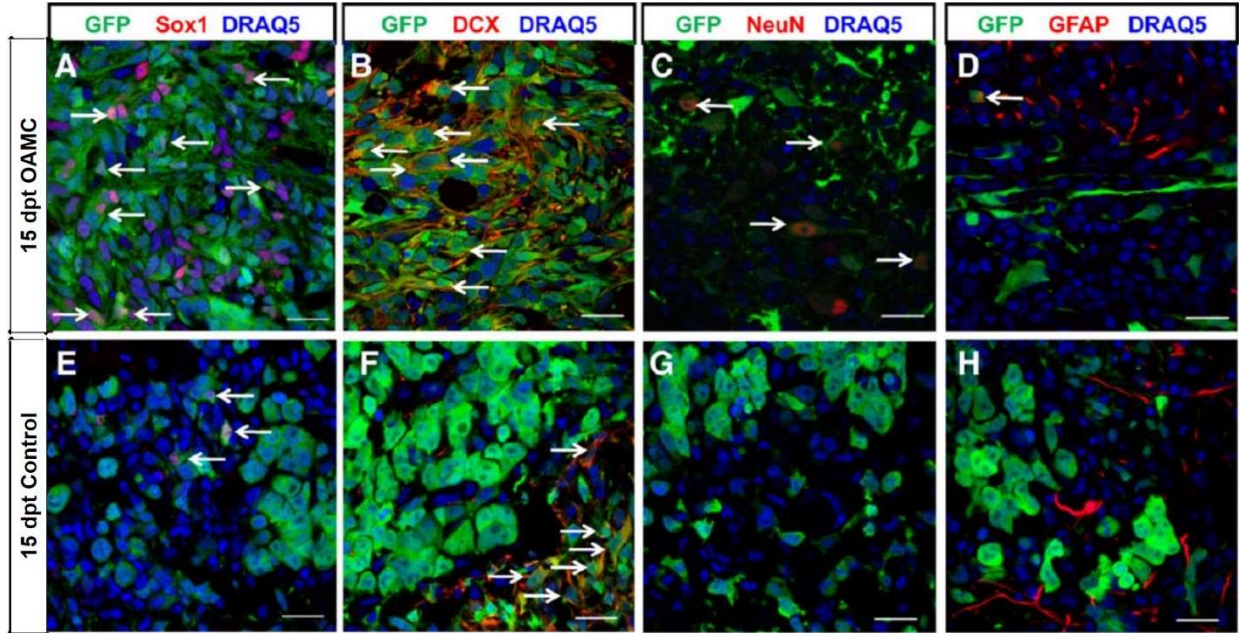
Se analizó la expresión de los marcadores de diferenciación neural en ambos escenarios a los 15 dpt.

La proporción de células Sox1+ alcanzó un  $30\% \pm 18.3\%$  en estriado con OAMC (Fig. 28A), mientras que en el estriado intacto resultó un  $19.3\% \pm 1\%$  (Fig. 28E). Las células DCX+ en la condición con OAMC representaron un  $40.5\% \pm 15.23\%$  (Fig. 28B) y en no lesionados un  $15.2\% \pm 26.3\%$  (solamente una rata presentó marcaje positivo) (Fig. 28F). Respecto a las células NeuN+ en los casos de OAMC se observó un  $20.7\% \pm 27.6\%$  siendo muy dispar la proporción entre cada animal (Fig. 28C), mientras que en estriados intactos no se determinó la proporción debido a la escasez de células NeuN+ (Fig. 28G). Además, las células GFAP+ en ambas condiciones fueron muy escasas encontrándose únicamente como casos aislados (Fig. 28D y H).

Por lo tanto, en el análisis de los factores de diferenciación neuronal en ratas adultas se observaron resultados muy contrastantes entre cada animal.

Es importante señalar que no se identificaron células GAD67+, lo cual sugiere que la diferenciación a este fenotipo no fue favorecida en este núcleo, contrastando con lo observado en la región VRM-Ctx postnatal.





**Figura 28. Diferenciación de células de CEs en estriado adulto.** La presencia de marcadores neurales fue determinada a los 15 dpt en estriado intacto (control) y dañado (modelo de OAMC). Se distinguió una mayor proporción de células Sox1, DCX y NeuN en el núcleo dañado (A-C) que en el control (E-G), sugiriendo que la diferenciación al fenotipo neuronal pudo ser inducida por el microambiente generado a partir de la lesión. De manera interesante, la diferenciación astrocítica no fue estimulada por la lesión ni en el microambiente intacto (D y H). Las flechas señalan a las células con señal positiva. Las barras de escala en las micrografías equivalen a 20  $\mu$ m.

## DISCUSIÓN

La neurogénesis en el cerebro postnatal posee gran relevancia e implicaciones a nivel fisiológico en condiciones normales e incluso en escenarios patológicos. La presencia de CTNs es la principal característica de los nichos neurogénicos. Sin embargo, no hay evidencia definitiva que descarte la presencia de éstas en otras áreas del cerebro con potencial neurogénico mucho más escaso como la corteza y SNpc (124–127).

En el presente trabajo, se investigaron las regiones del cerebro postnatal capaces de soportar la diferenciación neuronal de las células derivadas de CEs trasplantadas. Es posible afirmar que las células de CEs no comprometidas al linaje neural son capaces de diferenciar en células gliales, precursores neuronales y neuronas en una región aledaña al nicho neurogénico VRM-Ctx, así como en el estriado, que no presenta actividad de neurogénesis, sin embargo, el cerebro postnatal carece de señales de especificación necesarias, lo cual sugiere que, para llevar a cabo una diferenciación sitio-específica se requieren CTNs preespecificadas.

Por lo tanto, un trasplante exitoso para conseguir el reemplazo de circuitos perdidos o disfuncionales requiere de la sobrevivencia a largo plazo y la integración del injerto al tejido huésped. En un estudio se demostró que CTNs embrionarias restringidas al linaje glial y neuronal lograron diferenciar y sobrevivir a largo plazo al ser trasplantadas sin inmunosupresión en el estriado y médula adultos (128). Asimismo, CTNs expandidas como neuroesferas adquirieron el fenotipo astrocítico al ser trasplantadas en un ambiente neurogénico embrionario (129), de igual modo, este fenotipo resultó favorecido en trasplantes en el estriado adulto (81,82). Por lo tanto,

la evaluación de un microambiente favorable para la diferenciación neuronal en el cerebro postnatal y adulto requiere el uso de CTNs no comprometidas que presenten un fuerte potencial neurogénico y cuyo fenotipo final dependa de las señales del entorno. Las células derivadas de CEs parecen cubrir este requerimiento; tanto que, la primera aproximación fue realizar injertos en microambientes neurogénicos en explantes del cerebro embrionario (118) y concurrente con el presente trabajo de trasplantes en cerebro postnatal se originó una alta proporción (alrededor del 70%) de diferenciación al fenotipo neuronal y una discreta proporción de diferenciación glial. La diferenciación neuronal de las células de CEs en la etapa postnatal fue un proceso progresivo; nuestros resultados sugieren que la proliferación celular no es requerida para la diferenciación de las células de CEs. Sin embargo, la sobrevivencia selectiva de las mismas poco tiempo después del trasplante, puede contribuir a la alta eficiencia de diferenciación al fenotipo neural. La expresión de marcadores neurales en las células de CEs trasplantadas indica la diferenciación de células de naturaleza ectodérmica sin compromiso neural (Oct4+/Fgf5+) hasta convertirse en neuronas maduras (NeuN+). Una reducida cantidad de astrocitos fue observada (células GFAP+), por lo tanto, la diferenciación neuronal resultó ser el fenotipo favorecido para las células trasplantadas bajo la influencia de las señales presentes en la región aledaña a la VRM-Ctx del cerebro postnatal. Adicionalmente, la aparición secuencial de marcadores de diferenciación no se asemeja a las características reportadas como resultado de la fusión celular entre CTNs trasplantadas y células maduras hipocampales, estriatales o corticales del huésped (130,131); ya que en esos casos, en lugar de una aparición gradual de los marcadores neuronales esperados en la

diferenciación celular, el fenotipo terminal fue detectado tempranamente dentro de los 6 dpt. En el presente trabajo, el hecho de que los tipos neuronales detectados en las células trasplantadas no correspondieron a los endógenos en el sitio de trasplante, respalda que no pudieron haberse originado a partir de la fusión celular. Ha sido difícil demostrar la diferenciación sitio-específica de las CTNs trasplantadas en el cerebro adulto debido a la falta de un tipo celular con un alto potencial de diferenciación comprobado. La diferenciación neuronal específica depende de señales que instruyan a las células precursoras a seguir un fenotipo particular y de señales de especificación a un subtipo particular.

Las células derivadas de CEs son competentes para responder a señales de especificación (118) y por lo tanto, es probable que el microambiente del cerebro postnatal y adulto guíe el destino neuronal. El linaje neuronal de las células de CEs adquirido en la región VRM-Ctx sugirió la posibilidad de una especificación en los principales subtipos de interneuronas del BO, no obstante, solo de manera ocasional fueron atraídas hacia dicha estructura, contrastando con los resultados del trasplante de células procedentes de la eminencia ganglionar embrionaria trasplantadas en la ZSV postnatal, las cuales migraron a través de la VRM y se integraron en el BO (132). Adicionalmente, solo fueron observadas pocas células expresando los marcadores PanDlx o Pax6, factores requeridos para la especificación de las interneuronas del BO. Por lo tanto, si bien las células de CEs son capaces de detectar factores presentes en el cerebro postnatal que favorecen la diferenciación neuronal, la región VRM-Ctx no provee las señales instructivas necesarias para la especificación. La falta de las señales para la especificación en el cerebro postnatal y adulto no resultó algo inesperado dado que la mayoría de las

CTs somáticas ya están comprometidas a determinados linajes y por lo tanto ya no requieren de las instrucciones presentes únicamente en la etapa embrionaria (132–134). La elevada proporción de interneuronas GABAérgicas en comparación con otros fenotipos sugiere que el microambiente de la región VRM-Ctx es favorable para que las células de CEs alcancen ciertos fenotipos. Adicionalmente, no se observó la misma proporción o fenotipos de diferenciación en las células de CEs trasplantadas en el estriado del cerebro postnatal, apoyando la idea de que las células de CEs no tenían tendencia a diferenciar a algún fenotipo en particular.

En el estriado postnatal, la reducida cantidad de neuroblastos (DCX+) encontrados en parches a través del trasplante es proporcional al bajo número de neuronas (NeuN+) encontradas, esto contrasta considerablemente con la proporción de células positivas a estos marcadores encontrada en la región VRM-Ctx. Asimismo, los astrocitos (GFAP+) fueron observados desde los 6 dpt y se notó un incremento progresivo en las etapas de trasplante posteriores, lo cual no ocurrió en la región VRM-Ctz. En conjunto los resultados sugieren que el estriado postnatal parece favorecer la diferenciación al linaje glial de las células de CEs trasplantadas a costa de la diferenciación neuronal.

No hay duda de que el cerebro adulto es capaz de producir neuronas *de novo*, sin embargo, los límites de esta capacidad aún no han sido definidos. La edad, las condiciones microambientales o las propiedades fisiológicas pueden influir en las capacidades neurogénicas en diferentes áreas del cerebro; también sigue pendiente determinar la capacidad efectiva de reparación del cerebro después de un daño.

En contraste con lo observado respecto estriado postnatal, en el estriado adulto intacto la proporción de células expresando marcadores de diferenciación neuronal fue menor, sugiriendo que las condiciones no son favorables para la diferenciación. De manera interesante, el patrón de diferenciación en el estriado adulto se vio revertido en la condición de daño con el modelo OAMC, se originó una proporción discreta de células NeuN+ y una escasa cantidad de astrocitos GFAP+, esto indica que, al menos en el estriado, el daño isquémico configura un microambiente que promueve la diferenciación neuronal de las células ce CEs. Nuestros datos difieren de los reportados previamente en los cuales se injertaron células de CEs en estriado normal (135) y denervado en el modelo de la enfermedad de Parkinson (122) y donde las células espontáneamente diferenciaron al fenotipo dopaminérgico y serotoninérgico en ratas con tratamiento de inmunosupresión. En nuestro trabajo, no administramos inmunosupresores y por lo tanto los trasplantes requirieron de una densidad celular mayor; por lo tanto, aparentemente bajo nuestras condiciones, los factores locales del microambiente del cerebro adulto influyeron en la diferenciación final, aunque no se debe descartar la participación de factores intrínsecos de las células de CEs injertadas. Nuestros datos sugieren que las células de CEs de la línea celular de ratón R1B5 son capaces de detectar factores microambientales (incluyendo los originados después de un daño cerebral) los cuales determinan su diferenciación al fenotipo neural.

## CONCLUSIONES

- Las células derivadas de CEs son capaces de detectar factores microambientales que promueven la diferenciación neural en el cerebro postnatal.
- La eficiente diferenciación al fenotipo neuronal de las CEs en la región VRM-Ctx demuestra que es un microambiente favorable para la neuralización del trasplante.
- La región VRM-Ctx promueve la diferenciación neuronal mas no induce la especificación a los fenotipos neuronales propios de la ZSV-VRM-BO.
- En el estriado, las células de CEs diferenciadas se distinguen en parches a lo largo del trasplante, a diferencia de la región VRM-Ctx donde progresivamente la diferenciación es uniforme a través de todo el injerto.
- El estriado en etapa postnatal representa un microambiente menos propicio para la diferenciación neuronal mientras que la diferenciación glial se muestra favorecida.
- En el estriado adulto, la diferenciación neuronal es favorecida por el microambiente producido ante la OAMC en comparación con el núcleo intacto.
- La diferenciación de las células de CEs trasplantadas es secuencial, los marcadores de diferenciación aparecen de manera ordenada y paulatina a nivel poblacional.
- Las divergencias en la diferenciación entre las distintas regiones y edades, así como entre la proporción, linajes y distribución de las células injertadas que lograron diferenciar indican que no hay una pre-especificación de las células derivadas de CEs.
- La diferenciación de las células derivadas de CEs es dependiente del sitio de trasplante.
- El éxito del trasplante no solo depende del tipo celular idóneo sino también de la selección del microambiente que promueva la diferenciación e integración.

## PERSPECTIVAS

A partir de la concreción del presente trabajo se iniciaron distintos proyectos.

- Trasplante de células derivadas de CEs R1B5 en la SNpc (un núcleo dopaminérgico) intacta y lesionada con 6-Hidroxidopamina donde se demostró que dicha región también es permisiva a la diferenciación neuronal, aunque sin identidad posicional, por lo cual se obtuvo la línea R1B5/Lmx1a y con la finalidad de dirigir las células al linaje dopaminérgico; efectivamente, se observó una mayor proporción de células dopaminérgicas a partir de los CEs de dicha línea en la SNpc intacta, mientras que en SNpc lesionada no se identificó predominancia en la diferenciación entre las células de CEs R1B5 o R1B5/Lmx1a, sugiriendo que el microambiente lesionado posee una mayor variedad de factores que promueven la diferenciación dopaminérgica.
- A partir de los trasplantes de células de CEs en la SNpc se identificó una importante cantidad de células endógenas en proliferación BrdU+ como respuesta al injerto. A los 15 dpt las células BrdU+ coexpresaron DCX, utilizando una estrategia de trazado de linaje se demostró que dichos neuroblastos son generados a partir de astrocitos. La adición del FGF2 y VEGF en la SNpc promovió la generación de células DCX+ *in vivo*, simulando la reacción que las células de CEs provocaron, lo cual sugiere que la SNpc es una región con potencial neurogénico.
- Se ideó un sistema de trasplante en SNpc adulta de CTEs humanas y células troncales pluripotentes inducidas provenientes de un paciente con enfermedad de Parkinson y con una modificación para expresar los factores de transcripción claves para la diferenciación dopaminérgica mesencefálica: Lmx1a, Otx2 y FoxA2.
- Se planteó un estudio del desarrollo temprano de la enfermedad de Parkinson a través de un modelo *in vitro*, utilizando células pluripotentes inducidas provenientes de un paciente con triplicación del gen de  $\alpha$ -sinucleína.



## REFERENCIAS

1. Fuchs E, Tumber T, Guasch G. Socializing with the neighbors: Stem cells and their niche. *Cell*. 2004;116(6):769–78.
2. Tsai RYL, Kittappa R, McKay RDG. Plasticity, niches, and the use of stem cells. *Dev Cell*. 2002;2(6):707–12.
3. Rashidi NM, Lo Celso C. Flying back to the nest Intravital microscopy reveals how the niche can induce stemness. *IntraVital*. 2014; 3 (August):5–7.
4. Morrison SJ, Spradling AC. Stem Cells and Niches: Mechanisms That Promote Stem Cell Maintenance throughout Life. *Cell*. 2008;132(4):598–611.
5. Spradling A, Drummond-Barbosa D, Kai T. Stem cells find their niche. *Nature*. 2001;414(November):98–104.
6. Suh H, Deng W, Gage FH. Signaling in Adult Neurogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2009;25(1):253–75.
7. Altman J. Autoradiographic investigation of cell proliferation in the brains of rats and cats. *Anat Rec*. 1963;145(4):573–91.
8. Altman J, Das GD. Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J Comp Neurol*. 1965;124(3):319–335.
9. Gross CG. Neurogenesis in the adult brain: death of a dogma. *Nat Rev Neurosci*. 2000;1(1):67–73.
10. Paton JA, Nottebohm FN. Neurons generated in the adult brain are recruited into functional circuits. *Science*. 1984;225(4666):1046–8.
11. Reynolds BA a, Weiss S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science*. 1992;255(5052):1707–10.
12. Delgado-Garcia LM, Amorim RM, Maria L, Garcia D. Adult Brain Neurogenesis, Neural Stem Cells and Neurogenic Niches. *Int J Stem Cell Res Ther* 2016;3(3).
13. Doetsch F. The glial identity of neural stem cells. *Nat Neurosci*. 2003;6(11):1127–34.
14. Alvarez-Buylla A, García-Verdugo JM, Tramontin AD. A unified hypothesis on the lineage of neural stem cells. *Nat Rev Neurosci*. 2001;2(4):287–93.
15. Merkle FT, Tramontin AD, García-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. Radial glia give rise to adult neural stem cells in the subventricular zone. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(50):17528–32.
16. Riquelme PA, Drapeau E, Doetsch F. Brain micro-ecologies: neural stem cell niches in the adult mammalian brain. *Philos Trans R Soc L B Biol Sci*.

- 2008;363(1489):123–37.
17. Palmer TD, Willhoite AR, Gage FH. Vascular niche for adult hippocampal neurogenesis. *J Comp Neurol.* 2000;425(4):479–94.
  18. Doetsch F. A niche for adult neural stem cells. *Curr Opin Genet Dev.* 2003;13(5):543–50.
  19. Berg DA, Belnoue L, Song H, Simon A. Neurotransmitter-mediated control of neurogenesis in the adult vertebrate brain. *Development.* 2013;140(12):2548–61.
  20. Platel JC, Stambouliau S, Nguyen I, Bordey A. Neurotransmitter signaling in postnatal neurogenesis: The first leg. *Brain Res Rev.* 2010;63(1–2):60–71.
  21. Fiorelli R, Azim K, Fischer B, Raineteau O. Adding a spatial dimension to postnatal ventricular-subventricular zone neurogenesis. *Development.* 2015;142(12):2109–20.
  22. Doetsch F, García-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain. *J Neurosci.* 1997;17(13):5046–61.
  23. Doetsch F, Caillé I, Lim D a, García-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell.* 1999;97(6):703–16.
  24. Mirzadeh Z, Merkle FT, Soriano-Navarro M, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. Neural Stem Cells Confer Unique Pinwheel Architecture to the Ventricular Surface in Neurogenic Regions of the Adult Brain. *Cell Stem Cell.* 2008;3(3):265–78.
  25. Tong CK, Chen J, Cebrián-Silla A, Mirzadeh Z, Obernier K, Guinto CD, et al. Axonal control of the adult neural stem cell niche. *Cell Stem Cell.* 2014;14(4):500–11.
  26. Bjornsson CS, Apostolopoulou M, Tian Y, Temple S. It takes a village: Constructing the neurogenic niche. *Dev Cell.* 2015;32(4):435–46.
  27. Alvarez-Buylla A, García-Verdugo JM. Neurogenesis in adult subventricular zone. *J Neurosci.* 2002;22(3):629–34.
  28. Lois C, Alvarez-Buylla A. Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain. *Science.* 1994;264(5162):1145–8.
  29. Lledo PM, Saghatelian A. Integrating new neurons into the adult olfactory bulb: Joining the network, life-death decisions, and the effects of sensory experience. *Trends Neurosci.* 2005;28(5):248–54.
  30. Lois C, García-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. Chain migration of neuronal precursors. *Science.* 1996;271(5251):978–81.

31. Wichterle H, García-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. Direct evidence for homotypic, glia-independent neuronal migration. *Neuron*. 1997;18(5):779–91.
32. Ming G, Song H. Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system. *Annu Rev Neurosci*. 2005;28:223–50.
33. Lledo PM, Merkle FT, Alvarez-Buylla A. Origin and function of olfactory bulb interneuron diversity. *Trends Neurosci*. 2008;31(8):392–400.
34. Petreanu L, Alvarez-Buylla A. Maturation and death of adult-born olfactory bulb granule neurons: role of olfaction. *J Neurosci*. 2002;22(14):6106–13.
35. Lledo P-M, Alonso M, Grubb MS. Adult neurogenesis and functional plasticity in neuronal circuits. *Nat Rev Neurosci*. 2006;7(3):179–93.
36. Davenne M, Custody C, Charneau P, Lledo PM. In vivo imaging of migrating neurons in the mammalian forebrain. *Chem Senses*. 2005;30: 115–6.
37. Smith CM, Luskin MB. Cell cycle length of olfactory bulb neuronal progenitors in the rostral migratory stream. *Dev Dyn*. 1998;213(2):220–7.
38. Hack M a, Saghatelian A, de Chevigny A, Pfeifer A, Ashery-Padan R, Lledo P-M, et al. Neuronal fate determinants of adult olfactory bulb neurogenesis. *Nat Neurosci*. 2005;8(7):865–72.
39. Kohwi M. Pax6 Is Required for Making Specific Subpopulations of Granule and Periglomerular Neurons in the Olfactory Bulb. *J Neurosci*. 2005;25(30):6997–7003.
40. Alvarez-Buylla A, Kohwi M, Nguyen TM, Merkle F. The Heterogeneity of Adult Neural Stem Cells and the Emerging Complexity of Their Niche The Heterogeneity of Adult Neural Stem Cells and the Emerging Complexity of Their Niche. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 2008;LXXIII:357–65.
41. Conover JC, Doetsch F, Garcia-Verdugo JM, Gale NW, Yancopoulos GD, Alvarez-Buylla a. Disruption of Eph/ephrin signaling affects migration and proliferation in the adult subventricular zone. *Nat Neurosci*. 2000;3(11):1091–7.
42. Theus MH, Ricard J, Bethea JR, Liebl DJ. EphB3 limits the expansion of neural progenitor cells in the subventricular zone by regulating p53 during homeostasis and following traumatic brain injury. *Stem Cells*. 2010;28(7):1231–42.
43. Lim DA, Tramontin AD, Trevejo JM, Herrera DG, García-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. Noggin antagonizes BMP signaling to create a niche for adult neurogenesis. *Neuron*. 2000;28(3):713–26.
44. Chen H-L, Panchision DM. Concise Review: Bone Morphogenetic Protein Pleiotropism in Neural Stem Cells and Their Derivatives-Alternative Pathways,

- Convergent Signals. *Stem Cells*. 2007;25(1):63–8.
45. Colak D, Mori T, Brill MS, Pfeifer A, Falk S, Deng C, et al. Adult Neurogenesis Requires Smad4-Mediated Bone Morphogenic Protein Signaling in Stem Cells. *J Neurosci* [Internet]. 2008;28(2):434–46.
  46. Hirota Y, Sawada M, Huang SH, Ogino T, Ohata S, Kubo A, et al. Roles of Wnt signaling in the neurogenic niche of the adult mouse ventricular-subventricular zone. *Neurochem Res*. 2016;41(1–2):222–30.
  47. Hirota Y, Sawada M, Kida YS, Huang SH, Yamada O, Sakaguchi M, et al. Roles of planar cell polarity signaling in maturation of neuronal precursor cells in the postnatal mouse olfactory bulb. *Stem Cells*. 2012;30(8):1726–33.
  48. Hitoshi S, Seaberg RM, Kosciuk C, et al. Research communication. *Genes Dev*. 2004;18:6–11.
  49. Angot E, Loulier K, Nguyen-Ba-Charvet KT, Gadeau A-P, Ruat M, Traiffort E. Chemoattractive Activity of Sonic Hedgehog in the Adult Subventricular Zone Modulates the Number of Neural Precursors Reaching the Olfactory Bulb. *Stem Cells*. 2008;26(9):2311–20.
  50. Balordi F, Fishell G. Hedgehog Signaling in the Subventricular Zone Is Required for Both the Maintenance of Stem Cells and the Migration of Newborn Neurons. *J Neurosci*. 2007;27(22):5936–47.
  51. Marshall CAG. Olig2 Directs Astrocyte and Oligodendrocyte Formation in Postnatal Subventricular Zone Cells. *J Neurosci*. 2005;25(32):7289–98.
  52. Jin K, Zhu Y, Sun Y, XO M, Xie L, DA G. Vascular endothelial growth factor (VEGF) stimulates neurogenesis in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002;99(18):11946–50.
  53. Sun W, Kim H, Moon Y. Control of neuronal migration through rostral migration stream in mice. *Anat Cell Biol*. 2010;43(4):269.
  54. Balenci L, Saoudi Y, Grunwald D, Deloulme JC, Bouron A, Bernards A, et al. IQGAP1 Regulates Adult Neural Progenitors In Vivo and Vascular Endothelial Growth Factor-Triggered Neural Progenitor Migration In Vitro. *J Neurosci*. 2007;27(17):4716–24.
  55. Wittko IM, Schanzer A, Kuzmichev A, Schneider FT, Shibuya M, et al. VEGFR-1 Regulates Adult Olfactory Bulb Neurogenesis and Migration of Neural Progenitors in the Rostral Migratory Stream In Vivo. *J Neurosci*. 2009;29(27):8704–14.
  56. Zigova T, Pencea V, Wiegand SJ, Luskin MB. Intraventricular administration of

- BDNF increases the number of newly generated neurons in the Adult Olfactory Bulb. *Mol Cell Neurosci.* 1998;245:234–45.
57. Benraiss A, Chmielnicki E, Lerner K, Roh D, Goldman S a. Adenoviral brain-derived neurotrophic factor induces both neostriatal and olfactory neuronal recruitment from endogenous progenitor cells in the adult forebrain. *J Neurosci.* 2001;21(17):6718–31.
  58. Pencea V, Bingaman KD, Wiegand SJ, Luskin MB. Infusion of brain-derived neurotrophic factor into the lateral ventricle of the adult rat leads to new neurons in the parenchyma of the striatum, septum, thalamus, and hypothalamus. *J Neurosci.* 2001;21(17):6706–17.
  59. Chiamarello S, Dalmaso G, Bezin L, Marcel D, Jourdan F, Peretto P, et al. BDNF/TrkB interaction regulates migration of SVZ precursor cells via PI3-K and MAP-K signalling pathways. *Eur J Neurosci.* 2007;26(7):1780–90.
  60. Snapyan M, Lemasson M, Brill MS, Blais M, Massouh M, Ninkovic J, et al. Vasculature guides migrating neuronal precursors in the adult mammalian forebrain via brain-derived neurotrophic factor signaling. *J Neurosci.* 2009;29(13):4172–88.
  61. Doetsch F, Petreanu L, Caille I, Alvarez-buylla A. EGF Converts Transit-Amplifying Neurogenic Precursors in the Adult Brain into Multipotent Stem Cells. *Neuron.* 2002;36:1021–34.
  62. Tropepe V, Craig CG, Morshead CM, van der Kooy D. Transforming growth factor- $\alpha$  null and senescent mice show decreased neural progenitor cell proliferation in the forebrain subependyma. *J Neurosci.* 1997;17(20):7850–9.
  63. Kuhn HG, Winkler J, Kempermann G, Thal LJ, Gage FH. Epidermal growth factor and fibroblast growth factor-2 have different effects on neural progenitors in the adult rat brain. *J Neurosci.* 1997;17(15):5820–9.
  64. Wong RWC, Guillaud L. The role of epidermal growth factor and its receptors in mammalian CNS. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2004;15(2–3):147–56.
  65. Lindberg OR, Persson Å, Brederlau A, Shabro A, Kuhn HG. EGF-Induced Expansion of Migratory Cells in the Rostral Migratory Stream. *PLoS One.* 2012;7(9).
  66. Gritti A, Parati E, Cova L, Frolichsthal P, Galli R, Wanke E, et al. Multipotential Stem Cells from the Adult Mouse and Self-Renew in Response to Basic Fibroblast. *J Neurosci.* 1996;16(3):1091–100.
  67. Mercier F, Kitasako JT, Hatton GI. Anatomy of the brain neurogenic zones revisited: Fractones and the fibroblast/macrophage network. *J Comp Neurol.*

- 2002;451(2):170–88.
68. Höglinger GU, Rizk P, Muriel MP, Duyckaerts C, Oertel WH, Caille I, et al. Dopamine depletion impairs precursor cell proliferation in Parkinson disease. *Nat Neurosci*. 2004;7(7):726–35.
  69. Baker SA, Baker KA, Hagg T. Dopaminergic nigrostriatal projections regulate neural precursor proliferation in the adult mouse subventricular zone. *Eur J Neurosci*. 2004;20(2):575–9.
  70. Winner B, Desplats P, Hagl C, Klucken J, Aigner R, Ploetz S, et al. Dopamine receptor activation promotes adult neurogenesis in an acute Parkinson model. *Exp Neurol*. 2009;219(2):543–52.
  71. Kippin TE. Dopamine Specifically Inhibits Forebrain Neural Stem Cell Proliferation, Suggesting a Novel Effect of Antipsychotic Drugs. *J Neurosci*. 2005;25(24):5815–23.
  72. Kim Y, Wang WZ, Comte I, Pastrana E, Tran PB, Brown J, et al. Dopamine stimulation of postnatal murine subventricular zone neurogenesis via the D3 receptor. *J Neurochem*. 2010;114(3):750–60.
  73. Cooper-Kuhn CM, Winkler J, Kuhn HG. Decreased neurogenesis after cholinergic forebrain lesion in the adult rat. *J Neurosci Res*. 2004;77(2):155–65.
  74. Kaneko N, Okano H, Sawamoto K. Role of the cholinergic system in regulating survival of newborn neurons in the adult mouse dentate gyrus and olfactory bulb. *Genes to Cells*. 2006;11(10):1145–59.
  75. Paez-Gonzalez P, Asrican B, Rodriguez E, Kuo CT. Identification of distinct ChAT+neurons and activity-dependent control of postnatal SVZ neurogenesis. *Nat Neurosci*. 2014;17(7):934–42.
  76. Wang J, Lu Z, Fu X, Zhang D, Yu L, Li N, et al. Alpha-7 Nicotinic Receptor Signaling Pathway Participates in the Neurogenesis Induced by ChAT-Positive Neurons in the Subventricular Zone. *Transl Stroke Res*. 2017;8(5):484–93.
  77. Brezun JM, Daszuta A. Depletion in serotonin decreases neurogenesis in the dentate gyrus and the subventricular zone of adult rats. *Neuroscience*. 1999;89(4):999–1002.
  78. Banasr M, Hery M, Printemps R, Daszuta A. Serotonin-induced increases in adult cell proliferation and neurogenesis are mediated through different and common 5-HT receptor subtypes in the dentate gyrus and the subventricular zone. *Neuropsychopharmacology*. 2004;29(3):450–60.

79. Díaz D, Valero J, Airado C, Baltanás FC, Weruaga E, Alonso JR. Sexual dimorphic stages affect both proliferation and serotonergic innervation in the adult rostral migratory stream. *Exp Neurol*. 2009;216(2):357–64.
80. Thored P, Arvidsson A, Cacci E, Ahlenius H, Kallur T, Darsalia V, et al. Persistent Production of Neurons from Adult Brain Stem Cells During Recovery after Stroke. *Stem Cells*. 2006;24(3):739–47.
81. Herrera DG, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. Adult-derived neural precursors transplanted into multiple regions in the adult brain. *Ann Neurol*. 1999;46(6):867–77.
82. Barraud P, Thompson L, Kirik D, Björklund A, Parmar M. Isolation and characterization of neural precursor cells from the Sox1-GFP reporter mouse. *Eur J Neurosci*. 2005;22(7):1555–69.
83. Kim J-H, Auerbach JM, Rodríguez-Gómez J a, Velasco I, Gavin D, Lumelsky N, et al. Dopamine neurons derived from embryonic stem cells function in an animal model of Parkinson's disease. *Nature*. 2002;418(6893):50–6.
84. O'Keeffe GC, Tyers P, Aarsland D, Dalley JW, Barker RA, Caldwell MA. Dopamine-induced proliferation of adult neural precursor cells in the mammalian subventricular zone is mediated through EGF. *Proc Natl Acad Sci*. 2009;106(21):8754–9.
85. Smith AG. Embryo derived stem cells: Of Mice and Men. *Cell*. 2001;17:435–62.
86. Young RA. Review Control of the Embryonic Stem Cell State. *Cell*. 2011;144(6):940–54.
87. Chambers I, Smith A. Self-renewal of teratocarcinoma and embryonic stem cells. 2004;7150–60.
88. Christophersen NS, Helin K. Epigenetic control of embryonic stem cell fate. *J Exp Med*. 2010;207(11):2287–95.
89. Nichols J, Zevnik B, Anastassiadis K, Niwa H, Klewe-Nebenius D, Chambers I, et al. Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. *Cell*. 1998;95(3):379–91.
90. Niwa H, Miyazaki J, Smith AG. Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat Genet*. 2000;24(4):372–6.
91. Masui S, Nakatake Y, Toyooka Y, Shimosato D, Yagi R, Takahashi K, et al. Pluripotency governed by Sox2 via regulation of Oct3/4 expression in mouse embryonic stem cells. *Nat Cell Biol*. 2007;9(6):625-U26.
92. Avilion AA, Nicolis SK, Pevny LH, Perez L, Vivian N, Lovell-Badge R. Multipotent

- cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes Dev.* 2003;17(1):126–40.
93. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell.* 2006;126(4):663–76.
  94. Hart AH, Hartley L, Ibrahim M, Robb L. Identification, Cloning and Expression Analysis of the Pluripotency Promoting Nanog Genes in Mouse and Human. *Dev Dyn.* 2004;230(1):187–98.
  95. Smith AG, Heath JK, Donaldson DD, Wong GG, Moreau J, Stahl M, et al. Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides. *000*:8–10.
  96. Miki T, Yasuda S, Kahn M. Wnt/ $\beta$ -catenin signaling in embryonic stem cell self-renewal and somatic cell reprogramming. *Stem Cell Rev.* 2011;7(4):836–46.
  97. Chen X, Xu H, Yuan P, Fang F, Huss M, Vega VB, et al. Resource Integration of External Signaling Pathways with the Core Transcriptional Network in Embryonic Stem Cells. *Cell.* 2008;1106–17.
  98. Zhang JG, Owczarek CM, Ward LD, Howlett GJ, Fabri LJ, Roberts BA, et al. Evidence for the formation of a heterotrimeric complex of leukaemia inhibitory factor with its receptor subunits in solution. *Biochem J.* 1997;325 ( Pt 3):693–700.
  99. Matsuda T, Nakamura T, Nakao K, Arai T, Katsuki M, Heike T, et al. STAT3 activation is sufficient to maintain an undifferentiated state of mouse embryonic stem cells. *Embo J.* 1999;18(15):4261–9.
  100. Burdon T, Smith A, Savatier P. Signalling, cell cycle and pluripotency in embryonic stem cells. *Trends Cell Biol.* 2002;12(9):432–8.
  101. Rathjen J, Rathjen PD. Mouse ES cells: experimental exploitation of pluripotent differentiation potential. *Curr Opin Genet Dev.* 2001;11(5):587–94.
  102. Brickman JM, Serup P. Properties of embryoid bodies. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol.* 2016; 6 (2).
  103. Li S, Edgar D, Fässler R, Wadsworth W, Yurchenco PD. The role of laminin in embryonic cell polarization and tissue organization. *Dev Cell.* 2003;4(5):613–24.
  104. Qi H, Huang G, Han YL, Lin W, Li X, Wang S, et al. In vitro spatially organizing the differentiation in individual multicellular stem cell aggregates. *Crit Rev Biotechnol.* 2014;8551(January):1–12.
  105. Bratt-Leal AM, Carpenedo RL, McDevitt TC. Engineering the embryoid body



- microenvironment to direct embryonic stem cell differentiation. *Biotechnol Prog.* 2009;25(1):43–51.
106. ten Berge D, Koole W, Fuerer C, Fish M, Eroglu E, Nusse R. Wnt Signaling Mediates Self-Organization and Axis Formation in Embryoid Bodies. *Cell Stem Cell.* 2008;3(5):508–18.
  107. Brennan J, Norris DP, Robertson EJ. Nodal activity in the node governs left-right asymmetry. *Genes Dev.* 2002;16(18):2339–44.
  108. Rodda SJ, Kavanagh SJ, Rathjen J, Rathjen PD. Embryonic stem cell differentiation and the analysis of mammalian development. *Int J Dev Biol.* 2002;46(4):449–58.
  109. Kurosawa H. Methods for inducing embryoid body formation: in vitro differentiation system of embryonic stem cells. *J Biosci Bioeng.* 2007;103(5):389–98.
  110. Li X, Chen Y, Schele S, Arman E, Haffner-Krausz R, Ekblom P, et al. Fibroblast growth factor signaling and basement membrane assembly are connected during epithelial morphogenesis of the embryoid body. *J Cell Biol.* 2001;153(4):811–22.
  111. Keller G. Embryonic stem cell differentiation: Emergence of a new era in biology and medicine. *Genes Dev.* 2005;19(10):1129–55.
  112. Alharbi S, Elsafadi M, Mobarak M, Alrwili A, Vishnubalaji R, Manikandan M, et al. Ultrastructural Characteristics of Three Undifferentiated Mouse Embryonic Stem Cell Lines and Their differentiated Three-Dimensional Derivatives: A Comparative Study. *Cell Reprogram.* 2014;16(2):1–15.
  113. Wichterle H, Lieberam I, Porter JA et al. Directed differentiation of embryonic stem cells into motor neurons. *Cell.* 2002;110(3):385–97.
  114. Ying QL, Stavridis M, Griffiths D, Li M, Smith A. Conversion of embryonic stem cells into neuroectodermal precursors in adherent monoculture. *Nat Biotechnol.* 2003;21(2):183–6.
  115. Sang-Hun Lee, Nadya Lumelsky, Lorenz Studer, Jonathan M. Auerbach, Ron D. McKay. Efficient generation of midbrain and hindbrain neurons from mouse embryonic stem cells. *Nat Biotechnol.* 2000;18:675–9.
  116. Bain G, Kitchens D, Yao M, Huettner JE, Gottlieb DI. Embryonic stem cells express neuronal properties in vitro. Vol. 168, *Dev Biol.* 1995. p. 342–57.
  117. Benninger F, Beck H, Wernig M, Tucker KL, Brüstle O, Scheffler B. Functional integration of embryonic stem cell-derived neurons in hippocampal slice cultures. *J Neurosci.* 2003;23(18):7075–83.
  118. Baizabal JM, Covarrubias L. The embryonic midbrain directs neuronal specification

- of embryonic stem cells at early stages of differentiation. *Dev Biol.* 2009;325(1):49–59.
119. Brüstle O, Spiro a C, Karram K, Choudhary K, Okabe S, McKay RD. In vitro-generated neural precursors participate in mammalian brain development. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94(26):14809–14.
  120. Wernig M. Functional Integration of Embryonic Stem Cell-Derived Neurons In Vivo. *J Neurosci.* 2004;24(22):5258–68.
  121. Tabar V, Panagiotakos G, Greenberg ED, Chan BK, Sadelain M, Gutin PH, et al. Migration and differentiation of neural precursors derived from human embryonic stem cells in the rat brain. *Nat Biotechnol.* 2005;23(5):601–6.
  122. Bjorklund LM, Sánchez-Pernaute R, Chung S, Andersson T, Chen IYC, McNaught KSP, et al. Embryonic stem cells develop into functional dopaminergic neurons after transplantation in a Parkinson rat model. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(4):2344–9.
  123. Dang LTH, Wong L, Tropepe V. *Zfhx1b* Induces a Definitive Neural Stem Cell Fate in Mouse Embryonic Stem Cells. *Stem Cells Dev.* 2012;21(15):2838–51.
  124. Gould E, Reeves AJ, Graziano MSA, Gross CG. Neurogenesis in the neocortex of adult primates. *Science (80- ).* 1999;286(5439):548–52.
  125. Zhao M, Momma S, Delfani K, Carlén M, Cassidy RM, Johansson CB, et al. Evidence for neurogenesis in the adult mammalian substantia nigra. *Proc Natl Acad Sci.* 2003;100(13):7925.
  126. Van Kampen JM, Robertson HA. A possible role for dopamine D3receptor stimulation in the induction of neurogenesis in the adult rat substantia nigra. *Neuroscience.* 2005;136(2):381–6.
  127. Gu W, Gu C, Jiang W, Wester P. Neurotransmitter synthesis in poststroke cortical neurogenesis in adult rats. *Stem Cell Res.* 2010;4(2):148–54.
  128. Lepore AC, Neuhuber B, Connors TM, Han SSW, Liu Y, Daniels MP, et al. Long-term fate of neural precursor cells following transplantation into developing and adult CNS (DOI:10.1016/j.neuroscience.2005.12.043). *Neuroscience.* 2006;142(1):287–304.
  129. Baizabal J-M, Cano-Martínez A, Valencia C, Santa-Olalla J, Young KM, Rietze RL, et al. Glial Commitment of Mesencephalic Neural Precursor Cells Expanded as Neurospheres Precludes Their Engagement in Niche-Dependent Dopaminergic Neurogenesis. *Stem Cells Dev.* 2012;21(7):1047–58.

130. Brilli E, Reitano E, Conti L, Conforti P, Gulino R, Consalez GG, et al. Neural stem cells engrafted in the adult brain fuse with endogenous neurons. *Stem Cells Dev.* 2012;00(00):120925153723003.
131. Cusulin. Embryonic Stem Cell-Derived Neural Stem Cells Fuse with Microglia and Mature Neurons. 2012;2657–71.
132. Kohwi M, Petryniak M a, Long JE, Ekker M, Obata K, Yanagawa Y, et al. A subpopulation of olfactory bulb GABAergic interneurons is derived from Emx1- and Dlx5/6-expressing progenitors. *J Neurosci.* 2007;27(26):6878–91.
133. De Marchis S, Bovetti S, Carletti B, Hsieh Y-C, Garzotto D, Peretto P, et al. Generation of Distinct Types of Periglomerular Olfactory Bulb Interneurons during Development and in Adult Mice: Implication for Intrinsic Properties of the Subventricular Zone Progenitor Population. *J Neurosci.* 2007;27(3):657–64.
134. Wagers AJ, Weissman IL. Plasticity of adult stem cells. *Cell.* 2004;116(5):639–48.
135. Deacon T, Dinsmore J, Costantini LC, Ratliff J, Isacson O. Blastula-stage stem cells can differentiate into dopaminergic and serotonergic neurons after transplantation. *Exp Neurol.* 1998;149(1):28–41.

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

GUADALUPE MAYA-ESPINOSA,<sup>a</sup> OMAR COLLAZO-NAVARRETE,<sup>a</sup> DIANA MILLAN-ALDACO,<sup>a</sup>  
MARCELA PALOMERO-RIVERO,<sup>a</sup> GILDA GUERRERO-FLORES,<sup>b</sup> RENÉ DRUCKER-COLIN,<sup>a</sup>  
LUIS COVARRUBIAS,<sup>b</sup> MAGDALENA GUERRA-CRESPO<sup>a</sup>

**Key Words.** Neural differentiation • Embryonic stem cells • Stem cell transplantation • Neural stem cell

<sup>a</sup>Department of Molecular Neuropathology, Instituto de Fisiología Celular and  
<sup>b</sup>Department of Developmental Genetics and Molecular Physiology, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico

Correspondence: Magdalena Guerra-Crespo, Dr., Department of Molecular Neuropathology, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico. Telephone: 52 (55) 5622-5733; Fax: 52 (55) 5550-0064; e-mail: mguerra@ifc.unam.mx; Luis Covarrubias, Dr., Department of Developmental Genetics and Molecular Physiology, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico. Telephone: 52 (777) 329-1636; Fax: 52 (777) 317-2388; e-mail: covs@ibt.unam.mx

Received January 21, 2014; accepted for publication July 23, 2014; first published online in *STEM CELLS EXPRESS* September 29, 2014.

© AlphaMed Press  
1066-5099/2014/\$30.00/0

<http://dx.doi.org/10.1002/stem.1856>

### ABSTRACT

A neurogenic niche can be identified by the proliferation and differentiation of its naturally residing neural stem cells. However, it remains unclear whether “silent” neurogenic niches or regions suitable for neural differentiation, other than the areas of active neurogenesis, exist in the adult brain. Embryoid body (EB) cells derived from embryonic stem cells (ESCs) are endowed with a high potential to respond to specification and neuralization signals of the embryo. Hence, to identify microenvironments in the postnatal and adult rat brain with the capacity to support neuronal differentiation, we transplanted dissociated EB cells to conventional neurogenic and non-neurogenic regions. Our results show a neuronal differentiation pattern of EB cells that was dependent on the host region. Efficient neuronal differentiation of EB cells occurred within an adjacent region to the rostral migratory stream. EB cell differentiation was initially patchy and progressed toward an even distribution along the graft by 15–21 days post-transplantation, giving rise mostly to GABAergic neurons. EB cells in the striatum displayed a lower level of neuronal differentiation and derived into a significant number of astrocytes. Remarkably, when EB cells were transplanted to the striatum of adult rats after a local ischemic stroke, increased number of neuroblasts and neurons were observed. Unexpectedly, we determined that the adult substantia nigra pars compacta, considered a non-neurogenic area, harbors a robust neurogenic environment. Therefore, neurally uncommitted cells derived from ESCs can detect regions that support neuronal differentiation within the adult brain, a fundamental step for the development of stem cell-based replacement therapies. *STEM CELLS* 2015;33:491–502

### INTRODUCTION

Neurogenic niches in the adult brain provide the cues for maintenance, proliferation, and differentiation of neural stem cells (NSCs), such that different subtypes of neurons are generated in specific areas [1, 2]. Neurogenesis occurs throughout lifespan in two regions of the adult mammalian brain: the subgranular zone of the hippocampus and the subventricular zone (SVZ) of the lateral ventricles (LV) and its prolonging rostral migratory stream (RMS) [3]. Furthermore, experimental evidence indicates that a brain injury can induce the proliferation of neural precursor cells (NPCs) of the SVZ and their migration toward the damaged neostriatum; this damage apparently allows differentiation with regional specificity of some arriving neuroblasts [4, 5]. Thus, neurogenesis in the adult brain is a continuous process in few areas but could be regulated in other

regions where alterations of the microenvironment might modify their capability to support neurogenesis.

Neurorepair through stem cell transplantation has been envisaged as a promising approach to treat the damaged central nervous system (CNS). Despite the extensive progress in the field, the cellular source most appropriate to restore neuronal losses remains uncertain. One option is to transplant the lacking neuron type, in which case, functional interactions with the host circuits are desirable rather than transplanted neurons acting only as a source of the deficient neurotransmitter [6, 7]. Alternatively, transplantation of NPCs may allow better interaction with the host as a result of in situ neuronal differentiation. However, transplantation of expanded NPCs commonly has shown astrocytic differentiation with little or no neuronal differentiation detected [8, 9]. Recent data suggest that this

differentiation outcome is due to an intrinsic property of transplanted NPCs [10], leaving open the question: what is the permissiveness of the adult brain for specific differentiation?

Embryonic stem cells (ESCs) have been considered suitable for neuronal replacement, because extrinsic and/or intrinsic signals can direct specific neuronal differentiation [6, 11–15]. Embryoid body (EB) cells derived from ESCs undergo neural differentiation in the adult brain but, presently, it is not clear whether this differentiation is dependent on the transplantation site, brain damage, or result from a default mechanism with little or no influence of the host environment [16, 17]. Our previous studies demonstrated that neurally uncommitted cells in EBs exhibit high neurogenic potential and the ability to differentiate according to the site of implantation in the embryo [18]. In this study, we transplanted EB cells to known neurogenic and non-neurogenic sites of the postnatal rat brain as well as to an adult brain site after injury. We demonstrated that EB-derived cells possess the ability of sensing environmental cues in the postnatal/adult rat brain that allow or induce neural differentiation.

## MATERIALS AND METHODS

### ESC Culture

The mouse ESC line R1B5, which constitutively expresses the green fluorescent protein (GFP) (gift from Andras Nagy), was used for all studies. To produce EBs [18], ESCs were propagated on gelatin-coated culture plates with feeder cells in ESC medium (M15). Before aggregation, trypsin-dissociated cells were seeded on 10 cm feeder-free gelatin-coated dishes and cultured in M15 medium supplemented with 1,000 U/ml of leukemia inhibitory factor (LIF; Chemicon, Temecula, CA, <http://www.chemicon.com>) for 3 days. To form EBs,  $2 \times 10^6$  ESCs were seeded in nonadherent 10 cm bacterial culture dishes and cultivated during 3.5–4 days without LIF. Subsequently, EBs were rinsed with M15, disaggregated with 1 ml of 0.25% trypsin, and centrifuged at 1,000 rpm for 3 minutes. Finally, the cells were suspended in 50  $\mu$ l of Optimem medium (Gibco, Grand Island, NY, <http://www.invitrogen.com>) for implantation.

### Animals

Animals were housed under standard colony conditions: 12:12 light/dark cycle, controlled room temperature ( $22 \pm 1^\circ\text{C}$ ), and ad libitum access to food and water. All studies were conducted according with principles and procedures approved by the local bioethical committee of the Universidad Nacional Autónoma de México.

### Transient Middle Cerebral Artery Occlusion

To induce ischemia by the middle cerebral artery occlusion procedure (MCAO; [19]), an incision was made in the neck of animals anesthetized with xylazine (8 mg/kg) and ketamine (100 mg/kg) (Pisa Agropecuaria, Méx., Méx., <http://www.pisaagropecuaria.com.mx>) and, subsequently, the external carotid, the left occipital artery, and the left pterygopalatine artery were cauterized. Later, a 4-0 nylon monofilament suture with silicon (Doccol Co., Sharon, MA, <http://www.doccol.com>) was introduced via the left external carotid artery stump into the lumen of the internal carotid artery until occluded the middle cerebral artery. After 90 minutes, the

suture was withdrawn and the wound closed. For sham control animals, the same surgery procedure took place, except that the suture was not inserted.

### Cell Transplantation

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

### Real-Time Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction Procedures

Total RNA was extracted from EB cells with TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA, <http://www.invitrogen.com>) following the manufacturer’s instructions. The purified RNA was used as template for cDNA synthesis using AMV Reverse Transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA, <http://www.invitrogen.com>) and oligo-dT<sub>16</sub> primer. The quantitative polymerase chain reaction reaction was performed with KAPA SYBR FAST kit (KAPA Biosystems, Wilmington MA, <http://www.kapabiosystems.com>) in the Rotor-Gene 3000 thermocycler (Corbett Research, Qiagen, Valencia CA, <http://www.qiagen.com>). All oligonucleotides used are listed in Supporting Information Table 1. To evaluate gene expression, a comparative C<sub>t</sub> ( $\Delta\Delta\text{C}_t$ ) method was used.

### Histological Procedures and Immunofluorescence

For post-transplantation analysis, rats were deeply anesthetized with pentobarbital and perfused intracardially with 100 ml of 0.1 M phosphate buffered saline (PBS) followed by 100 ml of 4% paraformaldehyde (PFA). Brains were postfixed in 4% PFA and cryoprotected by sequential 24-hour washes in 10%, 20%, and 30% sucrose (in PBS). Afterward, brains were sliced with a cryostat at 40  $\mu$ m in coronal or sagittal plane and collected in PBS. Standard procedures for hematoxylin and eosin (H&E) staining and cell death detection (In Situ Cell Death Detection Kit; Roche, Basel, Switzerland, <http://www.roche-applied-science.com>) were performed for general characterization of tissues (see Supporting Information Fig. S1, S2). For immunofluorescence, brain slices were rinsed three times in PBS/0.3% Triton X-100, treated with 1 $\times$  immuno DNA-Retriever in citrate buffer (Bio SB, Santa Barbara, CA, <http://www.biosb.com>) at 65°C for 30 minutes, washed three times, and incubated with the primary antibodies (listed in Supporting Information Table 2) in the blocking solution [0.1 M PBS/0.3% donkey serum (Gibco, Grand Island, NY, <http://www.invitrogen.com>)/0.3% bovine serum albumin (BSA)

(Sigma-Aldrich, Mexico, <http://www.sigmaaldrich.com>) overnight at 4°C. After rinsing in PBS, slices were incubated for 2 hours at room temperature with the corresponding secondary antibody (listed in Supporting Information Table 2). Finally, the sections were rinsed with PBS, and the far-red emitting fluorescent DNA dye DRAQ5 (1:5,000; Biostatus Limited, Shepshed, Leicestershire, UK, <http://www.biostatus.com>) was added to the final rinse to counterstain cell nuclei. The tissue was mounted in Superfrost slides (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA, <http://www.thermofisher.com/en/home.html>) with Dako fluorescent mounting medium.

### Microscopy and Cell Counting

We used images acquired in Olympus FV1000 or ZEISS LSM 510 confocal microscopes. For cell counting, three images in Z stack from the graft were obtained at 40× magnification. We used one brain slice from three to six different animals (corresponding to “n” rats in Results section) to count each differentiation marker. GFP+/differentiation marker+ cells were counted manually using the image analysis software ImageJ or the one linked to the corresponding microscope used. In some instances, pseudocolors were assigned to some signals to improve image appreciation. Data are presented as the average percentage ± SD.

## RESULTS

### Neuronal Differentiation of EB Cells Transplanted to a Neurogenic Area of the Postnatal Brain

In order to determine whether the postnatal rat brain provides a favorable environment for neuronal differentiation, EB cells at a stage where they are not committed to become neural cells were transplanted. Most transplantation studies have used differentiated neurons or NPCs [8, 9], limiting the evaluation of microenvironment influence on cell differentiation. EB cells to be transplanted expressed more than 30-fold higher levels of the epiblast marker *Fgf5* in comparison with undifferentiated ESC (Fig. 1A). The majority (at least 70%; Supporting Information Fig. S3) of these EBs were not cavitated and composed of epiblastic cells, as indicated by the co-expression of *Oct4* and *Fgf5* (Fig. 1C). Importantly, we detected very low expression levels of neural marker genes in EBs as in ESCs (Fig. 1B), but expression of *Zfx1b*, which has been associated with a preneuralization stage [21], increased up to 20-fold in EBs in comparison with ESC (Fig. 1A). Nonetheless, cells of EBs at this stage can differentiate into cell lineages of the three germ layers, and when cultured (within floating EBs) in a neural medium without growth factors did not differentiate into neural cells ([11, 18] and data not shown).

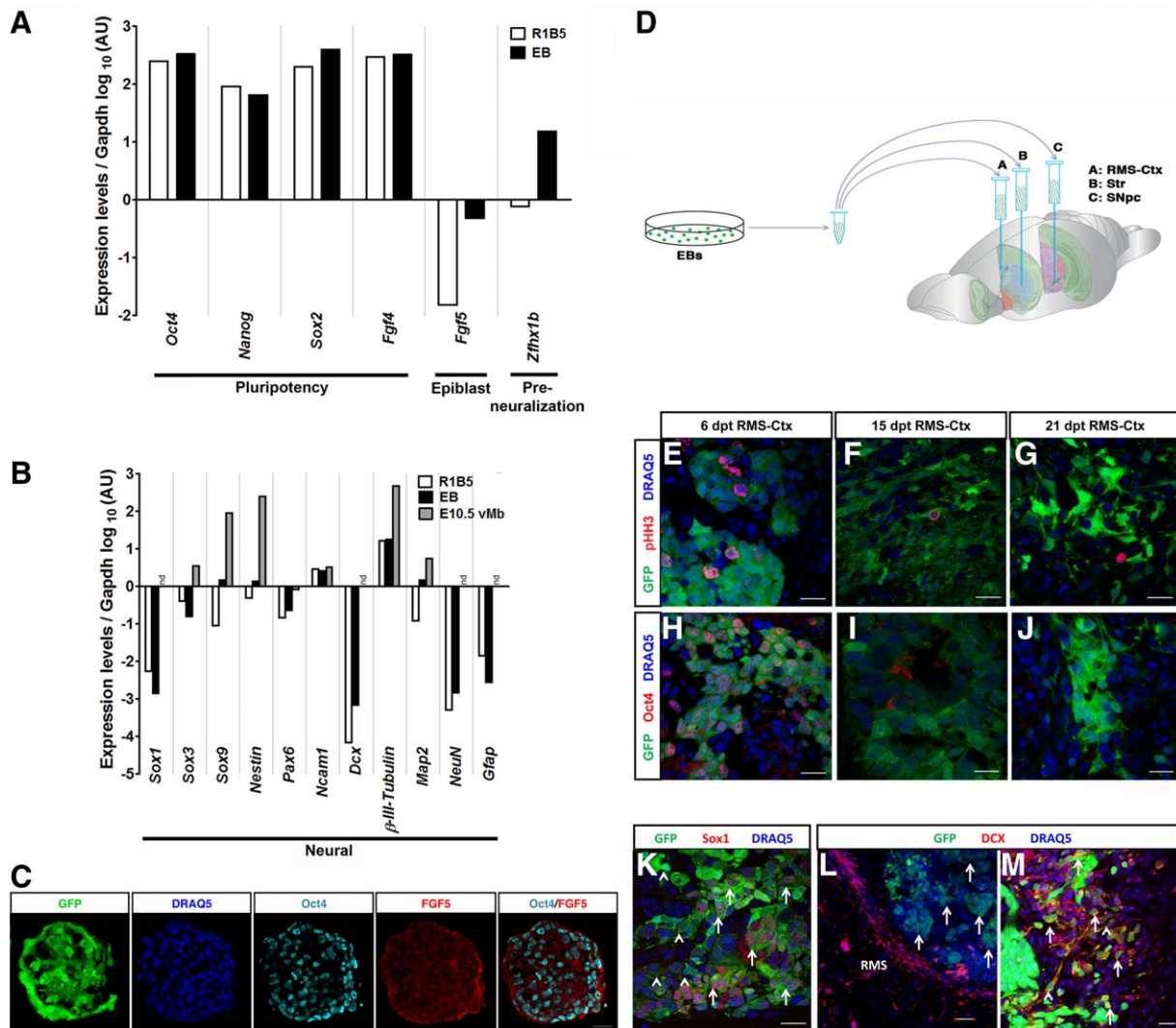
Dissociated EB cells were transplanted adjacent to the known neurogenic area covering the anterior region of the LV and the proximal RMS (Fig. 1D). EB-derived cells were able to survive and initiate neural differentiation at the anterior LV (data not shown) as well as near the RMS with similar efficiency. In the latter region, the graft covered an area comprised between the RMS and the cortex (hereinafter referred as RMS-Ctx area), and the fate of the transplanted cells was analyzed in more detail. Very few and small group of cells throughout the graft at 6 days post-transplantation (dpt) were detected positive for the mitotic marker phospho-Histone-H3 (pHH3) (Fig. 1E; Supporting Information Fig. S4) and the pluripotency marker

*Oct4* (Fig. 1H), which number rapidly decreased at a later time (Fig. 1E–1J; Supporting Information Fig. S4). These data indicate that, at least from 15 dpt, the majority of implanted EB-derived cells have reached the postmitotic stage and lost pluripotency, supporting that transplanted cells are undergoing differentiation and are not prompt to initiate tumorigenesis. Abundant cell death occurred at early stages (i.e., up to 3 dpt) around the graft and, then, only scattered apoptotic cells were found; interestingly, most dying cells detected were associated with the host (Supporting Information Fig. S2).

At 6 dpt, most EB-derived cells were aggregated and showed round shape morphology (green cells in Fig. 1E, 1H, 1K–1M). At this early stage, a significant graft survival was observed (Supporting Information Fig. S1, S2) and a consistent (six out of six successful transplantation events) high proportion of implanted cells became NPCs as indicated by the number of Sox1+ cells (an estimate of at least 50%,  $n = 6$ ) (Fig. 1K), but few cells were positive for Doublecortin (DCX), a marker of neuroblasts and immature neurons (Fig. 1L, 1M). Initial interactions with the host environment were indicated by some patchy areas of cells, mostly positive for DCX, with leading processes on the border of the graft (Fig. 1M).

By 15 dpt, surviving implanted cells were observed throughout the graft with a more even distribution and differentiated morphology (Fig. 2). Apparently, the proportion of Sox1+ NPCs was reduced ( $26.56 \pm 5.22\%$  of grafted cells,  $n = 6$ ; Fig. 2A, 2I), whereas the number of cells immunoreactive for DCX markedly increased ( $59.55 \pm 12.22\%$  of grafted cells,  $n = 6$ ; Fig. 2B, 2I). Notably, many implanted cells already reached neuronal maturity as demonstrated by their NeuN nucleus staining ( $33.98 \pm 4.89\%$  of grafted cells,  $n = 6$ ; Fig. 2C, 2I). These data indicate that 15 dpt was sufficient for most of the surviving EB-derived cells to get committed into the neural phenotype within the postnatal brain environment, although many cells were still in transition to become terminal differentiated neurons. We also noted that many GFP–/DCX+ cells intermingled throughout the graft at 15 dpt (Fig. 2J); the origin of these GFP–/DCX+ cells needs further investigation. Only occasionally, DCX+/GFP+ cells acquiring a similar shape and chain migration alignment of endogenous neuroblasts migrating toward the olfactory bulb (OB) were observed (Fig. 2K).

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



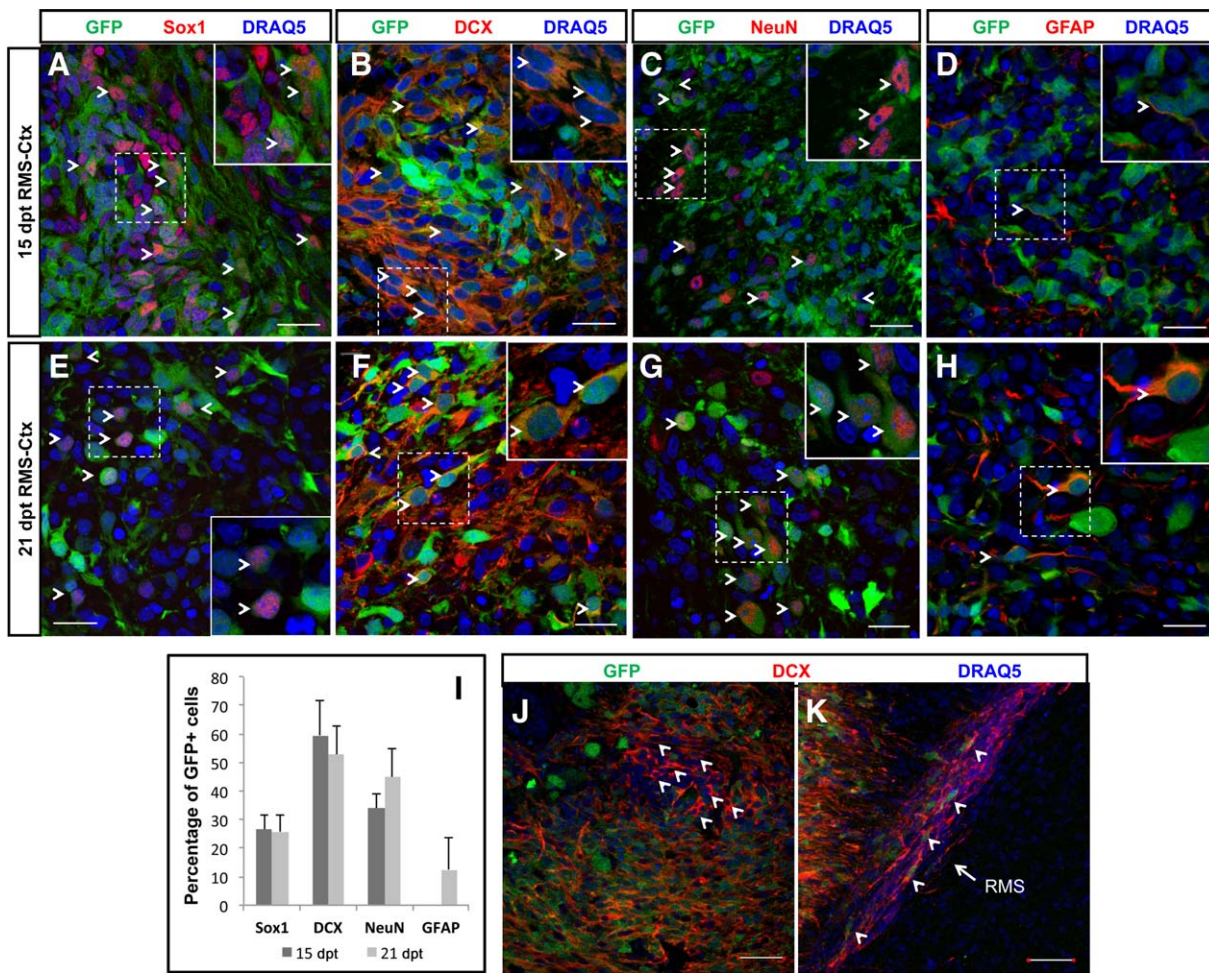
**Figure 1.** Early neural differentiation of EB cells in a neurogenic region of the postnatal rat brain. **(A, B)**: Expression levels of pluripotency, epiblast, preneuralization and neural genes in EB cells and embryonic stem cells (ESCs) (R1B5) before transplantation relative to the expression of the constitutive gene *Gapdh* ("0"); in some cases, the expression levels in E10.5 ventral midbrain (E10.5 vMb) were determined (nd, not determined), although it should be noted that the expression of neuronal genes (i.e.,  $\beta$ -III-Tubulin, *Map2*) was low because neurogenesis is just starting at this developmental stage. **(C)**: Immunolocalization of Oct4 and *Fgf5* in cells of EBs that were present in the highest proportion of the ones commonly collected for transplantation (see also Supporting Information Fig. S3). **(D)**: Schematic representation of the procedure used in the present work; EB cells before neuralization were dissociated and implanted into the proximal RMS (RMS-Ctx), the Str, and the SNpc. **(E–G)**: Mitotic activity of grafted EB cells (indicated by phosphorylated histone 3; pHH3) at 6, 15, and 21 dpt. **(H–J)**: Detection of the pluripotency marker Oct4 at 6, 15, and 21 dpt. Proliferating cells and Oct4 expression were detected at 6 dpt but not at 21 dpt. **(K–M)**: Confocal micrographs of sections containing implanted EB-derived cells (GFP+) at 6 dpt immunostained for Sox1 or DCX (some positive cells pointed by arrows in (K) and (M), respectively); arrowheads point to GFP+ cells lacking Sox1 expression (K) and some exhibiting cellular outgrowths (M). Aggregates of GFP+ cells (arrows) adjacent to DCX+ cells in the RMS site of transplantation are shown (L). Asterisk indicates an undifferentiated cell aggregation. Together, these data indicate that EB cells were grafted before neuralization and, therefore, neuronal differentiation was achieved progressively in the graft-brain microenvironment. Scale bars: (C, E–J, K, M), 20  $\mu$ m; (L), 100  $\mu$ m. Abbreviations: DCX, doublecortin; EB, embryoid body; GFP, green fluorescent protein; RMS, rostral migratory cortex; RMS-Ctx, area between RMS and cortex; SNpc, substantia nigra pars compacta; Str, striatum.

possibly instructive for neuronal and glial differentiation, although neuronal appears to be the favored fate.

### Interneuronal Fate of EB Cells Transplanted to the RMS-Ctx

Around 50% of grafted cells reached the neuronal fate 3 weeks after transplantation; thus, we decided to analyze whether these EB-derived neurons showed any specific phenotype. We

were particularly interested in the neuronal fates typical of neuroblasts of the SVZ/RMS, which provide most of the periglomerular neurons (PGN) forming the glomerular layer of the OB [22]. The major phenotype found in PGN cells is the GABAergic, which can be detected by the presence of the GABA synthesizing enzyme GAD67. Moreover, distinct GABAergic interneuronal subpopulations differentially express tyrosine hydroxylase (TH), a marker of dopaminergic neurons, and two



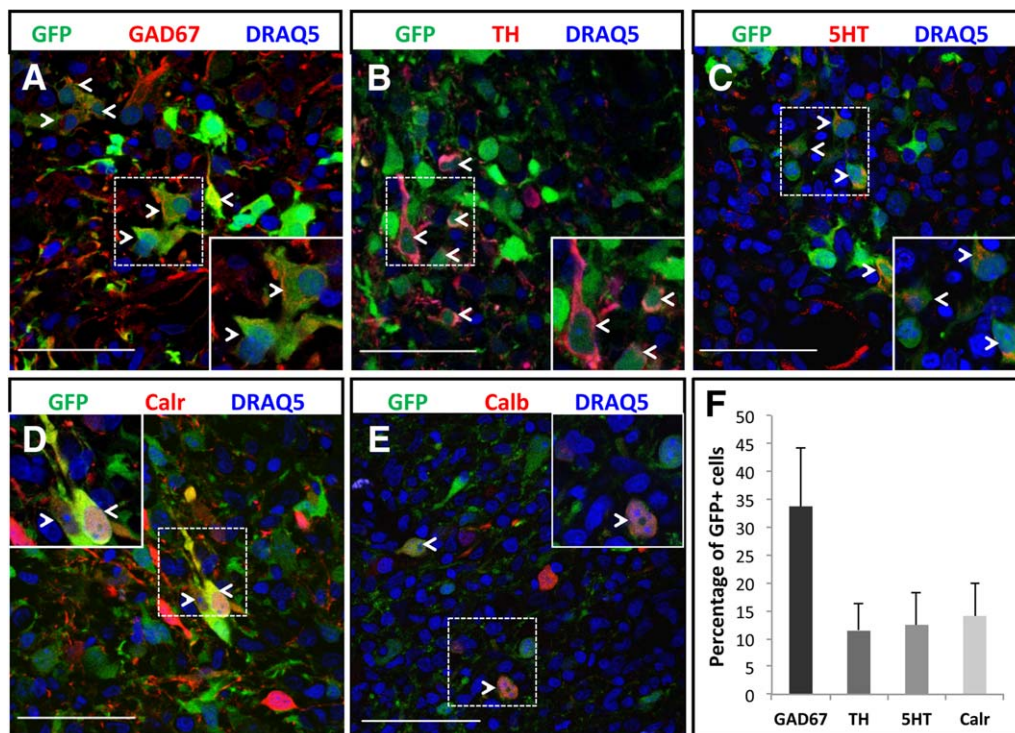
**Figure 2.** Progressive expression of neuronal differentiation markers in grafted embryoid body (EB)-cells within the RMS-Ctx postnatal region. Neural fate of grafted cells into the RMS-Ctx area was analyzed at 15 and 21 dpt. (A, E): Many EB cells still exhibited neural progenitor identity as indicated by the expression of Sox1, although by 21 dpt, Sox+ cells appeared more disperse. (B, F): A high proportion of grafted cells stained against DCX, indicating differentiation into neuroblasts/immature neurons. (C, G): Differentiation of EB cells into mature neurons, as indicated by the presence of NeuN, was evident since 15 dpt with a mild increase by 21 dpt. (D, H): Few grafted EB cells acquired the astroglial phenotype (GFAP+) mainly detected at 21 dpt. (I): Quantification of grafted GFP+ cells expressing the neural differentiation marker indicated at 15 and 21 dpt; error bars represent SD. (J): Some DCX+/GFP- cells were found intermingled within the graft. (K): Occasionally, some neuroblasts derived from the transplanted cells integrate within the RMS. Squares depict the area of higher magnification. Arrowheads point to positive cells. Scale bars = (A–H) 20 μm; (J, K) 50 μm. Abbreviations: DCX, doublecortin; GFP, green fluorescent protein; GFAP, glial fibrillary acidic protein; RMS, rostrla migratory stream; RMS-Ctx, area comprised between the rostral migratory stream and the cortex.

calcium-binding proteins, calretinin (Calr) and calbindin (Calb) [23]. Three-weeks after transplantation, 33.71% ± 10.61% of cells were GAD67+ (*n* = 6; Fig. 3A, 3F). Among the implanted cells, 11.41% ± 4.99% and 14.06% ± 5.89% were TH+ and Calr+, respectively (*n* = 6; Fig. 3B, 3D, 3F), whereas Calb+ cells were consistently detected throughout the graft but in a low proportion (Fig. 3E). In addition, 12.48% ± 5.8% of differentiated EB cells were 5HT+ serotonergic neurons (*n* = 6; Fig. 3C, 3F). The groups of GABAergic cells or any other analyzed phenotype appeared distributed throughout the transplant and were not confined to a particular region (e.g., close or far from the RMS). Therefore, although some neurons (near 40%–60%) derived from the transplanted EB cells shared markers with those generated during postnatal neurogenesis in the RMS pathway, the terminal phenotypes that can arise appeared to be wider.

The differentiation into specific neuron types is determined by transcription factors that specify NSCs into particu-

lar lineages. In order to distinguish among the large diversity of interneuron subtypes existing in the adult brain, we estimated their putative lineage identity by detecting markers before terminal differentiation, particularly those present in precursors of OB subtypes. Pax6 in cooperation with Dlx2 specify the dopaminergic identity of PGN in the adult OB [22, 24]; during differentiation, the majority of DCX+ neuroblasts of the PGN lineage express Dlx2+. A substantial proportion of transplanted cells were detected with the PanDlx antibody [25] at 6 dpt (Fig. 4A), but afterward, grafted cells were rarely positive for any Dlx protein (*n* = 6; Fig. 4B, 4C). On the other hand, transplanted cells occasionally expressed Pax6 since early stages of EB cell differentiation (*n*=6; Fig. 4D–4F). We analyzed also the expression of Trb1, a T-box transcriptional factor found in GAD67- and Dlx- postmitotic neuroblasts of the proximal RMS that derive into OB glutamatergic neurons [24]. The scarce number of Tbr1+





**Figure 3.** Neuronal subtypes derived from transplanted embryoid body cells in the postnatal area comprised between the rostral migratory stream and the cortex region. Neuronal subtypes were determined at 21 dpt. Many grafted cells contained GAD67 (**A**), indicative of GABAergic identity, whereas fewer had the catecholaminergic marker TH (**B**), or the serotonergic marker 5-HT (**C**). Also, a discrete percentage of GFP+ cells were positive against the calcium-binding proteins calretinin (**D**) and calbindin (**E**). (**F**): Quantification of grafted cells expressing the neuronal phenotype marker indicated; error bars represent SD. Squares depict the area of higher magnification. Arrowheads point to positive cells. Scale bars = 50  $\mu$ m. Abbreviations: Calr, calretinin; Calb, calbindin; GFP, green fluorescent protein; TH, tyrosine hydroxylase.

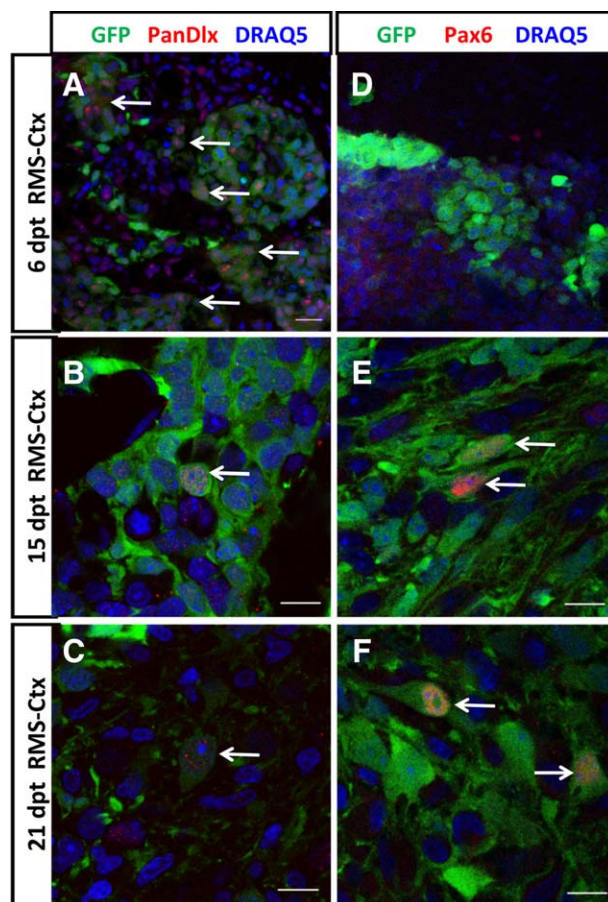
cells observed indicates that grafted cells did not acquire the glutamatergic neuron identity (data not shown). Therefore, apparently, most EB-derived cells acquire an interneuronal GABAergic phenotype that is not specific of the RMS-OB system, suggesting that the RMS-Ctx area encloses neurogenic cues but lacks signals favoring EB cell specification within a particular lineage.

### Neuronal Differentiation of EB Cells in a Non-Neurogenic Region of the Postnatal Brain

In order to determine whether survival and neural differentiation pattern of EB cells in the postnatal brain occurs regardless of the graft region, we assessed the fate of transplanted EB cells in the postnatal striatum, a considered non-neurogenic region. In general, neural differentiation in this area was uneven throughout the graft and variable among transplanted animals (Supporting Information Table 3). At 15 dpt, only some areas of the graft showed a significant proportion of GFP+ cells expressing Sox1 or DCX ( $n = 4$ ), which remained low by 21 dpt, except for an apparent discrete increase in DCX+ cells ( $n = 4$ ; Fig. 5A, 5B, 5E, 5F; Supporting Information Table 2). Of note is that NeuN was rarely detected at 15 dpt but, at 21 dpt, NeuN+ cells were evident but only in few areas throughout the graft ( $n = 4$ ; Fig. 5C, 5G; Supporting Information Table 3). Remarkably, some patches of transplanted cells expressing GFAP were observed since 15 dpt, and the proportion of GFAP+ cells reached up to 50% in patches at 21 dpt ( $n = 4$ ; Fig. 5D, 5H; Supporting Information Table 3), indicating efficient EB cell dif-

ferentiation into astrocytes, a fate that was rare in cells grafted in the RMS-Ctx region. Together, our data indicate that the postnatal striatum appears to be a less favorable region for neuronal differentiation and, in contrast to the RMS-Ctx area, is more permissive and/or instructive for astrocyte differentiation.

Given that neurogenic conditions might be associated with juvenile brains, we were prompted to determine whether EB cells are also able to detect microenvironments permissive for neuronal differentiation in the adult rat brain. We used MCAO lesion model to assess whether EB cells can sense the transition of the striatum, from the poor neurogenic condition observed in the undamaged brain (Fig. 5), to a potentially neurogenic condition after injury [4, 5]. Interestingly, transplantation at the subacute phase of injury (8 days after the MCAO) gave rise to a proportion of grafted EB cells with Sox1 or DCX neural markers. At 15 dpt, although fewer than in brains of rats at the early postnatal age tested, the proportion of Sox1+ cells reached  $39\% \pm 4.6\%$  ( $n = 3$ ; Fig. 6A, 6E, 6I), whereas that of DCX+ cells increased up to  $45\% \pm 5.23\%$  ( $n = 3$ ; Fig. 6B, 6I); the latter contrast with the  $3.9\% \pm 0.36\%$  observed in the nondamaged striatum ( $n = 3$ ; Fig. 6F, 6I). NeuN was detected in  $12\% \pm 6.1\%$  of grafted cells at 15 dpt ( $n = 3$ ; Fig. 6C, 6I), whereas in the intact striatum very few NeuN+ cells were found (Fig. 6G). Additionally, EB-derived GFAP+ cells in the injured striatum were detected in a similar proportion (1%–3%) when compared to grafts in the intact striatum (Fig. 5D, 5H). Therefore, it appears that injury promotes the onset of a condition that favors neurogenesis and EB cells can detect this transition. Noteworthy, in the normal or damaged-adult



**Figure 4.** Specification markers of rostral migratory stream (RMS) neuronal lineages in grafted embryoid body (EB)-derived cells. At 6 dpt, many grafted cells expressed at least one member of the Dlx transcription factor family as determined with the PanDlx antibody (A); however, progressively (6–21 dpt), fewer cells retained the expression of these transcription factors (B, C). In addition, very few EB-derived cells expressed Pax6 at any time point analyzed (D–F), in agreement with their poor periglomerular dopaminergic differentiation. Except for PanDlx+ cells shown in (A), the positive cells for PanDlx and Pax6 antigens shown in other panels (B–F) are among the rare cases found. Arrows point to positive stained cells. Scale bars = 10  $\mu$ m. Abbreviations: GFP, green fluorescent protein; RMS-Ctx, area comprised between the rostral migratory stream and the cortex.

striatum no GAD67+ cells were detected, suggesting that differentiation into this phenotype might be regulated/facilitated by the RMS-Ctx microenvironment.

#### Differentiation of EB Cells in the Adult SNpc

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

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

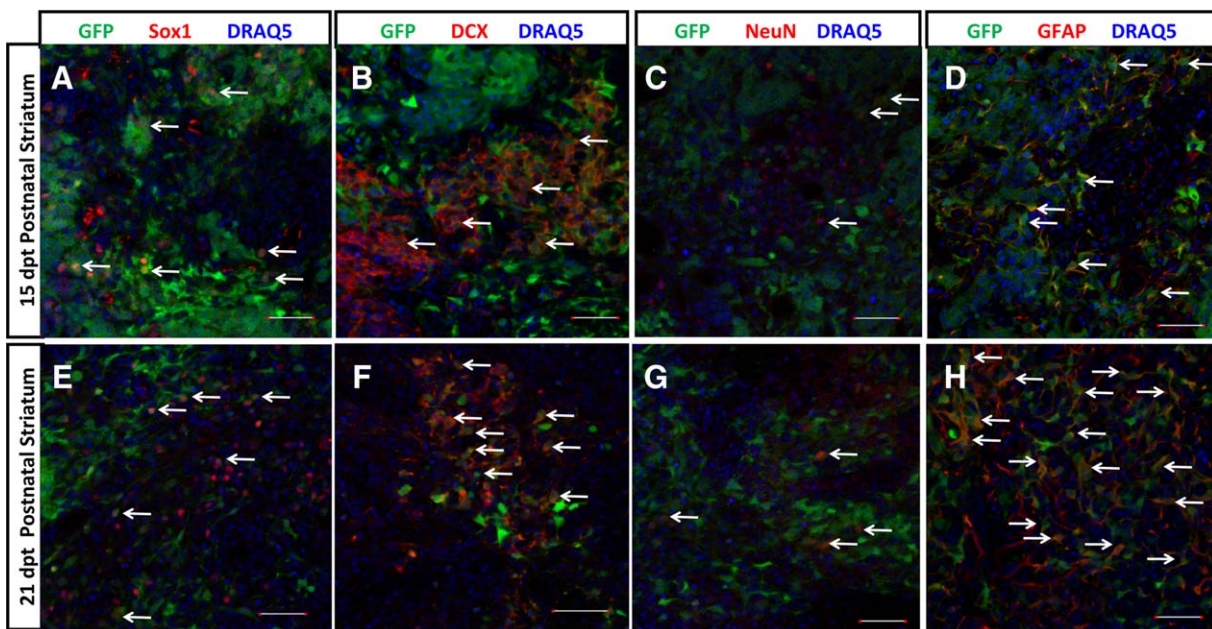
#### DISCUSSION

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

#### Neuralization and Neurogenesis of Naïve Stem Cells

The fate of putative NPCs in the adult brain observed in several studies [29] is likely due to their intrinsic properties. In an interesting study, embryonic neuronal- and glial-restricted NPCs transplanted to the adult striatum and spinal cord differentiate and show long-term survival in the absence of an immunosuppressant [30]. In another example, NPCs expanded as neurospheres, which are prompted to become astrocytes within an embryonic neurogenic environment [10], also favor this fate in the adult brain [8, 9]. Therefore, evaluation of a milieu suitable for neurogenesis in the adult brain requires the use of uncommitted NPCs with strong neurogenic potential whose fate depends on extrinsic signals. EB cells appear to convey this requirement since transplanted cells in neurogenic environments of the embryo [18] or of the postnatal and adult brain (this study) give rise to a high proportion (up to 70%) of neurons and neuronal precursors with a discrete proportion of astrocytes produced.

Neuronal differentiation in our postnatal conditions was a progressive process. Our data suggest that cell proliferation is not required for EB cell differentiation, but selective cell survival shortly after transplantation could contribute to the high neuralization efficiency. However, our previous transplant-



**Figure 5.** Neural phenotype of embryoid body (EB)-derived cells in the postnatal striatum. The presence of neural markers was determined at 15 and 21 dpt in discrete areas of the graft. In general, the proportion of grafted cells with the neural markers analyzed in different rat brains was more consistent at 15 dpt than at 21 dpt (see Supporting Information Table 3). At 15 dpt, a significant number of Sox1+ (**A**) and DCX+ (**B**) cells were determined that contrast with the rare detection of NeuN+ cells (**C**) and relatively abundant, in comparison with grafts in the area comprised between the rostral migratory stream and the cortex region, GFAP+ cells (**D**). Patchy distribution of neural markers within the graft was common at 21 dpt (**E–H**), with an apparent increase in NeuN+ (**G**) and GFAP+ (**H**) cells. Arrows point to positive cells. Scale bars = 50  $\mu$ m. Abbreviations: DCX, doublecortin; GFP, green fluorescent protein.

explant experiments rather favor efficient responsiveness to neuralizing factors of competent EB cells [18]. The emergence of neural markers in transplanted cells suggests differentiation from neurally uncommitted ectodermal cells (Oct4+/Fgf5+) up to becoming mature neurons (NeuN+). Only few putative astrocytes (GFAP+ cells) were detected, thus, neuronal differentiation is the preferred fate of EB cells under the influence of neurogenic areas of the postnatal brain.

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

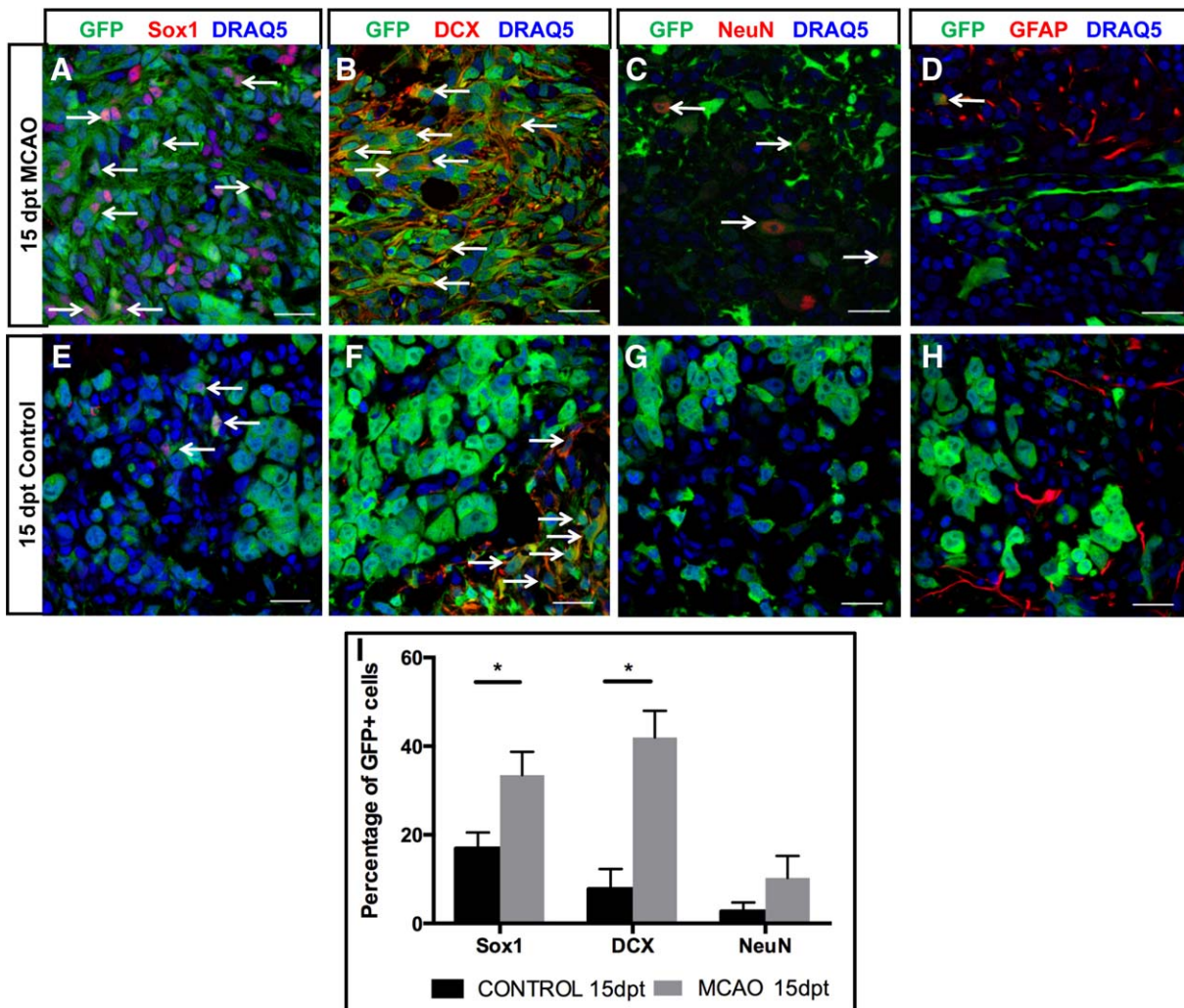
#### Non-Site-Specific Neuronal Differentiation of Transplanted EB cells

In the past, it has been difficult to demonstrate site-specific differentiation of NSCs after grafting in the adult brain due to the lack of proven cells with a wide differentiation potential. Neuronal specific differentiation depends on signals that instruct precursor cells to follow a particular lineage, and signals that promote differentiation itself. EB cells are competent to respond to specification signals [18] and, therefore, the

surrounding environment of the adult brain could guide their neuronal fate. The neuronal phenotype of differentiated EB cells in the RMS-Ctx region was coincident with the possibility of differentiation into the major subtypes of OB interneurons. However, cells transplanted next to the RMS only occasionally appeared attracted towards this structure, which contrast with the migration through the RMS and integration into the OB of cells from the embryonic lateral ganglionic eminence when grafted alongside the postnatal SVZ [33]. In addition, we found only few cells expressing a *Dlx* gene or *Pax6*, genes required for the generation of OB interneurons. Therefore, EB cells can sense neurogenic cues present in the postnatal brain, but the RMS-Ctx region is not providing the instructive signals needed for NPC specification. The lack of specification signals in the adult brain is not unexpected since most somatic stem cells behave as committed and, thus, do not require the specification signals present in the embryo to differentiate into specific cell types [33–35]. The higher proportion of GABAergic neurons in comparison with other neuronal phenotypes suggests that the RMS-Ctx environment is more suitable for EB cells to reach certain fates. We have not observed the same set of phenotypes or proportion of them in neurons derived from EB cells grafted in other areas of the postnatal brain, supporting the idea that EB cells have no bias to particular neuronal fates.

#### Neuronal Differentiation in Non-Neurogenic Areas of the Adult Brain

Presently, there is no doubt that the adult brain can produce neurons de novo, but the limits of this capacity are not defined yet. The postnatal age or environmental/physiological conditions could influence the neurogenic capacity of certain brain



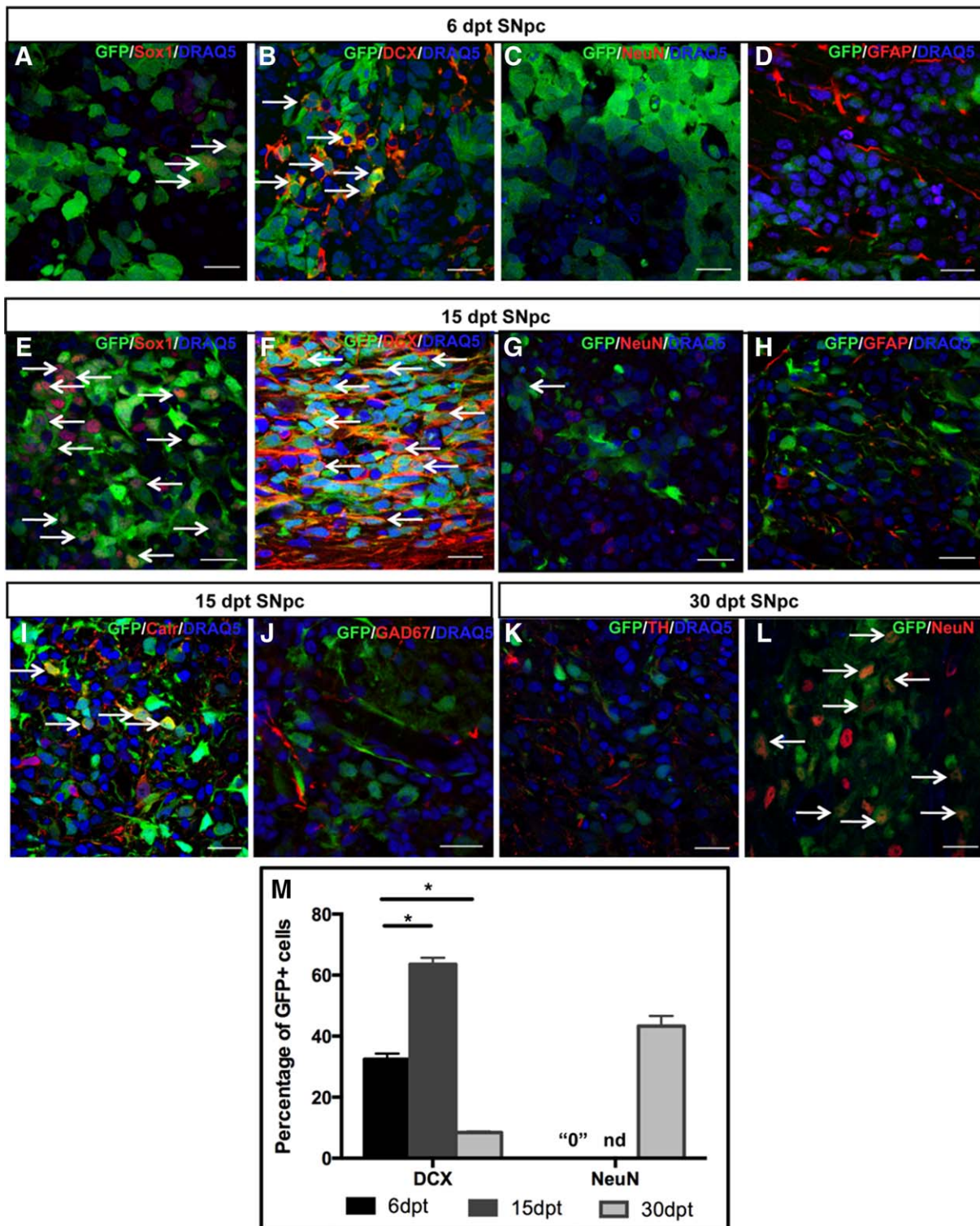
**Figure 6.** Differentiation of embryoid body (EB) cells in the injured adult striatum. The presence of neural markers was determined at 15 dpt in intact (control) or injured (MCAO model) striatum. Higher proportion (see text) of grafted cells were Sox1+, DCX+, and NeuN+ in the injured (A–C) than in the control (E–G) striatum indicating neuronal differentiation induction upon stroke. Interestingly, astrocytic differentiation was not stimulated by injury as indicated by the lack of GFAP marker in grafted cells (D, H). (I): Quantification of grafted cells expressing the neural phenotype marker indicated; error bars represent SD (\*,  $p < .05$ ). Arrows point to positive cells. Scale bars = 20  $\mu$ m. Abbreviations: DCX, doublecortin; GFP, green fluorescent protein; GFAP, glial fibrillary acidic protein; MCAO, middle cerebral artery occlusion.

areas. In addition, it remains to be determined the repair capacity of the brain upon damage. In the postnatal striatum, the low number of neuroblasts (DCX+) disposed in some patches throughout the graft correlates with the few neurons (NeuN+) found, which considerably differs from the proportions of these cells determined in the RMS-Ctx region. Concurrently, a relatively high level of EB-derived GFAP+ cells was determined from the earliest post-transplant stage, and the progressive increase observed in these putative astrocytes was exclusive for this postnatal zone. Together, these results suggest that the postnatal striatum promotes astrocytic differentiation of EB cells, probably at the expense of neuronal differentiation.

In contrast with the striatum of a young brain, very few cells expressing neural markers were found in the adult striatum, indicating that conditions are not appropriate for neural differentiation. Interestingly, this differentiation pattern was drastically reversed after the MCAO treatment and now EB cells gave rise to some GFAP+ cells and many NeuN+ neurons, among which, few were TH+. These data suggest that, at least in the striatum,

an ischemic damage generates an environment that promotes neuronal differentiation of EB cells and probably, also, of endogenous NPCs attracted to the injured region. Our results differ from those previously reported showing that EB cells transplanted to normal [16] or Parkinson’s Disease (PD) damaged striatum [17] of immunosuppressed rats spontaneously differentiate into dopaminergic and serotonergic neurons. The results shown here were in the absence of immunosuppressants and, consequently, our transplantation experiments required more cells than in those reports. It is apparent that, under our conditions, resident factors in the adult brain influenced the final differentiation outcome, though we cannot discard the participation of factors from transplanted EB cells. Therefore, our data suggest that EB cells can sense environmental changes after a brain injury, which improves the capacity to promote neurogenesis.

The ability of EB cells to differentiate into mature neurons in the intact SNpc was unexpected and intriguing. In vivo neurogenesis is controversial in this brain structure [26, 27]. In those studies that support neurogenesis in the SNpc, very few



**Figure 7.** Neuronal differentiation of embryoid body (EB) cells in the adult SNpc. EB cells were transplanted to the SNpc of adult rat brain, and the presence of neural markers was determined at 6, 15, and 30 dpt. At 6 dpt, few EB-derived cells expressed Sox1 (**A**) although already clusters of DCX+ cells were found (**B**). NeuN+ cells were not detected (**C**) and glial differentiation was not noticed (**D**). Induction of neurogenesis was evident at 15 dpt, stage at which many grafted cells were positive for Sox1 (**E**) and a marked increase in DCX+ cells was observed (**F**). Supporting a strong neurogenic activity in the SNpc, few NeuN+ cells were detected at 15 dpt (**G**), but a significant proportion of cells had the neuronal marker at 30 dpt (**L**) whereas glial differentiation remained absent (**H**). Neurons expressing calretinin were found (**I**) but none expressed GAD67 (**J**) or tyrosine hydroxylase (**K**). (**M**): Quantification of grafted cells expressing the neuronal marker indicated at different dpt; error bars represent SD ( $p < .001$ ). No NeuN+ cell was found at 6 dpt ("0") and the number of those few found at 15 was not determined (nd). Arrows point to positive cells. Scale bars = 20  $\mu$ m. Abbreviations: DCX, doublecortin; GFP, green fluorescent protein; SNpc, substantia nigra pars compacta.

new neurons appears to be produced in both normal and PD brains, although putative NSCs after culture are able to differentiate into neuron-like cells in the hippocampus but not in the SNpc. Our results support that the SNpc holds a “silent” neurogenic niche, although remains to be conclusively determined whether NPCs exist and the conditions at which are activated to produce new neurons.

## CONCLUSION

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

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr. Arturo Alvarez-Buylla and José Segovia for their critical comments and reading of the manuscript. We are

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

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

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

## DISCLOSURE OF POTENTIAL CONFLICTS OF INTEREST

The authors disclose no potential conflict of interest.

## REFERENCES

- Mu Y, Lee SW, Gage FH. Signaling in adult neurogenesis. *Curr Opin Neurobiol* 2010;20:416–423.
- Alvarez-Buylla A, Lim DA. For the long run: Maintaining germinal niches in the adult brain. *Neuron* 2004;41:683–686.
- Gritti A, Bonfanti L, Doetsch F et al. Multipotent neural stem cells reside into the rostral extension and olfactory bulb of adult rodents. *J Neurosci* 2002;22:437–445.
- Arvidsson A, Collin T, Kirik D et al. Neuronal replacement of endogenous precursors in the adult brain after stroke. *Nat Med* 2002;8:963–970.
- Parent JM, Vexler ZS, Gong C et al. Rat forebrain neurogenesis and striatal neuron replacement after focal stroke. *Ann Neurol* 2002;52:802–813.
- Kim J-H, Auerbach JM, Rodríguez-Gómez JA et al. Dopamine neurons derived from embryonic stem cells function in an animal model of Parkinson's disease. *Nature* 2002;418:50–56.
- O'Keefe FE, Scott SA, Tyers P et al. Induction of A9 dopaminergic neurons from neural stem cells improves motor function in an animal model of Parkinson's disease. *Brain* 2008;131(Pt 3):630–641.
- Herrera DG, García-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. Adult-derived neural precursors transplanted into multiple regions in the adult brain. *Ann Neurol* 1999;46:867–877.
- Barraud P, Thompson L, Kirik D et al. Isolation and characterization of neural precursor cells from the Sox1-GFP reporter mouse. *Eur J Neurosci* 2005;22:1555–1569.
- Baizabal J-M, Cano-Martínez A, Valencia C et al. Glial commitment of mesencephalic neural precursor cells expanded as neurospheres precludes their engagement in niche-dependent dopaminergic neurogenesis. *Stem Cells Dev* 2012;21:1047–1058.
- Wichterle H, Lieberam I, Porter JA et al. Directed differentiation of embryonic stem cells into motor neurons. *Cell* 2002;110:385–397.
- Bibel M, Richter J, Schrenk K et al. Differentiation of mouse embryonic stem cells into a defined neuronal lineage. *Nat Neurosci* 2004;7:1003–1009.
- Friling S, Andersson E, Thompson LH et al. Efficient production of mesencephalic dopamine neurons by *Lmx1a* expression in embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci* 2009;106:7613–7618.
- Kirkeby A, Grealish S, Wolf DA et al. Generation of regionally specified neural progenitors and functional neurons from human embryonic stem cells under defined conditions. *Cell Rep* 2012;1:703–714.
- Ma L, Hu B, Liu Y et al. Human embryonic stem cell-derived GABA neurons correct locomotion deficits in quinolinic acid-lesioned mice. *Cell Stem Cell* 2012;10:455–464.
- Deacon T, Dinsmore J, Costantini LC, et al. Blastula-stage stem cells can differentiate into dopaminergic and serotonergic neurons after transplantation. *Exp Neurol* 1998;149:28–41.
- Bjorklund LM, Sanchez-Pernaute R, Chung S et al. Embryonic stem cells develop into functional dopaminergic neurons after transplantation in a Parkinson rat model. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:2344–2349.
- Baizabal J-M, Covarrubias L. The embryonic midbrain directs neuronal specification of embryonic stem cells at early stages of differentiation. *Dev Biol* 2009;325:49–59.
- Guerra-Crespo M, Gleason D, Sistos A et al. Transforming growth factor- $\alpha$  induces neurogenesis and behavioral improvement in a chronic stroke model. *Neuroscience* 2009;160:470–483.
- Paxinos G, Watson C, EBSCOhost. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. 5th ed. Amsterdam; Boston: Elsevier Academic Press, 2005.
- Dang LTH, Wong L, Tropepe V. *Zfhx1b* induces a definitive neural stem cell fate in mouse embryonic stem cells. *Stem Cells Dev* 2012;21:2838–2851.
- Hack MA, Saghatelian A, de Chevigny A et al. Neuronal fate determinants of adult olfactory bulb neurogenesis. *Nat Neurosci* 2005;8:865–872.
- Kosaka K, Toida K, Aika Y et al. How simple is the organization of the olfactory glomerulus?: The heterogeneity of so-called periglomerular cells. *Neurosci Res* 1998;30:101–110.
- Brill MS, Snaypan M, Wohlfrom H et al. A *dlx2*- and *pax6*-dependent transcriptional code for periglomerular neuron specification in the adult olfactory bulb. *J Neurosci* 2008;28:6439–6452.
- Morozov YM, Torii M, Rakic P. Origin, early commitment, migratory routes, and destination of cannabinoid type 1 receptor-containing interneurons. *Cereb Cortex* 2009;19 (Suppl 1):i78–i89.

- 26** Zhao M, Momma S, Delfani K et al. Evidence for neurogenesis in the adult mammalian substantia nigra. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:7925–7930.
- 27** Lie DC, Dziewczapolski G, Willhoite AR et al. The adult substantia nigra contains progenitor cells with neurogenic potential. *J Neurosci* 2002;22:6639–6649.
- 28** Gould E. How widespread is adult neurogenesis in mammals? *Nat Rev Neurosci* 2007;8:481–488.
- 29** Fisher LJ. Neural precursor cells: Applications for the study and repair of the central nervous system. *Neurobiol Dis* 1997;4:1–22.
- 30** Lepore AC, Neuhuber B, Connors TM et al. Long-term fate of neural precursor cells following transplantation into developing and adult CNS. *Neuroscience* 2006;139:513–530.
- 31** Brilli E, Reitano E, Conti L et al. Neural stem cells engrafted in the adult brain fuse with endogenous neurons. *Stem Cells Dev* 2013;22:538–547.
- 32** Cusulin C, Monni E, Ahlenius H et al. Embryonic stem cell-derived neural stem cells fuse with microglia and mature neurons. *Stem Cells* 2012;30:2657–2671.
- 33** Kohwi M, Petryniak MA, Long JE et al. A subpopulation of olfactory bulb GABAergic interneurons is derived from Emx1- and Dlx5/6-expressing progenitors. *J Neurosci* 2007;27:6878–6891.
- 34** De Marchis S, Bovetti S, Carletti B et al. Generation of distinct types of periglomerular olfactory bulb interneurons during development and in adult mice: Implication for intrinsic properties of the subventricular zone progenitor population. *J Neurosci* 2007;27:657–664.
- 35** Wagers AJ, Weissman IL. Plasticity of adult stem cells. *Cell* 2004;116:639–648.



See [www.StemCells.com](http://www.StemCells.com) for supporting information available online.