



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE MÉXICO



---

---

FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE MAestrÍA Y DOCTORADO  
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

EL TRANSPLANTE DE NEURONAS MOTORAS  
DIFERENCIADAS DE CÉLULAS TRONCALES  
EMBRIONARIAS COMO UN TRATAMIENTO  
POTENCIAL EN ROEDORES CON ESCLEROSIS  
LATERAL AMIOTRÓFICA FAMILIAR

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE :  
MAESTRO EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS)

P R E S E N T A :  
RODRIGO LÓPEZ GONZÁLEZ



Tutor: DR. IVÁN VELASCO VELÁZQUEZ



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.

MÉXICO, D. F. a 14 de Abril de 2008

**EL TRANSPLANTE DE NEURONAS MOTORAS DIFERENCIADAS DE  
CÉLULAS TRONCALES EMBRIONARIAS COMO UN TRATAMIENTO  
POTENCIAL EN ROEDORES CON ESCLEROSIS LATERAL AMIOTRÓFICA  
FAMILIAR**

**RECONOCIMIENTOS**

Esta tesis de maestría se realizó bajo la dirección del Dr. Iván Velasco Velázquez en el Departamento de Neurociencias del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México.

El Comité Tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:

Dr. Iván Velasco Velázquez	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Dra. Diana Escalante Alcalde	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Dr. Ignacio Camacho Arroyo	Facultad de Química, UNAM

El proyecto fue apoyado parcialmente por CONACYT, fondo sectorial salud (14285) y PAPIIT- UNAM (IN226703) y (IN224207). Durante los estudios de Maestría goce de una beca otorgada por CONACYT para la realización de la presente tesis.

Esta tesis fue defendida en examen presentado el día .....

El Jurado de Examen de maestría estuvo constituido por:

Presidente	Dr. Horacio Merchant Larios	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
Vocal	Dr. Ignacio Camacho Arroyo	Facultad de Química, UNAM
Secretario	Dr. Jesús Santaolalla Tapia	Universidad Autónoma del Estado de Morelos
Suplente	Dr. Julio Morán Andrade	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Suplente	Dra. Rosa Estela Navarro González	Instituto de Fisiología Celular, UNAM

## **Agradecimientos**

Con el más sincero de los agradecimientos al Dr. Iván Velasco Velásquez por la dirección de esta tesis, por todo el tiempo brindado a mi formación académica y por su apoyo en todo momento.

Agradezco a mis sinodales por sus atinados comentarios en la revisión del escrito.

## **Dedicatorias**

A mis padres Ana Maria y Miguel por su apoyo, comprensión, cariño y enseñanzas durante toda mi vida, pero especialmente durante la realización de mis estudios. Son los mejores padres que un hijo puede tener.

A mis hermanos Hugo, Eduardo, Alejandro y Ana gracias por su apoyo y por ser unos grandes amigos.

A Martha Elena por su apoyo incondicional y por inspirarme siempre a mejorar, te agradezco por todo el maravilloso tiempo que pasamos juntos.

Con amistad a mis compañeros de laboratorio Ana, Emmanuel, Erika, Eugenia, Fabián, Griselda, Itzel, Natyeli y Nidia.

A mis amigos de la comunidad Alex, Alex Frías, Caro, Cony, Cesar, Emmanuel, Fernando, Ivoncita, Kika, Leonel, Rocio, Selene, Sofía y Toño.

A mis amigos de la Facultad de Ciencias Abraham, Mariano, Omar y Pilar.

## Índice

<b>Lista de abreviaturas.....</b>	<b>4</b>
<b>Resumen.....</b>	<b>5</b>
<b>Antecedentes.....</b>	<b>6</b>
<b>Formación de las neuronas motoras durante el desarrollo embrionario.....</b>	<b>7</b>
<b>Células troncales y su potencial terapéutico.....</b>	<b>11</b>
<b>Esclerosis lateral amiotrófica (ELA).....</b>	<b>14</b>
<b>Tratamientos para la ELA.....</b>	<b>20</b>
Terapias con antioxidantes.....	20
Factores de crecimiento.....	21
Terapia génica.....	23
Terapias con células troncales.....	24
<b>Justificación.....</b>	<b>26</b>
<b>Hipótesis.....</b>	<b>26</b>
<b>Objetivos.....</b>	<b>26</b>
<b>Materiales y Métodos.....</b>	<b>27</b>
Protocolo para la generación de neuronas motoras derivadas de células Troncales embrionarias.....	27
Procedimiento para la inmunofluorescencia.....	28
Genotipificación de las ratas hSOD1 <sup>G93A</sup> .....	28
Mantenimiento de la cepa de ratas SOD1 y su evaluación motora.....	29
Transplante de neuronas motoras derivadas de CTE.....	30
<b>Resultados.....</b>	<b>31</b>
<b>Discusión.....</b>	<b>39</b>
<b>Conclusiones y perspectivas.....</b>	<b>44</b>
<b>Referencias.....</b>	<b>45</b>

## Resumen

En este trabajo se estudió la diferenciación de neuronas motoras (NM) a partir de células troncales embrionarias (CTE). Las CTE se dividen rápidamente y pueden diferenciarse en diferentes tipos celulares generados de las tres capas germinales. Las NM presentan una ruta de especificación neuronal bien conocida la cual puede recrearse *in vitro*. En este estudio, efectuó la diferenciación de neuronas motoras (NM) a partir de CTE de ratón de la línea HBG3, que expresa la proteína verde fluorescente (GFP) bajo el promotor de HB9, mediante el protocolo reportado por Wichterle et al. (2002). Se verificó la presencia de marcadores de NM como Isl1 y colina acetil transferasa en las CTE inducidas a diferenciar. El objetivo principal del trabajo fue evaluar la capacidad de integración y el potencial terapéutico de las NM derivadas de CTE en un modelo esclerosis lateral amiotrófica familiar en ratas, en el cual se expresa la superóxido dismutasa 1 (SOD1) humana mutada. Este modelo recapitula la degeneración y muerte de NM que ocurre en la ELA familiar. Los resultados obtenidos indican que las NM derivadas de CTE se pueden integrar en la médula espinal de los animales transgénicos presintomáticos y causan una recuperación transitoria cuando se comparan con los animales que no fueron transplantados. Sin embargo, los animales se paralizan y mueren en la etapa final de la enfermedad; asimismo, cuando se analiza la médula espinal, se observa la ausencia de NM tanto endógenas como de las transplantadas.

## **Antecedentes**

### **Formación de las neuronas motoras durante el desarrollo embrionario**

El sistema nervioso central (SNC) de los vertebrados es un sistema complejo, que lleva a cabo muchas funciones, tales como la regulación fisiológica, la adquisición y procesamiento de la información sensorial, control del movimiento y la locomoción y la formación de memoria y aprendizaje. El entender cómo este sistema se genera puede proporcionar información de cómo restaurarlo en condiciones patológicas (Harper *et al.*, 2004). Existen diferentes estrategias para analizar el desarrollo embrionario del SNC, algunas de ellas se basan en la premisa, de que la formación de tipos celulares específicos es resultado de restricciones a nivel molecular en las células, lo cual permite identificar genes esenciales para el desarrollo de fenotipos terminales del SNC. Estos genes se encuentran altamente conservados, en diferentes especies y codifican para factores de crecimiento, moléculas de adhesión celular, receptores y moléculas de señalización intracelular. Estos genes se identifican al mostrar patrones de expresión restringidos espacial y temporalmente en el curso del desarrollo embrionario del fenotipo analizado. Estudiando los mecanismos que establecen su expresión y función se puede comprender como se orquestan los eventos morfogenéticos del SNC adulto (Poh *et al.*, 2002).

El SNC se origina a partir del ectodermo. La inducción neural especifica la placa neural, la cual, después da lugar a una estructura cilíndrica llamada tubo neural. En etapas tempranas en mamíferos y aves el tubo neural consiste de una sola capa de células multipotentes, conocidas como el neuroepitelio. Sucesivos ciclos de proliferación de las células que constituyen esta capa originan primeramente neuronas y más adelante células de la glía. Estas células pasan por eventos de proliferación y migración antes de adquirir su forma y función finales (Schoenwolf, 1982).

La organización anatómica del SNC es debida a una regionalización del neuroepitelio en etapas tempranas del desarrollo. La placa neural primitiva se subdivide en regiones que se caracterizan por la presencia de distintos progenitores, que poseen el compromiso de dar

origen a fenotipos acordes a su ubicación, cada uno de las cuales expresa distintas proteínas que les confieren una identidad regional. Las primeras etapas de la diferenciación neural están controladas por moléculas de señalización que funcionan como morfógenos a través del tejido neural (Wilson *et al.*, 2000). Los morfógenos son moléculas solubles que producen una respuesta diferencial en las células a diferentes concentraciones (Slack, 2001). Los gradientes de morfógenos a lo largo del eje rostro-caudal del tubo neural establece las principales subdivisiones del sistema nervioso central, el cerebro anterior, medio, posterior y la médula espinal (ME) (Lumsden y Krumlauf, 1996). La generación de gradientes en el eje dorso-ventral tiene un papel importante en establecer la diversidad de los tipos celulares (Pituello, 1997). Sin embargo, esta diversidad no puede ser explicada solamente por la acción de los morfógenos en estos dos sistemas. En la ME, por ejemplo, existen señales utilizadas secuencialmente en las neuronas en desarrollo que se requieren para lograr el repertorio completo de subtipos neuronales (Jessell, 2000).

La ME es una estructura caudal, cuya regionalización se establece poco después de la inducción neural, a través del establecimiento de dominios de precursores, los cuales muestran restricciones a señales extrínsecas. Muchos factores como factor de crecimiento fibroblástico 2 (FGF-2), los retinoides, las proteínas morfogénicas de hueso (BMPs), las proteínas Wnt y la actividad caudalizante del mesodermo paraxial, han sido implicados en la adquisición del carácter caudal neural (Doniach, 1995; Muhr *et al.*, 1999). La diferenciación de las células de la ME requiere la acción de una señal mediada por retinoides que es provista por el mesodermo paraxial (Muhr *et al.*, 1999). La capacidad para sintetizar retinoides se refleja por la expresión de una enzima clave en la síntesis de retinoides, la retinaldehído deshidrogenasa 2 (RALDH2) (Niederreither *et al.*, 1999). La síntesis de retinoides por el mesodermo paraxial es un evento crítico para el establecimiento temprano de la identidad de las células del cerebro posterior y de la ME (Gavalas y Krumlauf, 2000).

La especificación de los subtipos neuronales en la médula espinal se hace evidente con la aparición de distintos tipos celulares en posiciones definidas de la región ventral del tubo neural, donde se generan tres clases principales de células: células de la placa del piso (una



clase especializada de células gliales), neuronas motoras e interneuronas en posiciones más dorsales (Jessell, 2000).

La diferenciación de estos tipos celulares ventrales es disparada por señales provenientes inicialmente por la notocorda y después por las mismas células de la placa del piso. Varios estudios sugieren que la diferenciación de las células de la placa del piso es mediada por señales inductivas provenientes de la notocorda (Placzek, 1995). La principal actividad de señalización de la notocorda y de las células de la placa del piso es mediada por la proteína Sonic Hedgehog (SHH). La expresión ectópica de esta proteína *in vivo* puede inducir la diferenciación de las células de la placa del piso, neuronas motoras e interneuronas (Marti *et al.*, 1995), además la eliminación de la señalización por la notocorda o el bloqueo con anticuerpos *in vitro* reprime la diferenciación de estos tipos celulares ventrales (Chian *et al.*, 1996; Pierani *et al.* 1999). Aumentos progresivos de 2 a 3 veces en la concentración de SHH generan 5 clases diferentes de tipos neuronales ventrales a partir de progenitores neuronales *in vitro*. Las células en las regiones más ventrales del tubo neural requieren una mayor concentración de SHH para su inducción (Ericsson *et al.*, 1997).

Varios estudios han demostrado que un grupo de proteínas con homeodominio expresadas por las células progenitoras ventrales actúan como factores intermediarios en la señalización mediada por SHH (Pierani *et al.*, 1999; Ericsson *et al.*, 1997). Estas proteínas se pueden clasificar con base en su patrón de expresión y en su capacidad de ser reguladas por SHH. La expresión de las proteínas clase I: Pax7, Dbx1, Dbx2, Irx3 y Pax6 es reprimida en altas concentraciones de SHH y como consecuencia el efecto conservado sobre las dos clases de proteínas forman los límites de expresión de la región ventral que generan los dominios de progenitores. De manera inversa, la expresión de las proteínas de la clase II: Nkx6.1 y Nkx2.2 requieren de la activación de la vía de señalización de SHH (figura 1). Tales interacciones parecen tener tres funciones principales: establecer los dominios dorsoventrales, asegurar la existencia de límites entre los progenitores y ayudar a mitigar el requerimiento de las células progenitoras de la señalización de SHH para consolidar la identidad de los dominios (Briscoe *et al.*, 2000).

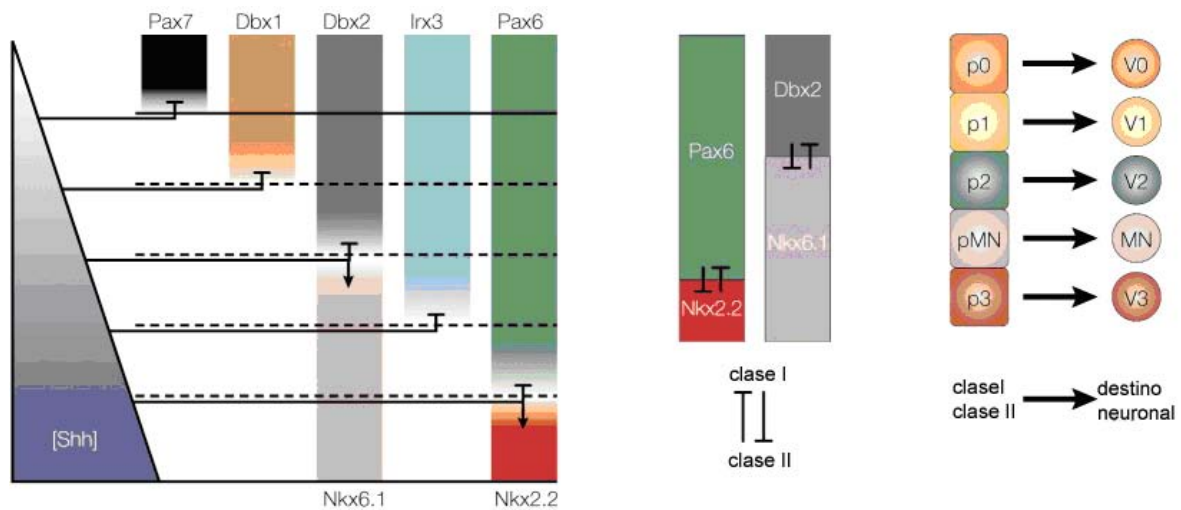


Figura 1. Varias proteínas homeodominio expresadas por las células progenitoras ventrales actúan como factores intermediarios en la señalización mediada por SHH. La expresión de las proteínas clase I Pax7, Dbx1, Dbx2, Irx3 y Pax6 es reprimida en un rango de concentraciones de SHH. La expresión de las proteínas de la clase II requiere de la SHH en un umbral de concentraciones distintas. Esto establece los diferentes dominios de progenitores en la médula espinal (Modificado de Jessell, 2000).

Las proteínas homeodominio expresadas por las células progenitoras especifican la identidad de cada una de las clases de neuronas postmitóticas que se derivan de los dominios de progenitores respectivos. La expresión ectópica de proteínas homeodominio en el tubo neural del pollo cambia el destino y la posición de los tipos neuronales que se generan (Briscoe *et al.*, 2000). Estos estudios proveen un campo de trabajo para definir la cascada transcripcional regulada por SHH que dirige a los progenitores neuronales sobre rutas específicas de neurogénesis. Por ejemplo, las proteínas homeodominio pueden ser ordenadas en una vía que nos permite explicar cómo las NM adquieren una identidad distinta con respecto a las interneuronas que se encuentran adyacentes a ellas (Briscoe *et al.*, 2000). La acción combinada de tres proteínas homeodominio, Nkx6.1, Nkx2.2 y Irx3, restringe la generación de neuronas a un solo dominio de progenitores (figura 2). La expresión del factor de transcripción Islet 1 (Isl 1) se requiere inicialmente para la generación de todas las MNs. Por otro lado, las principales subclases de NM en los vertebrados pueden distinguirse por la expresión combinada de proteínas homeodominio LIM. Estas proteínas se requieren para establecer la identidad genérica y columnar de las NM (Pfaff *et al.*, 1996). Dentro del dominio de neuronas motoras, la actividad de Nkx6.1

dirige la expresión restringida de factores que se encuentran río abajo como HB9. El factor de transcripción HB9 se expresa durante las divisiones finales de los progenitores de neuronas motoras funcionando como un determinante de su identidad y una vez que se induce regula de manera positiva su expresión (Arber *et al.*, 1999).

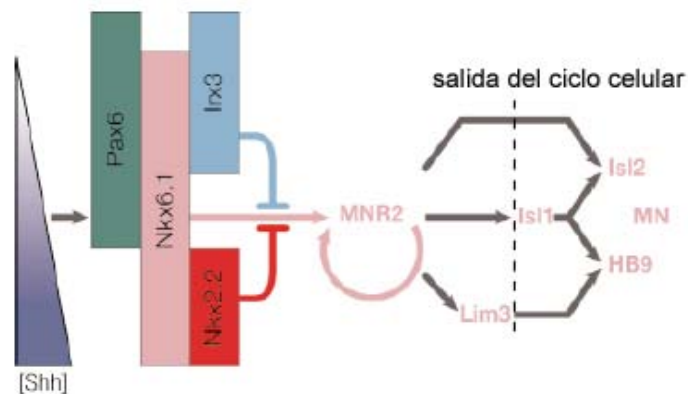


Figura 2. Proteínas homeodominio que funcionan río abajo de SHH. Pax6, Nkx6.1, Nkx2.2 e Irx3 participan en establecer y delinear el dominio que genera a las neuronas motoras. Nkx6.1 es suficiente para inducir la expresión de MNR2. A su vez, MNR2 es capaz de regular positivamente a Isl1, Isl2, Lim3 y HB9 (modificado de Jessell 2000).

Todas las NM se derivan de un solo dominio de progenitores neuronales (Briscoe *et al.*, 2000), pero adquieren varios subtipos e identidades distintas, que se han definido por la posición de sus cuerpos celulares en la ME y en sus patrones de proyección axonal a la periferia (Eisen, 1991; Appel *et al.*, 1995). Las diferentes subclases de NM definidas anatómicamente son distintas también a nivel molecular, especificándose por una expresión diferencial de factores de transcripción. Las NM representan un tipo de los cientos de neuronas diferentes que se generan durante el desarrollo del SNC de los vertebrados, estableciendo la diversidad que es esencial para la formación de circuitos neuronales. La degeneración de tipos específicos de neuronas trae consigo trastornos neurológicos (Nagai *et al.*, 2007).

## **Células troncales y su potencial terapéutico**

Las células troncales son células indiferenciadas con la capacidad de autorenovación y de producir una gran variedad de progenie diferenciada. Existen dos clases de células troncales, las que se originan en tejidos adultos y las de tejidos embrionarios. Existe otra clasificación de las células troncales con base en la capacidad de tipos celulares que pueden producir: Las células troncales unipotenciales solo pueden generar un tipo celular, las células troncales multipotenciales dan origen a todos los tipos celulares de un tejido y por último las células troncales pluripotenciales que tienen la capacidad de generar derivados del endodermo, mesodermo y ectodermo; un ejemplo de células pluripotenciales son las células troncales embrionarias (CTE) que se derivan de la masa celular interna del blastocisto, y que cuentan con la capacidad de generar todos los tipos celulares del organismo del que se aíslan, a excepción de las estructuras extraembrionarias, como la placenta (Kirschstein *et al.*, 2000).

En la década de 1980, las CTE se establecieron a partir de embriones murinos en etapa pre-implantación (Evans y Kaufman, 1981; Martin, 1981). Las células troncales de ratón se derivan de la masa celular interna de un blastocisto de 3.5 días postcoito. Para establecer líneas de CTE, la masa celular interna es aislada, separada del trofoblasto. Después de varios días en cultivo, las células de la masa celular interna forman colonias que pueden ser expandidas, disgregadas y resembradas de manera indefinida bajo las mismas condiciones sobre una capa de fibroblastos inactivos (por irradiación o con mitomicina C) para evitar su diferenciación espontánea (figura 3) (Abbondanzo *et al.*, 1993). El papel de estos fibroblastos es el de proveer factores de crecimiento necesarios para la proliferación y la inhibición de la diferenciación espontánea. El principal factor que inhibe la diferenciación parece ser el factor inhibitorio de la leucemia (LIF); (Stewart *et al.*, 1992). El LIF por si mismo es capaz de mantener un cultivo de CTE indiferenciado, sin necesidad de cultivarse sobre una capa de fibroblastos inactivos (Pease *et al.*, 1990).

Las CTE expresan marcadores que pueden ser utilizados para identificarlas en estado indiferenciado, como la fosfatasa alcalina, el antígeno embrionario de etapa específico

(SSEA) (Wobus *et al.*, 1984), el factor de transcripción Oct-4 (Pesce y Schöler, 2000), Nanog (chambers *et al.*, 2003) y Sox2 (Avilion *et al.*, 2003) Estos marcadores se regulan de manera negativa durante la diferenciación de estas células

Debido a que las CTE son pluripotentes, bajo condiciones específicas éstas pueden diferenciarse hacia múltiples linajes *in vitro* (Doetschman *et al.*, 1985). Las condiciones que se requieren para inducir la diferenciación incluyen la ausencia de LIF y de células nodrizas, o la adición de factores de diferenciación como el ácido retinoico (AR). Cuando las CTE son cultivadas en suspensión sobre una superficie no adhesiva forman cuerpos embrionarios, que muestran algunas similitudes con un embrión en desarrollo (Doetschman *et al.*, 1985). Los cuerpos embrionarios forman una capa exterior de células mesodermales y eventualmente una cavidad en el centro. Cuando estas células se vuelven a colocar sobre una caja de cultivo pueden dar a lugar células diferenciadas (Palacios *et al.*, 1995).

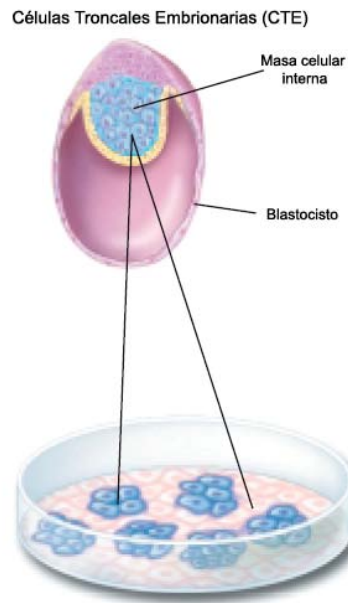


Figura 3. Las CTE se derivan de la masa celular interna del blastocisto y pueden ser expandidas *in vitro*.

Las CTE pueden generar cualquier tipo celular del embrión y se puede obtener una gran cantidad de células al cultivarse *in vitro*, por lo tanto pueden convertirse en una opción para

las terapias celulares en varias enfermedades. Un paso crítico para este tipo de terapias es generar el tipo celular deseado. Por lo tanto, es de especial interés definir poblaciones de células progenitoras que sirvan como fuentes renovables de neuronas para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas. El dirigir a las células progenitoras a través de rutas específicas de diferenciación neuronal de manera sistemática es difícil, debido a que el desarrollo de la mayoría de los tipos neuronales no se han definido completamente, sin embargo, las NM de la ME representan un subtipo dentro del SNC, con una ruta de especificación neuronal bien definida (Jessell, 2000).

El estudio del potencial neurogénico se ha enfocado en tres clases principales de células: progenitores neurales derivados de tejido nervioso fetal o adulto (Gage, 2000), progenitores derivados de otros tejidos y órganos, y células troncales embrionarias Rathjen *et al.* 2002). Las células troncales embrionarias tienen la capacidad de generar neuronas, las cuales expresan marcadores característicos de clases específicas de neuronas, por ejemplo, neuronas dopaminérgicas del cerebro medio (Lee *et al.*, 2000).

La capacidad de las CTE para formar NM funcionales fue demostrada en un estudio donde se obtuvieron CTE de una línea de ratones transgénicos (*mHb9-Gfp 1b*), en la cual el gen de la proteína verde fluorescente (GFP) se expresa bajo el control del promotor de un gene específico de neuronas motoras, el gen *hb9*. En este estudio, las CTE de la línea HBG3 se expusieron a AR y un agonista de SHH (Hh-Ag1.3) para estimular su diferenciación a NM. Las NM diferenciadas mediante este protocolo generan potenciales de acción, expresan los receptores para los neurotransmisores y extienden axones cuando se cocultivan con la línea de células de músculo C2C12 (Miles *et al.*, 2004). En un estudio previo, este grupo de investigación logró la diferenciación de CTE (de la línea *mHb9-Gfp 1b*) a NM y las transplantaron en la ME de embriones de pollo en la etapa 15-17 de Hamilton y Hamburger. Se observó su integración y sobrevivencia; además, estas células proyectaron axones hacia la musculatura axial y apendicular formando sinapsis con estos músculos (Wichterle *et al.*, 2002). Asimismo, en otro estudio donde se diferenciaron NM a partir de CTE. Harper *et al.* (2004) demostraron las NM son capaces de extender sus axones *in vivo* y producir uniones neuromusculares *in vitro*, al ser cocultivadas con mioblastos. La

habilidad de las NM derivadas de CTE de inervar a los músculos ofrece la posibilidad de evaluar estas neuronas para restaurar la función motora en modelos animales de degeneración de NM como la esclerosis lateral amiotrófica (ELA).

Asimismo, se han desarrollado protocolos para diferenciar NM a partir de CTE humanas. En un estudio las CTE humanas fueron expandidas sobre células estromales MS5 generando rosetas neurales, las cuales al ser expuestas a AR 1 $\mu$ M y SHH 500 ng/ml generaron NM. Las NM expresaban marcadores tales como Isl 1, HB9 y colina acetiltransferasa (ChAT) y al ser transplantadas en la ME de ratas adultas estas células sobrevivieron durante seis semanas manteniendo su fenotipo (Lee *et al.*, 2007).

### **Esclerosis lateral amiotrófica**

La ELA es la enfermedad más común de NM y fue descrita en 1869 por Jean-Martin Charcot. La característica distintiva de esta enfermedad es la disfunción y muerte selectiva de neuronas de las vías motoras, produciéndose espasmos, debilidad generalizada, atrofia muscular, hiperreflexia y muerte de las NM. La falla en los músculos respiratorios es el evento final que conduce a un desenlace fatal y ocurre entre el primer y el quinto año a partir del inicio de la enfermedad (Bruijn *et al.*, 2004). La incidencia de esta enfermedad es de 1-2/100,000 casos en la mayoría de las poblaciones y a pesar de las investigaciones realizadas, la causa de la enfermedad es desconocida en la mayoría de los casos, debido a que los mecanismos que producen daño a las neuronas motoras son complejos y no se conocen por completo (Bruijn *et al.*, 2004).

Existen dos formas de ELA, la esporádica que comprende el 90% de los casos y la familiar con aproximadamente el 10% de los casos, exhibiéndose un componente genético. La edad típica del inicio de la enfermedad en ambos tipos es de entre los 50 y 64 años, aunque existen algunas formas juveniles (Sejvar *et al.*, 2005).

Se han identificado otros genes que al ser mutados generan una enfermedad parecida a la ELA. Por ejemplo, siete diferentes mutaciones en el gen que codifica para la angiogenina, causan la enfermedad, evidenciando que puede existir una relación entre un proceso

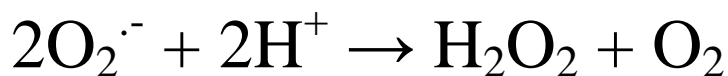
angiogénico alterado y la pérdida de neuronas motoras. La mutación en la proteína asociada a la sinaptobrevina (VAPB) también genera un tipo de ELA de progresión más tardía. Esta proteína se encuentra implicada en el transporte vesicular, transporte axonal y en el transporte del retículo endoplásmico al aparato de Golgi. La mutación en el gen que codifica para una subunidad de la dinactina, proteína que también se encuentra involucrada en el transporte axonal de organelos celulares y proteínas, está relacionada con la aparición de un tipo de ELA caracterizada por la parálisis de los músculos faciales y de la boca. Asimismo, se han localizado otras formas de la enfermedad, como la ELA con demencia frontotemporal (ALS-FTD por sus siglas en inglés) y la ELA con demencia frontotemporal y enfermedad de Parkinson (ALS-FTDP). En estos tipos de ELA, se han ligado a mutaciones en el cromosoma 9 y 17 (Wilhemsen *et al.*, 1997).

La red de neurofilamentos es una parte esencial del transporte axonal y los hallazgos histopatológicos sugieren que existe una falla en el transporte axonal retrogrado. Este tipo de transporte es llevado a cabo por la dineinas, que son proteínas ATPasas responsables del transporte hacia la región (-) de los microtubulos. La pérdida homocigótica del gen que codifica para la cadena pesada de la dineina 1, es letal durante el desarrollo embrionario, pero los heterocigotos son normales. Cuando este gen es mutado en ratón se produce un fenotipo en el cual hay pérdida del tono muscular y de la habilidad motora, esto da como resultado un transporte axonal retrogrado defectuoso en NM (Harada *et al.*, 1998).

El descubrimiento de que aproximadamente el 20% de los casos de tipo familiar son causados por mutaciones en la enzima superóxido dismutasa 1 (SOD1), ha permitido el desarrollo de modelos animales de los cuales se ha generado conocimiento sobre los mecanismos de neurodegeneración que ocurren en la ELA (Rosen *et al.* 1993). La SOD1 es un homodímero que consta de 153 aminoácidos, su función más conocida es la de convertir el superóxido (compuesto toxico producido por la fosforilación oxidativa en la mitocondria) a peróxido de hidrógeno y agua (figura 4). La catálisis realizada por la SOD1 es mediada en dos pasos asimétricos por un átomo de cobre el cual es reducido y oxidado alternadamente por el superóxido. Se conocen más de 100 mutaciones de esta enzima y



todas excepto una (SOD1<sup>D90A</sup>, el aspartato sustituido por alanina en el residuo 90) (Andersen *et al.*, 2001) producen una forma dominante de la enfermedad.



**Figura 4. La enzima Cu/Zn superóxido dismutasa 1 cataliza la conversión del ión superóxido a peróxido de hidrógeno y oxígeno.**

Aunque no se conoce cómo esta mutación conduce a la degeneración de neuronas motoras, está bien establecido que la toxicidad producida en las células durante la ELA no se debe a la pérdida de función de la enzima, sino a una ganancia de función relacionada con la adquisición de propiedades tóxicas que son independientes de los niveles de la SOD1. Por otro lado, se sabe que ratones deficientes en la SOD1 no desarrollan degeneración en neuronas motoras (Reaume *et al.*, 1996). Se especula que la toxicidad mediada por la SOD1 es debida a un funcionamiento aberrante en el sitio activo de la enzima, esto puede involucrar el uso de otros sustratos diferentes al superóxido, por ejemplo, cuando la enzima cataliza la reacción reversa, convirtiendo al oxígeno en superóxido, el cual se combina con el óxido nítrico para producir peroxinitrito (Estévez *et al.*, 1999). El peroxinitrito puede agregar un grupo nitrato a residuos de tirosina de las proteínas, con lo cual se puede producir un daño en la célula. El otro posible sustrato es el peróxido de hidrógeno, el producto final de la enzima, el uso de este sustrato por la forma reducida de la SOD1 puede producir el radical hidroxilo que es altamente reactivo (Beckman *et al.*, 1994).

Una característica común de las neuronas motoras en mutantes de la SOD1 es que presentan agregados intracelulares prominentes (Gurney, 1994), siendo los agregados altamente inmunoreactivos para la SOD1. Es posible que estos agregados puedan dañar las células debido a que no pueden ser degradados por el proteosoma, porque las proteínas agregadas se encuentran plegadas de manera errónea, pudiendo afectar la función de los organelos como la mitocondria o los peroxisomas (Wang *et al.*, 2003). De las más de 100 mutaciones en humanos, 3 (SOD1<sup>G85R</sup>, SOD1<sup>G37R</sup> y SOD1<sup>G93A</sup>) han sido caracterizadas en

modelos de ratones transgénicos de ELA. En estos ratones, la proteína humana mutada tiene una expresión ubicua (bajo el control del promotor de la SOD1 de humano o ratón) en niveles iguales o más altos que la SOD1 endógena. Estos ratones desarrollan una enfermedad neuromuscular muy parecida a la ELA en humanos (Bruijn y Cleveland, 1996). Recientemente se han creado ratas transgénicas con SOD1 humana mutada, con la finalidad de probar estrategias experimentales que son difíciles de lograr en los modelos con ratones. Existe un modelo de rata transgénica que presenta la mutación SOD1<sup>G93A</sup> (Howland *et al.*, 2002). Por otro lado, Nagai y colaboradores (2001) desarrollaron dos modelos que presentan la mutación SOD1<sup>G93A</sup> y SOD1<sup>H46R</sup>, estas dos mutaciones fueron seleccionadas porque generan un tipo diferente de disfunción en la SOD1 (la mutación H46R involucra a un aminoácido dentro del sitio catalítico, mientras que en la mutación G93A la actividad dismutasa se mantiene) y un fenotipo diferente, ya que los pacientes con la mutación H46R muestran una progresión de la enfermedad más lenta comparada con la mutación G93A que tiene una manifestación clínica más rápida (el desarrollo lento de la ELA se reproduce en las ratas transgénicas H46R). Además, el mayor tamaño de las ratas posee la ventaja de que se pueden realizar manipulaciones que no son posibles en los ratones, como la administración de compuestos a nivel de la médula espinal, la obtención de una gran cantidad de tejido para ensayos bioquímicos (Nagai *et al.* 2001) y en terapias de reemplazo con células troncales (Howland *et al.* 2002).

El curso de la enfermedad en las ratas transgénicas hSOD<sup>G93A</sup> se ha estudiado mediante análisis histológico y pruebas de comportamiento. Con base en esto, la progresión de la enfermedad se puede dividir en cuatro etapas: la pérdida de NM que está establecida por una disminución estadísticamente significativa en el número de NM a los 90 días de edad, la pérdida de peso, la cual ocurre a los 110 días de vida, este evento coincide con una rápida disminución en el número de NM. El inicio de la debilidad muscular se presenta a los 125 días y se relaciona con una disminución del 50% de las NM al ser comparado con los animales no transgénicos. Las ratas hSOD<sup>G93A</sup> generalmente se paralizan en una de las extremidades posteriores, después, la parálisis progresa a la otra extremidad posterior y luego a las extremidades anteriores. En la etapa final de la enfermedad los animales presentan una disminución del 75% de las NM con respecto a los animales no transgénicos,

presentándose una pérdida generalizada de la actividad motora a los 140 días de edad (Matsumoto *et al.*, 2006).

Los astrocitos son un tipo celular abundante en el SNC y actualmente se piensa que juegan un papel importante en enfermedades neurodegenerativas. Algunos estudios han explorado la contribución de los astrocitos en modelos de ELA familiar *in vitro*. Estos estudios demostraron que los astrocitos que expresan la hSOD1 mutada reducen la sobrevivencia de las NM, en un sistema de co-cultivo de NM derivadas de CTE y astrocitos derivados de células troncales neurales (CTN). Adicionalmente, se encontró que estos efectos son mediados por factores solubles y recapitulan la especificidad hacia las NM, ya que otros tipos celulares como neuronas GABAérgicas y neuronas del ganglio de la raíz dorsal no se ven afectados y que el efecto es debido a los astrocitos, ya que co-cultivos de miocitos o fibroblastos no inducen la muerte de las neuronas motoras (Nagai *et al.*, 2007).

Existe evidencia de que la microglía también podría estar involucrada en esta enfermedad ya que ésta se encuentra activada en la médula espinal de los animales transgénicos que expresan la forma mutada de la hSOD. En un estudio se demostró que la microglía del ratón transgénico hSOD<sup>G93A</sup> al ser transplantada en un ratón PU1<sup>-/-</sup> que no puede desarrollar células mieloides y linfoides, no produce ninguna manifestación clínica o patológica relacionada a la ELA. Sin embargo, cuando se realiza el trasplante de la microglía de un ratón silvestre en un ratón hSOD<sup>G93A</sup>/PU1<sup>-/-</sup> se disminuye la pérdida de las neuronas motoras y se prolonga la supervivencia de estos animales. Estudios *in vitro* demuestran que la microglía del ratón hSOD<sup>G93A</sup> produce más superóxido y peroxinitrito que la microglía del ratón silvestre (Beers *et al.*, 2006). Estos estudios destacan la importancia de la microglía y la astrogía en la patogénesis de la ELA.

Se ha encontrado evidencia de que el daño por estrés oxidante está involucrado en la patogénesis de la ELA. Algunos estudios han demostrado un aumento los niveles del ión carbonilo en el asta ventral de la ME y la corteza motora de pacientes con ELA cuyos tejidos fueron analizados post mortem, al ser comparados con tejidos control (Abe *et al.*, 1995). También se encontraron niveles altos de nitrotirosina, ya que se encontró una alta

inmunoactividad para la 3-nitrotirosina en el asta ventral de la ME en pacientes con ELA esporádica y familiar, con respecto al control (Abe *et al.*, 1995). Asimismo, se ha encontrado daño al DNA, medido por la presencia de altos niveles de 8-hidroxi-2-deoxiguanosina (8OHdG) en la ME de pacientes con ELA (Fitzmaurice *et al.*, 1996). Sin embargo, aun no se sabe si el estrés oxidante es la causa primaria de la enfermedad o es simplemente una consecuencia de ésta.

Otro de los factores que puede ser una causa de la enfermedad es la excitotoxicidad, proceso que ocurre cuando existe una estimulación repetitiva de los receptores de glutamato, lo cual desencadena una entrada e incremento de la señalización de calcio, que puede producir el daño y la muerte neuronal. Las neuronas motoras parecen ser particularmente vulnerables a la excitotoxicidad mediada por los receptores a AMPA, además de que existe evidencia de un incremento en los niveles de glutamato en pacientes con ELA (Shaw *et al.*, 1995) y en roedores transgénicos que expresan la hSOD<sup>G93A</sup> (Howland *et al.*, 2002). Es posible que algunos de los factores que causen la enfermedad actúen de manera sinérgica. Por ejemplo, se sabe que las especies reactivas de oxígeno disminuyen los niveles del transportador glial de glutamato EAAT2, lo cual, produce un aumento de la excitotoxicidad (Volterra *et al.*, 1994).

## **Tratamientos para la ELA.**

Como se mencionó, no existe un tratamiento eficaz para la ELA. A continuación se describen las estrategias que se ha empleado para tratar de disminuir los síntomas de esta enfermedad.

### **Terapias con antioxidantes**

El uso de antioxidantes para tratar la ELA se basa en la evidencia de que las especies reactivas de oxígeno pueden ser la causa de la enfermedad. A continuación se mencionarán los antioxidantes que se han empleado en la clínica y en ensayos experimentales:

#### **Vitamina E**

La vitamina E ( $\alpha$ - tocoferol) es el antioxidante natural más potente, que puede atrapar especies reactivas de oxígeno y nitrógeno. En un estudio realizado con 289 pacientes con ELA se administraron 500 mg de vitamina E junto con riluzole (inhibidor de la liberación de glutamato) por un periodo cercano a los 5 años. En este estudio no hubo una mejora en cuanto a la supervivencia de los pacientes que fueron tratados. Sin embargo, los pacientes tuvieron una progresión de la enfermedad más lenta comparada con los control (Desnuelle *et al.*, 2001). En otro trabajo, se probó la eficacia de una megadosis de 5 g de vitamina E en 160 pacientes durante 18 meses, aunque no se observaron diferencias en la supervivencia de los pacientes, en pruebas de funcionalidad motora, los pacientes tratados con vitamina E mostraron una mejoría marginal (Graf *et al.*, 2005).

#### **N- acetil cisteina**

La N-acetil cisteína es precursor del glutatión, que es un antioxidante natural. En un estudio con 110 pacientes, se utilizó una dosis de 50 mg/kg de N-acetil cisteína administrada subcutáneamente. Este tratamiento no logró aumentar la supervivencia de los pacientes de forma significativa (Kraus *et al.*, 2005).

### **Co-enzima Q10**

La Co-enzima Q10 es un lípido isoprenoide, el cual es un factor esencial en la cadena transportadora de electrones de la mitocondria además, puede tener efecto como un antioxidante liposoluble. En un estudio donde se suministró Co-enzima Q10 en una dosis de 200 mg/kg de peso a ratas que expresan la hSOD<sup>G93A</sup>, antes de que presentara la parálisis (50 días de edad), el antioxidante logró prolongar la vida de manera moderada de 135 días en los animales control a 141 días de los animales tratados (Matthews *et al.*, 1998).

Una de las posibles causas por las que los tratamientos con antioxidantes no ha tenido resultados favorables radica en que éstos no son capaces de llegar al SNC. Sin embargo, existen esperanzas de que en el futuro estos tratamientos sean más efectivos. Por ejemplo, el compuesto AEOL 10150 es una porfirina de nueva generación que cataliza la descomposición de especies oxidantes ya que puede ciclar entre los estados III y IV del manganeso. Este compuesto fue generado originalmente para mimetizar a la SOD, además tiene la capacidad de atrapar el peroxinitrito. Cuando este compuesto es administrado intraperitonealmente en una dosis de 2.5 mg/kg de peso en ratones hSOD<sup>G93A</sup> al inicio de los síntomas de la enfermedad (90 días), se observa un aumento en la supervivencia del 26% comparado con los animales control (Batinic-Haberle *et al.*, 2004). Este es el aumento más alto que se ha reportado en un fármaco para tratar la ELA.

### **Factores de crecimiento**

El uso de factores de crecimiento ha dominado los esfuerzos más recientes en los tratamientos experimentales de la ELA. Estas terapias se basan en el hecho de que independientemente de lo que cause el inicio de la enfermedad, un incremento de los

factores tróficos puede aumentar la supervivencia de las neuronas motoras. Los factores neurotróficos son proteínas esenciales para la supervivencia y diferenciación neuronal durante el desarrollo, pero también son importantes para el mantenimiento neuronal. En modelos animales, la eficacia en la aplicación de los factores de crecimiento se ha logrado de dos formas: una mediada por vectores virales que permite a las células blanco fabricar y secretar estos factores de crecimiento, y la infusión de proteínas recombinantes directamente en el cerebro o en la ME.

### **IGF-1**

El factor de crecimiento parecido a la insulina-1 (IGF-1) es un factor neurotrófico potente producido por los oligodendrocitos durante el desarrollo y por las células de Schwann después de que ocurre una lesión. Las NM tienen receptores para el IGF (Kerkhoff et al., 1994), y se ha demostrado que este factor promueve la supervivencia de las NM *in vitro* (Ang et al., 1992). En estudios *in vivo* se han empleado vectores adenovirales que contienen el gen que codifica para el IGF-1. La inyección de este vector en el músculo permitió el transporte del transgen hacia el soma neuronal y produjo la expresión de IGF-1 en las NM. Utilizando esta estrategia, se retrasó la progresión de la enfermedad en ratones transgénicos hSOD1<sup>G93A</sup>, incluso cuando la parálisis ya había iniciado (Kaspar et al., 2003). En pacientes con ELA el IGF-1 se encuentra disminuido y las proteínas a las que se unen se encuentran reguladas anormalmente (Wilczak et al., 2003).

### **VEGF**

El factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) es un factor que tiene una función dual en la neuroprotección y en la angiogénesis, además de que se ha encontrado niveles bajos de VEGF en el líquido cefalorraquídeo de pacientes con ELA (Devos et al., 2004). En experimentos donde se emplearon lentivirus para permitir la expresión del factor de crecimiento vascular se aumentó la supervivencia de ratones hSOD1<sup>G93A</sup> (Azzouz et al., 2004). La infusión intracerebroventricular de la proteína VEGF indujo una mayor supervivencia de ratas transgénicas SOD1<sup>G93A</sup> (Storkebaum et al., 2005).

## **GDNF**

El factor neurotrófico derivado de la glía (GDNF) es producido por células gliales y ejerce sus efectos sobre neuronas y la glía. Algunos estudios indican que este factor tiene efecto neuroprotector para las NM y que previene la pérdida de la expresión de colina acetil transferasa de NM faciales (Yan *et al.*, 1995). En trabajos donde se emplearon vectores adenovirales con el gen que codifica para el GDNF no se produjo una mejoría significativa (Kaspar *et al.*, 2003). Lo mismo ocurre cuando este factor se ha empleado en la clínica; sin embargo, cuando este factor se emplea junto con otros factores parece ejercer un efecto sinérgico (Bilak *et al.*, 2001).

## **HGF**

El factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) participa durante el desarrollo de NM (Maina y Klein, 1999). La sobreexpresión del HGF en un modelo de ELA familiar en ratones es capaz de retrasar el inicio de la enfermedad y retarda su progresión, evitando la muerte de las NM mediada por caspasas y manteniendo los niveles del transportador glial de glutamato EAAT2 (Sun *et al.*, 2002).

La administración de los factores de crecimiento en la clínica ha tenido un éxito limitado. La baja biodisponibilidad y la corta vida de éstos causan la discrepancia entre lo observado *in vitro* y los resultados *in vivo*. La eficacia ha mejorado con el uso de vectores virales, ya que tienen la capacidad de generar una mayor cantidad de estos factores.

## **Terapia Génica**

Los recientes avances en la terapia génica abren la posibilidad de desarrollar un tratamiento efectivo para curar o retrasar la degeneración de las NM. Los vectores virales como los lentivirus y los virus asociados a los adenovirus pueden transferir genes a una gran cantidad de neuronas en diversas especies incluyendo al hombre, y permiten una expresión a largo plazo de los genes que contienen. A continuación se mencionan algunas de las estrategias empleadas en la ELA.



Se han utilizado estrategias para limitar la síntesis del producto del gen mutante hSOD1. Una de ellas ha sido utilizar vectores virales que contiene RNA de interferencia (RNAi) y otra, la infusión directa de oligonucleótidos antisentido. Se han inyectado virus asociados a adenovirus que contenían al RNA de doble cadena dirigido para la hSOD1 mutada, que se transportaron de manera retrograda (Miller *et al.*, 2005) y se obtuvo un retraso en la parálisis y la muerte de los roedores. Un resultado similar se encontró inyectando RNA de doble cadena en múltiples músculos de ratones jóvenes donde se observó un transporte retrogrado hacia las neuronas motoras, lo que redujo la síntesis de la SOD1, retrasándose de manera considerable el inicio de la parálisis por 108 días, y extendiendo la sobrevivencia de los animales durante 99 días (Ralph *et al.*, 2005). La administración de oligonucleótidos antisentido ha sido probada de manera exitosa reduciendo los niveles de la SOD alrededor de un 50% en la médula espinal de ratas hSOD1<sup>G93A</sup> (Smith *et al.*, 2006).

### **Terapias con células troncales**

La muerte selectiva de NM hace que la ELA sea susceptible de ser tratada con terapias de reemplazo celular. Sin embargo, existen varios problemas que resolver. Las neuronas motoras bajas tienen sus cuerpos celulares diseminados a lo largo de la ME, por lo tanto el reemplazo celular requiere de inyecciones en varios sitios de la ME. Además, se debe considerar la dificultad del crecimiento axonal en la ME adulta y encontrar la manera de dirigir los axones hacia sus sitios de innervación en los músculos.

Se han utilizado CTE de ratón para diferenciarlas a precursores de NM, los cuales se inyectaron en la ME de ratas paralizadas por la exposición de éstas al virus sindbis. El virus sindbis es un virus de RNA de cadena sencilla que tiene como blanco específico las NM de la ME, para generar la parálisis en las ratas se inyectan intracranealmente 5000 unidades formadoras de placa del virus sindbis y después de 7 días, los animales presentan parálisis. El trasplante de los precursores de NM derivadas de CTE se realizó a los 14 días después de la infección con la adición de dibutilil cAMP y rolipram, que son moléculas que evitan la repulsión del crecimiento axonal, encontrándose que el 25% de las células transplantadas se diferenciaron a NM dentro de la ME y unas cuantas extendieron sus

axones hacia las astas ventrales de la ME. (Harper *et al.*, 2004). En un estudio posterior se transplantaron NM derivadas de CTE. Adicionalmente, se utilizó dibutilil cAMP y rolipram, además se transplantó una línea de CTN que expresa el factor de crecimiento derivado de la glía (GDNF). Se observó que las NM transplantadas sobrevivieron hasta tres meses en la ME de los animales tratados y que fueron capaces de formar uniones neuromusculares funcionalmente activas, logrando de esta manera recuperar a los animales de la parálisis causada por el virus sindbis (Deshpande *et al.*, 2006). Se han utilizado otras estrategias en ratones hSOD1<sup>G93A</sup> empleando células troncales neurales humanas en la médula espinal (Yan *et al.*, 2006), células humanas de cordón umbilical transferidas a la circulación sistémica (Garbuzova-Davis, 2003) y trasplante de médula ósea (Corti *et al.*, 2004). En todos estos estudios se ha prolongado marginalmente la supervivencia de los ratones transgénicos.

Una estrategia alternativa es la de emplear células troncales con la finalidad de que secreten factores que prolonguen la supervivencia de las NM. Susuki y colaboradores en el 2007 emplearon una línea de CTN que secretan el GDNF. Las células hNPC<sup>GDNF</sup>, al ser transplantadas de manera unilateral secretan el GDNF y éste protege a las NM en las etapas iniciales y finales de la enfermedad, previniendo la muerte de éstas. Sin embargo, este trasplante no promueve la recuperación de la parálisis en las ratas hSOD<sup>G93A</sup>, debido a que este procedimiento no previene la pérdida de la inervación entre la NM y el músculo. Estos estudios sugieren que se requieren de estrategias combinadas para lograr una recuperación funcional en los animales que se han paralizado.

Uno de los primeros estudios de trasplantes de células troncales en pacientes con ELA se llevó a cabo con 9 pacientes a los que les fue diagnosticada la enfermedad y les fueron transplantadas células troncales mesenquimales provenientes de un trasplante autólogo (cresta iliaca). Los pacientes recibieron el trasplante en la región torácica de la médula espinal. No se observaron cambios en la médula espinal, proliferación anormal u otros efectos secundarios desfavorables, observándose en 4 de los 9 pacientes tratados un retraso en la progresión de la enfermedad (Mazzini *et al.*, 2007). Este estudio apoya el empleo células troncales humanas para tratar esta enfermedad.

## **Justificación**

Hasta la fecha no se conoce un tratamiento eficaz para curar la ELA. Por lo tanto, el trasplante de NM derivadas de CTE es una opción factible, ya que se ha demostrado que presentan marcadores específicos de este tipo celular, presentan propiedades funcionales y que al transplantarse en otros modelos animales, tienen la capacidad de integrarse.

## **Hipótesis**

Neuronas motoras derivadas de CTE transplantadas en un modelo de ELA familiar en roedores, inducen una recuperación funcional y una mayor supervivencia.

## **Objetivo general**

Transplantar NM derivadas CTE en un modelo de ELA familiar en roedores, para estudiar su integración anatómica y funcional.

## **Objetivos particulares**

Diferenciar neuronas motoras a partir de CTE de la línea HBG3.

Hacer trasplantes de NM en ratas adultas que expresan la hSOD1<sup>G93A</sup>, para evaluar su capacidad de integración.

Determinar si en las ratas transplantadas se retarda el inicio y la progresión de la enfermedad.



## **Materiales y métodos**

### **Protocolo para la generación de neuronas motoras derivadas de células troncales embrionarias.**

#### **Expansión de células troncales embrionarias**

La expansión de las células troncales embrionarias de ratón HBG3 (que expresan GFP bajo el control del promotor de HB9) se realiza sobre cajas de cultivo celular tratadas previamente con una solución de gelatina 0.1%, empleándose medio KOES. Las células se descongelan en un baño a 37°C, posteriormente se resuspenden en medio KOES y se centrifugan a 1000 rpm por 5 minutos, se retira el sobrenadante y las células se resuspenden en medio KOES y se agrega LIF (1000 U/ml, Chemicon) diariamente para evitar que las células se diferencien.

#### **Formación de cuerpos embrionarios**

Una vez que las células en la caja de cultivo han alcanzado aproximadamente un 70% de confluencia, éstas son disociadas. Las cajas son lavadas con PBS 3 veces y tratadas con tripsina/EDTA al 0.05% durante 5 minutos a 37°C. Posteriormente se agregan 5 ml de medio KOES se centrifugan a 1000 rpm por 5 minutos, se retira el sobrenadante y las células se resuspenden en medio KOES. Después, las células son transferidas a cajas de Petri con la finalidad de generar cuerpos embrionarios a partir de células troncales en flotación. Éstos se mantienen en medio KOES durante 2 días en ausencia de LIF.

#### **Diferenciación a neuronas motoras**

Para lograr el proceso de diferenciación a neuronas motoras, los cuerpos embrionarios son tratados con ácido retinoico (AR) 2 µM y SHH 100 ng/ml durante 4 días más. Después, las células son disociadas con una solución de papaina/L-cisteína + DNAasa I y sembradas en cajas de cultivo con matrigel o con poliornitina/laminina/fibronectina durante 6 días sin AR y SHH.

### **Procedimiento para la inmunofluorescencia**

Las células que se encuentran sobre cajas de cultivo o cubreobjetos de vidrio se lavan 3 veces con PBS durante 5 minutos. Las células se fijan con una solución de paraformaldehído al 4% en PBS, pH=7.3 durante 20 minutos. Se retira la solución y las células se lavan con una solución PBS con albúmina sérica de bovino (BSA) al 0.1% 3 veces por 5 minutos. Posteriormente, se agrega la solución de bloqueo (10% suero normal de cabra en PBS) con tritón X-100 al 0.3% para permeabilizar las células. Se emplearon los siguientes anticuerpos: anticuerpo monoclonal  $\beta$ -tubulina III 1:1000 (COVANCE), anticuerpo monoclonal Islet 1 (Developmental Studies Hybridoma Bank), ChAT anticuerpo policlonal 1:200 (CHEMICON), GFP anticuerpo policlonal 1:500 (Molecular Probes) y anticuerpo policlonal GFAP 1:1000 (DAKO) los cuales, se incubaron en solución de bloqueo, ya sea toda la noche a 4°C, o durante dos horas en rotación a temperatura ambiente. Se retira el anticuerpo primario, las células se lavan con una solución PBS al 0.1% de BSA 3 veces por 5 minutos y se colocan los anticuerpos secundarios: Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit 1:500 (Molecular Probes), Alexa Fluor 568 goat anti-mouse 1:500 (Molecular Probes), anticuerpo biotinilado anticabra 1:100 (Vector Laboratories) y Texas Red avidina 1:200 (Vector Laboratories) en suero normal de cabra al 10% en PBS. El anticuerpo secundario se retira y se lava con una solución PBS al 0.1% de BSA 3 veces por 5 minutos. Por último se adiciona el compuesto Hoechst 32258 5  $\mu$ g/ml en una dilución 1:5000 para distinguir los núcleos de las células.

### **Genotipificación de las ratas hSOD1**

A partir de ratas de 4 semanas de edad, se obtiene una biopsia de la cola y ésta se coloca en 300  $\mu$ l de amortiguador de digestión (TDB), se calienta a 65°C por 15 minutos para inactivar las DNAsas. Después se agregan 200  $\mu$ l de una mezcla de TDB/proteinasa K (0.175 ml de TDB, y 0.025 ml de proteinasa K 10 mg/ml) y se pone a digerir toda la noche. Las colas digeridas se centrifugan a 14,000 rpm durante 5 minutos, se toman 10  $\mu$ l del sobrenadante y se diluyen en 190  $\mu$ l de agua inyectable (1:20), se calienta a 95°C por 15 minutos.

Del DNA obtenido de las biopsias realiza una amplificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la detección del gen humano de la SOD1. Se prepara una mezcla para la PCR de la siguiente forma: (volumen de reacción 25  $\mu$ l) Buffer PCR 10X 2.5  $\mu$ l, dNTPs 0.5  $\mu$ l, MgCl 0.75  $\mu$ l, primers antisentido 0.1  $\mu$ l (CGCGA CACAATCAAAGTGA), primers sentido 0.1  $\mu$ l (CATGAGCCC TAATCCATCCATC TGA), Taq polimerasa 0.5  $\mu$ l, 2  $\mu$ l de DNA de la cola (1:20) y 18.55  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O inyectable para dar un volumen final de 25  $\mu$ l. Esta mezcla se coloca en el termociclador con el siguiente programa: 95°C 5 min, 95°C 1 min, 60°C 1 min (35 ciclos), 72°C 2 min. Los productos de la PCR se separan en un gel de agarosa al 1% durante 30 minutos a 100 V para verificar la presencia de un fragmento de DNA de 232 pares de bases que corresponde a la SOD1 humana.

### **Mantenimiento de la cepa de ratas SOD1 y prueba de evaluación motora**

Para mantener a la cepa de ratas hSOD1<sup>G93A</sup> es necesario realizar cruces de machos positivos para la hSOD1<sup>G93A</sup> aproximadamente a los dos meses de edad con hembras no transgénicas. Las ratas se deben monitorear periódicamente para observar el inicio de la enfermedad que se manifiesta con la parálisis de las extremidades posteriores síntoma que inicia generalmente a los cuatro meses de edad.

Las ratas son evaluadas semanalmente con una prueba de conducta motora, la prueba del rotarod, que consiste en colocar a las ratas sobre un cilindro que gira a una velocidad de 10 rpm con una aceleración 0.2 revoluciones por segundo. Las ratas deben correr sobre este cilindro y el tiempo que duren sobre el cilindro comparado con las ratas control nos dará una idea del daño motor ocurrido a estas como producto de la enfermedad.

Estas evaluaciones se realizan en las ratas a partir de un mes de edad y hasta que las ratas se paralicen y no sean capaces de sostenerse en el cilindro. Posteriormente las ratas son sacrificadas con una sobredosis de anestesia de 60mg x kg de peso de pentobarbital sodico y perfundidas a través del corazón, primero con solución salina al 0.9 % y finalmente con una solución de fijación (paraformaldehído al 4% en PBS, pH=7.3), con la finalidad de

obtener la médula espinal de las ratas para analizarlas mediante tinciones con cresil violeta e inmunotinciones con colina acetil transferasa y GFP.

### **Transplante de neuronas motoras derivadas de CTE**

Para realizar el transplante de NM derivadas de CTE se emplean ratas transgénicas hSOD1<sup>G93A</sup>. Las ratas en etapa adulta, de dos meses y medio de edad, en etapa presintomática son anestesiadas con halotano, se les rasura la espalda y se realiza una incisión con bisturí sobre la piel a lo largo de la médula espinal. Después se localiza la quinta vértebra lumbar, se aseguran las vértebras en su porción lateral con pinzas especiales para ese fin, se realiza una laminectomía y se expone la médula espinal. Se rasgan las meninges para de esta manera inyectar 100,000 células disociadas de los EBs que contengan células que expresen la GFP, en un volumen de 1  $\mu$ l, mediante coordenadas estereotáxicas. 1.5 mm D-V y 1 mm M-L.

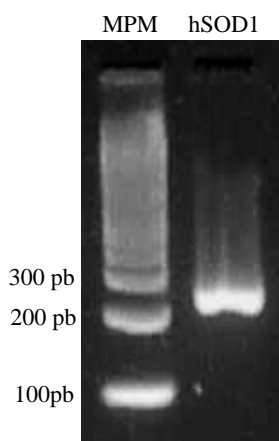
Los animales que son transplantados son inmunosuprimidos diariamente desde un día antes del implante con ciclosporina A (10 mg/kg peso) y antibiótico durante 7 días. El sacrificio y la perfusión de los animales se realizaron como se ha descrito anteriormente los animales son sacrificados en el momento en que se paralizan por completo lo cual es considerado como la etapa terminal de la enfermedad.



## RESULTADOS

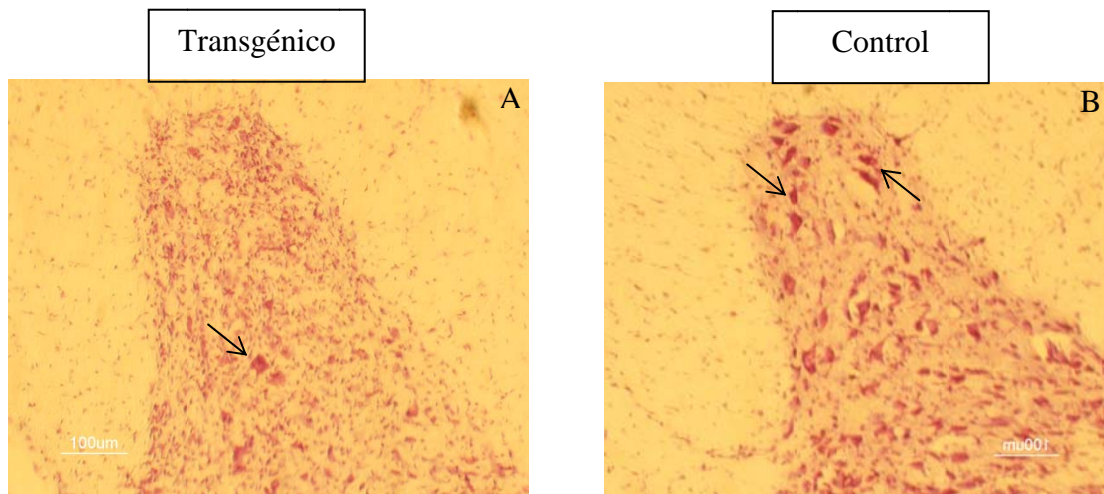
### Mantenimiento de la línea de ratas transgénicas hSOD1<sup>G93A</sup>

Para mantener la línea de ratas transgénicas hSOD1<sup>G93A</sup>, se cruzan machos transgénicos de 2 meses de edad con hembras Sprague-Dawley silvestres. Las ratas resultantes de la cruce a un mes de nacidas se genotifican para detectar la presencia de la SOD1 humana.

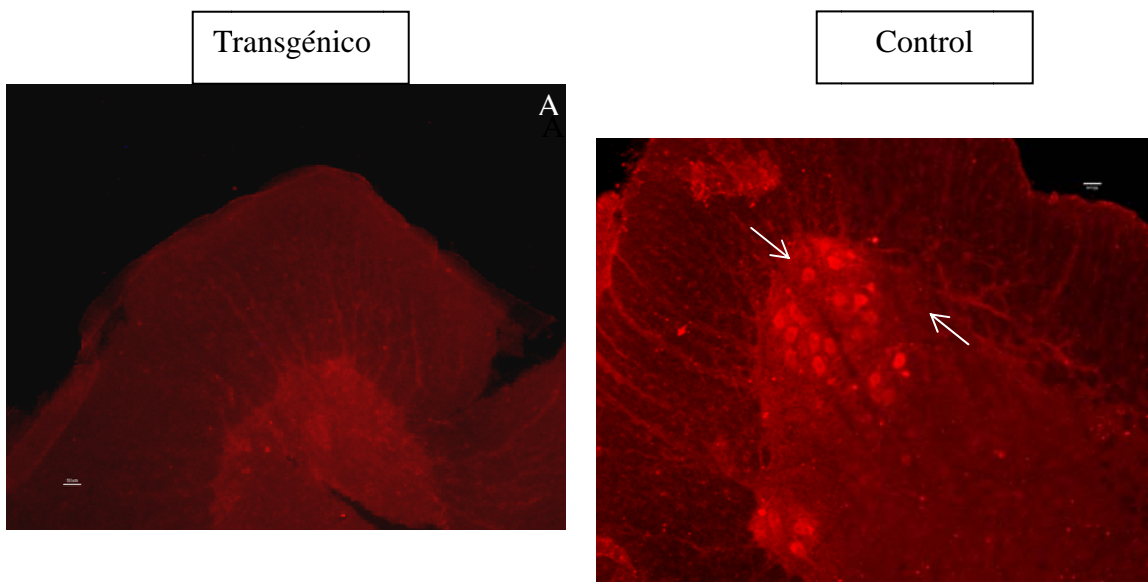


**Figura 5. Genotipificación de ratas hSOD1<sup>G93A</sup>. Electroforesis en gel de agarosa al 2 %, en donde se muestra la amplificación del transgen de 232pb que corresponde a la superóxido dismutasa humana 1 (hSOD 1).**

Las ratas que son positivas para la hSOD1 inician los síntomas de la ELA a partir del cuarto mes de vida, presentando generalmente la parálisis en una de las extremidades posteriores y rápidamente progresan a la última fase de la enfermedad, en la cual se paralizan de las extremidades anteriores y posteriores. En esta etapa los animales son sacrificados y perfundidos, con la finalidad de analizar su medula espinal mediante tinciones con violeta de cresilo e inmunofluorescencias para ChAT.



**Figura 6.** Mediante la tinción de violeta de cresilo se observa una menor cantidad de neuronas en el animal transgénico (A) con respecto al control (B) (flechas).



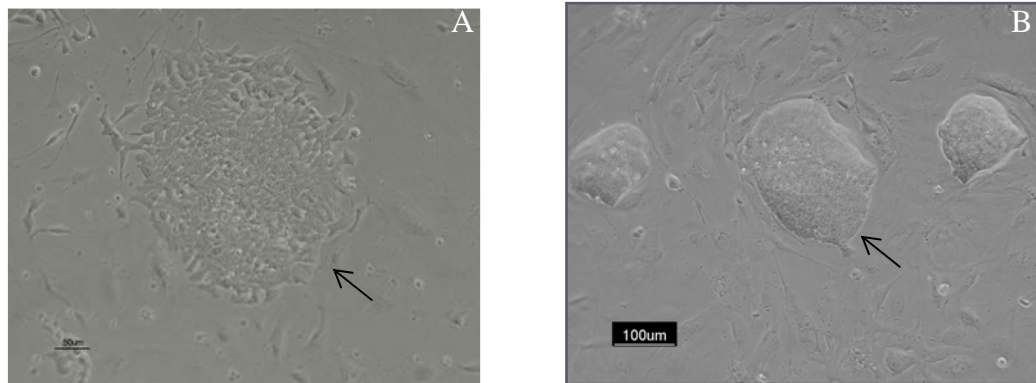
**Figura 7.** En las ratas  $hSOD1^{G93A}$  se observa ausencia de neuronas motoras positivas a Chat, en el asta ventral de la médula espinal (A), mientras que en el animal control hay NM (B) (flechas).

Como se observa en la figuras 6 y 7, existe una importante disminución en el número de NM en los animales transgénicos  $hSOD1^{G93A}$  comparados con los animales silvestres.

Mediante la tinción de violeta de cresilo, se observa una disminución en el número de neuronas en el animal transgénico figura 6, además, la pérdida se demuestra selectiva para las NM con la inmunofluorescencia para colina acetil transferasa (ChAT; Figura 7). La pérdida de NM es la causa por la cual los animales se paralizan. Debido a esta característica de los animales transgénicos, es posible utilizarlos como un modelo de ELA generado por mutaciones en la SOD1 en donde se pueden estudiar posibles alternativas terapéuticas. Una estrategia podría ser terapia de reemplazo celular, para lo cual se propone a las CTE que son pluripotentes y en las que se han descrito procedimientos para generar NM.

### **Expansión de células troncales de ratón de la línea HBG3 formación de cuerpos embrionarios.**

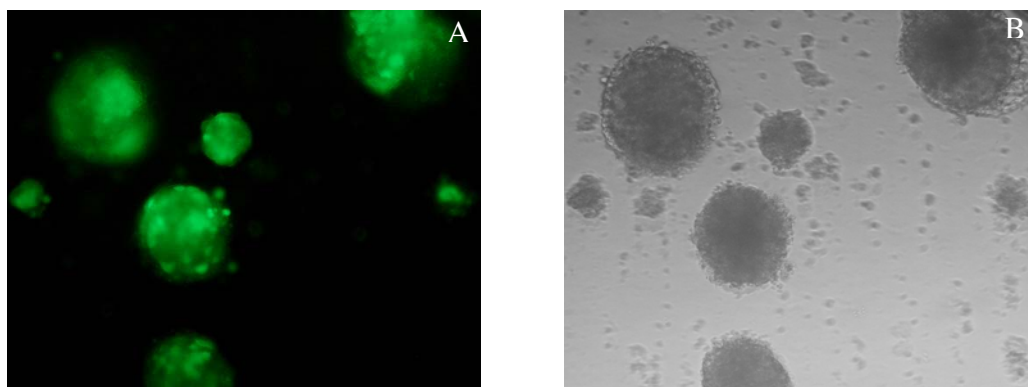
Se han descrito protocolos de diferenciación de CTE para generar NM, empleando la línea de CTE HBG3. En la figura 8 se muestra un cultivo de CTE de la línea HBG3 creciendo sobre una capa de fibroblastos embrionarios de ratón ó sobre gelatina 0.1%. Esta expansión de CTE nos permite tener una cantidad de células suficientes para generar cuerpos embrionarios. Como ya se mencionó las CTE se disocian para formar cuerpos embrionarios que se encuentran en flotación.



**Figura 8. Colonias de células troncales de ratón de la línea HBG3 creciendo sobre gelatina al 0.1% (A) ó sobre fibroblastos embrionarios de ratón inactivos (B) (flechas). Nótese la forma compacta y con bordes bien delimitados de las colonias.**

### Diferenciación de NM

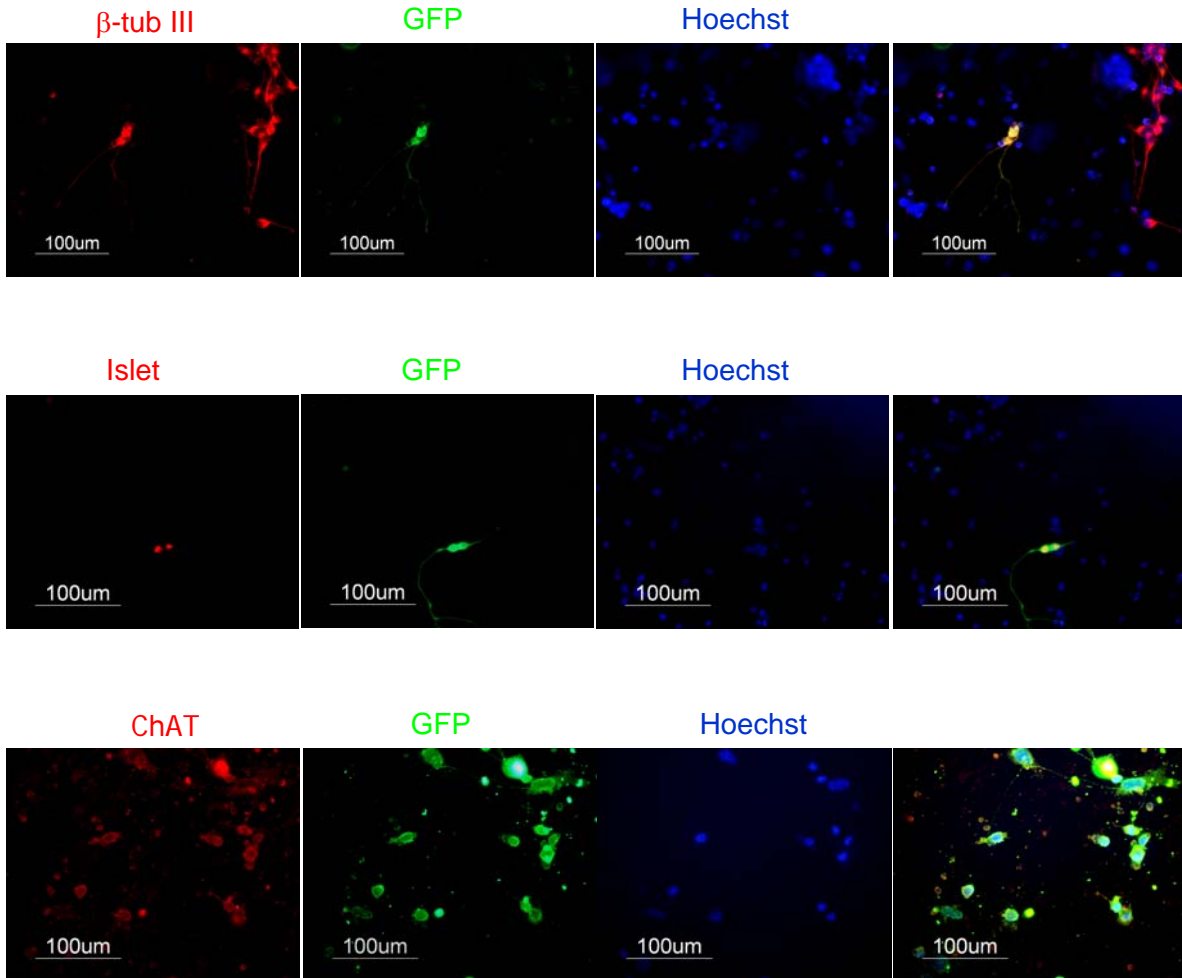
Los cuerpos embrionarios se mantienen en flotación durante 2 días en ausencia de LIF, posteriormente los cuerpos embrionarios son tratados con AR 2  $\mu$ M + SHH 100 ng/ml durante 4 días, para promover su diferenciación a NM. Cuando los cuerpos embrionarios son observados bajo el microscopio de fluorescencia al tercer día de tratamiento, se observan algunas células positivas a GFP y para el cuarto día de tratamiento se observa una gran cantidad de células GFP-positivas (figura 9). Es en este momento que los cuerpos embrionarios son disociados y las células son empleadas para transplantarlas en la médula espinal de las ratas hSOD<sup>G93A</sup>. Otra porción de las células disociadas de los cuerpos embrionarios se resiembran en cajas tratadas con matrigel, con la finalidad de identificar marcadores de NM.



**Figura 9.** Cuerpos embrionarios generados a partir de células troncales de ratón de la línea HBG3, tratadas con AR 2  $\mu$ M + SHH 100 ng/ml durante 4 días. A, Fotografía de epifluorescencia para mostrar la expresión de GFP. B, Micrografía en contraste de fases. En estos cuerpos embrionarios se observa la presencia de GFP, indicativa de la diferenciación a NM.

Con la finalidad de verificar que el protocolo de diferenciación empleado produce el tipo celular esperado, es necesario verificar la presencia de marcadores específicos de NM. En

la figura 10 se muestra una inmunofluorescencia para tubulina  $\beta$  III, Isl 1, ChAT y GFP en células disociadas de cuerpos embrionarios, tratados con AR 2  $\mu$ M + SHH 100ng/ml.

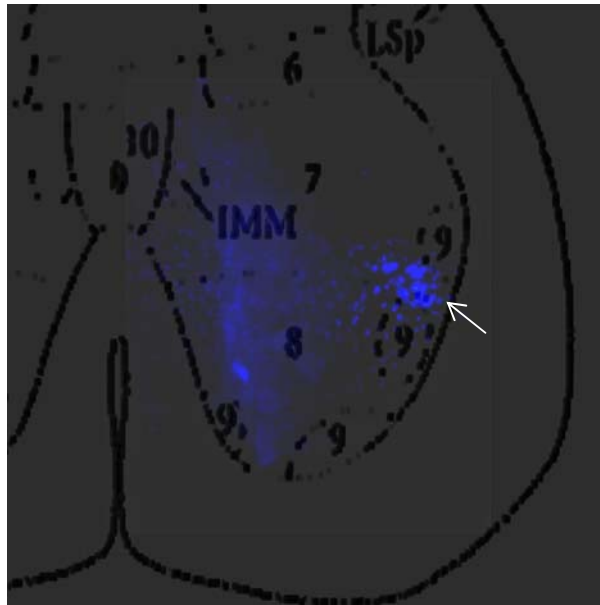


**Figura 10. Inmunofluorescencia de NM derivadas de CTE de la línea HBG3 con anticuerpos contra B-tub III, Isl 1, ChAT y Hoechst.**

### **Transplante de NM derivadas de CTE**

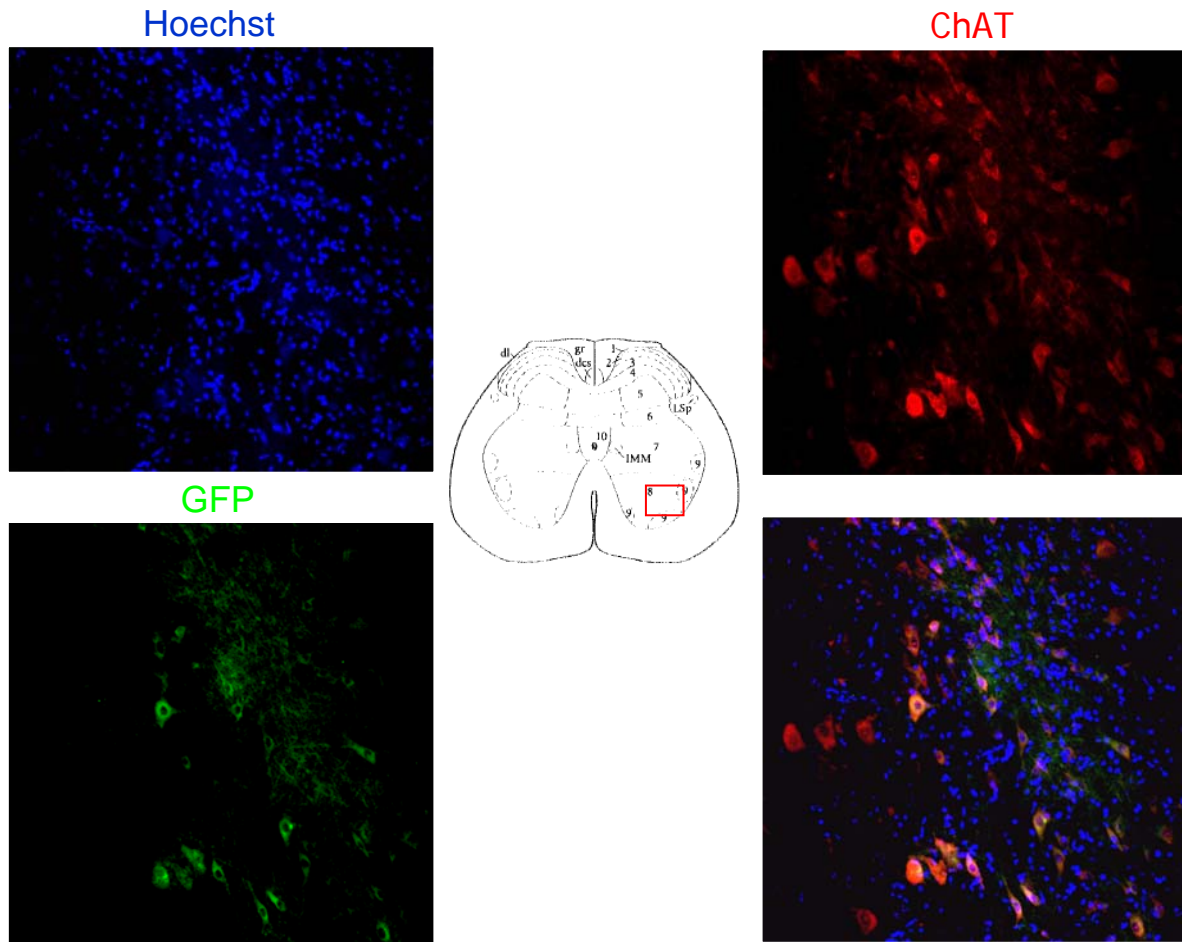
Las células disociadas de los cuerpos embrionarios fueron transplantadas, mediante coordenadas esterotáxicas, en el asta ventral de la médula espinal de las ratas transgénicas

hSOD<sup>G93A</sup>. Posteriormente, se analizó el tejido mediante inmunohistoquímica para observar la integración de las células en dicha estructura.



**Figura 11. Transplante de NM disociadas a partir de cuerpos embrionarios marcadas con Hoechst, Las NM se localizan en la asta ventral de la médula espinal 7 días después del transplante (flecha). Se realizó un montaje del corte de la médula espinal con una figura proveniente de un atlas estereotáxico.**

En la figura 11 se observa el transplante de las células disociadas de los cuerpos embrionarios. Las células son marcadas con Hoechst, con la finalidad de localizar las células transplantadas en la médula espinal. En la figura se observan las células en el asta ventral de la médula espinal, que es el sitio donde se encuentran las NM endógenas.



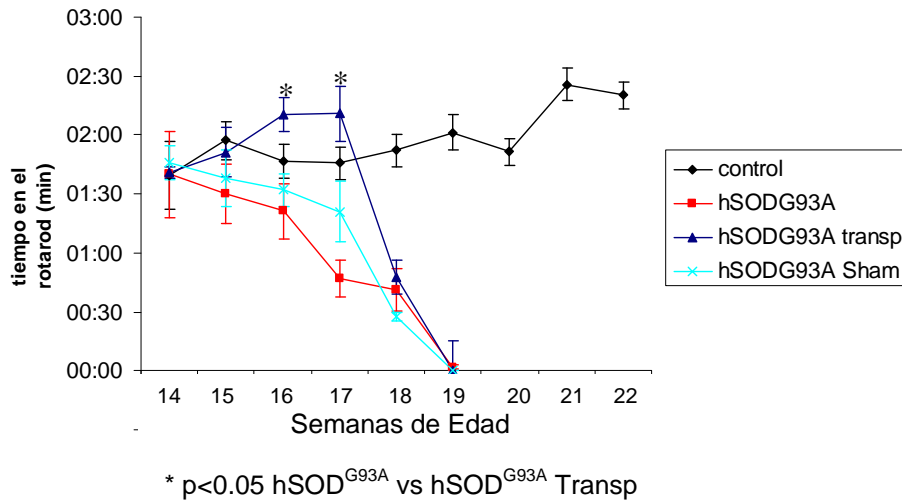
**Figura 12. Transplante de neuronas motoras derivadas de CTE en la médula espinal de ratas transgénicas hSOD<sup>G93A</sup>. Inmunohistoquímica para los marcadores ChAT, GFP y Hoechst 7 días después del transplante.**

Para asegurarse de que células transplantadas en la médula espinal de los animales transgénicos provienen del transplante, se realizó un análisis de inmunofluorescencia con anticuerpos para GFP y ChAT. En la figura 12 se observan células que colocalizan para ambos marcadores indicando que estas células son NM que se generaron a partir de la línea HBG3.

#### **Análisis de las ratas transplantadas en la prueba del rotarod**

Para establecer si existe una recuperación de la función motora, en las ratas que han sido transplantadas, se utiliza la prueba del rotarod y se compara entre los grupos control (no

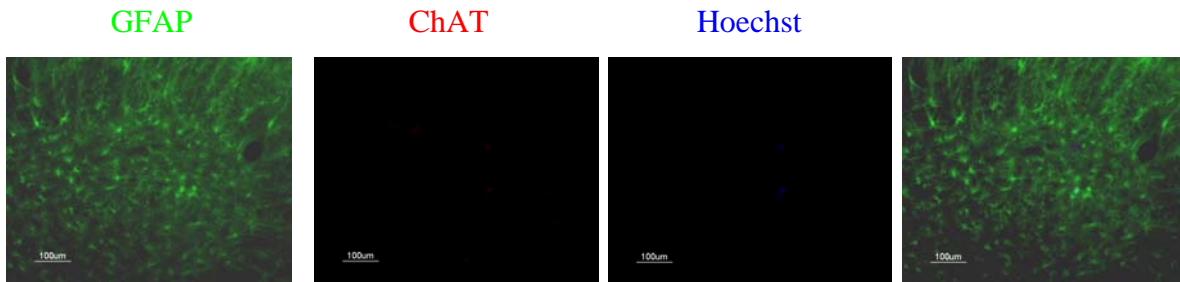
transgénicas), hSODG93A *sham* (inyección de medio N2 en la médula espinal) y hSODG93A transplantadas con NM en la médula espinal.



**Figura 13. Evaluación motora en la prueba del rotarod de las ratas transgénicas hSOD<sup>G93A</sup> transplantadas comparadas con ratas control.**

En la figura 13 se observa que las ratas hSOD<sup>G93A</sup> presentan una disminución en el tiempo que se mantienen en el rotarod a partir de la semana 16, cuando se comparan con los animales control, en el caso del grupo *sham* se observa un comportamiento similar al de los animales hSOD<sup>G93A</sup>. Sin embargo, en los animales transgénicos que fueron transplantados se observa una recuperación transitoria de la función motora ya que durante las semanas 16 y 17 se encuentra una diferencia significativa entre ambos grupos (evaluada mediante un análisis de varianza y con una la prueba a posteriori de Tukey, hSOD<sup>G93A</sup> vs hSOD<sup>G93A</sup> transplantadas). Después de estas 2 semanas se observa una disminución drástica en el tiempo que se mantienen los animales transplantados en el rotarod, encontrándose un comportamiento similar al de las ratas hSOD<sup>G93A</sup> y al igual que los demás grupos experimentales la parálisis total ocurre a las 19 semanas de vida.





**Figura 14. Inmunofluorescencia para GFAP y ChAT de la médula espinal de las ratas transgénicas que fueron transplantadas. En la semana 19, se observa una ausencia de la marca de ChAT y la marca de Hoechst en los núcleos.**

En los animales transplantados se observa una ausencia total de las NM en el asta ventral de la médula espinal (figura 14), tanto de NM endógenas como de las NM transplantadas, en el momento en el que los animales se han paralizado por completo (semana 19). Asimismo se observa una activación astrocítica en la médula espinal de estos animales.

### **Discusión**

Han pasado cerca de 140 años desde que Jean Martin Charcot describió por primera vez la ELA y a pesar de que se ha generado mucho conocimiento sobre los probables mecanismos que causan la enfermedad y el empleo de distintas estrategias terapéuticas, la enfermedad continúa sin tener una cura o cuando menos un tratamiento efectivo.

Una de las estrategias que recientemente se ha empleado para tratar esta enfermedad es la terapia de reemplazo celular, utilizando principalmente CTN de tejido fetal y adulto y CTE para producir NM. En este trabajo se reprodujo la diferenciación de NM derivadas de CTE de la línea HBG3 mediante el protocolo descrito por Wichterle *et al.* 2002. Las NM motoras que generamos a partir de cuerpos embrionarios tratados con AR y SHH presentaron marcadores específicos de estas como Isl 1 y ChAT figura 10, indicativo de su diferenciación. Una de las ventajas de emplear las CTE es que podemos generar una gran cantidad de células para el trasplante. En general, el protocolo empleado para la

diferenciación de NM produce un porcentaje de entre un 20 al 30 % de NM (Wichterle *et al.*, 2002; Miles *et al.*, 2004; Harper *et al.*, 2004).

Un aspecto esencial para emplear NM derivadas de CTE es su funcionalidad, si queremos recuperar la función perdida en el modelo de ELA estudiado. En el 2004 Miles y colaboradores empleando el mismo protocolo de diferenciación demostraron que las NM derivadas de CTE eran funcionalmente activas, es decir pueden generar uniones neuromusculares *in vitro* y son excitables.

Una de las ventajas del modelo de ELA familiar, donde roedores transgénicos expresan la hSOD1 mutada, es que estos animales recapitulan varios de los signos que ocurren en la ELA como la pérdida de las NM (figuras 6 y 7), lo cual las convierte en un buen modelo para ensayar distintas estrategias terapéuticas. En este trabajo se transplantaron 100, 000 células disociadas de cuerpos embrionarios en el asta ventral de la médula espinal de manera unilateral. Uno de los principales objetivos de este trabajo fue determinar si las células transplantadas lograban sobrevivir e integrarse en dicha estructura. En la figura 11, se observa que el trasplante que realizamos se encuentra en el asta ventral a los 7 días después del trasplante, encontrándose células marcadas con Hoechst, que se marcaron antes de transplantarlas con el fin de distinguir las células que provienen del trasplante. Posteriormente se analizó si las células transplantadas eran neuronas motoras. En la figura 12, se muestra que hay células positivas a GFP y a ChAT, que adicionalmente tienen la marca de Hoechst evidenciando que son provenientes del trasplante. Diversos grupos de investigación han transplantado CT en la médula espinal para establecer si existe una recuperación de la función motora de animales con parálisis. Por un lado se han transplantado CTN humanas (Yan *et al.*, 2006), células de cordón umbilical en la circulación sistémica (Garbuzoba Davis *et al.*, 2006) y trasplante de médula ósea (Corti *et al.*, 2004) y NM diferenciadas a partir de CTE (Harper *et al.*, 2004). Pero en todos los casos la supervivencia de los animales transplantados se prolongó solo por un periodo corto.

En el trabajo de Harper del 2004 se encontró una integración del 25% de las NM que se transplantaron, en el animal paralizado por la infección del virus Sindbis, sin embargo,

estas células no extendieron sus axones hacia las raíces ventrales de la médula espinal y tampoco lograron formar uniones neuromusculares. Por lo tanto, no existió una recuperación anatómica y funcional. Corti y colaboradores observaron que el trasplante de médula ósea, en el modelo de ELA familiar en roedores, aumenta la supervivencia de los animales tratados y que las células transplantadas se pudieron diferenciar hacia linajes neuronales e inclusive hacia músculo esquelético. En un estudio donde se emplearon CTN humanas, las cuales fueron transplantadas en animales transgénicos hSOD1<sup>G93A</sup>, se encontró que estas células se diferenciaron a neuronas, las cuales fueron capaces de establecer conexiones con las neuronas del huésped. Este tratamiento fue capaz de prolongar la supervivencia de los animales transplantados con respecto a los animales que no recibieron el trasplante (Yan *et al.* 2006). Los resultados anteriores, demuestran que las CT y las NM derivadas de estas, al ser transplantadas en médula espinal se pueden integrar y logran prolongar la supervivencia en el modelo de ELA familiar. Sin embargo, en la mayoría de los estudios esta recuperación es marginal.

Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que el trasplante de NM es capaz de causar recuperación transitoriamente en las ratas transgénicas que sobreexpresan la hSOD1<sup>G93A</sup>, ya que los animales que fueron transplantados, a los dos meses y medio de edad con estas células, tuvieron una recuperación de la función motora evaluada mediante la prueba del rotarod cuando se comparan con los grupos control en la semana 16 y 17 de vida (figura 13). No obstante, esta recuperación es transitoria, debido a que los animales sufren una declinación en el tiempo que se mantienen en el rotarod a la semana 18 y finalmente se paralizan a la misma edad que los animales transgénicos que no recibieron el trasplante. Esto, aunado al hecho de que no encontramos NM cuando los animales se paralizaron (Figura 14), nos indica que las células que se transplantaron no lograron llegar a su blanco y formar uniones musculares y/o que las células transplantadas no sobrevivieron al proceso degenerativo que ocurre en la etapa final de la enfermedad.

Las células que fueron transplantadas en la médula espinal de las ratas transgénicas hSOD1<sup>G93A</sup> no extienden sus axones fuera de la médula espinal (figura 12), ésta puede ser la razón por la cual no existe una recuperación permanente en estos animales. En un trabajo

donde se transplantaron NM derivadas de CTE en la médula espinal de ratas paralizadas se observó que solo el 2% de las células que lograron integrarse pudieron extender sus axones fuera de la médula espinal (Harper *et al.* 2004). Esto sugiere que es necesario emplear estrategias complementarias para guiar a los axones hacia el músculo para de esta manera formar uniones neuromusculares.

Estudios recientes han demostrado que otros tipos celulares como los astrocitos y la microglía podrían causar daño a las NM en el modelo de ELA familiar. Nagai *et al.* 2007 demostraron en estudios *in vitro*, que los astrocitos causan daño a las NM cuando ambos son co-cultivados, además demostraron que los astrocitos secretan al medio una molécula que causa la muerte de las NM, ya que al exponer a estas al medio condicionado de astrocitos se observó una disminución en el número de NM. En otro estudio se evidenció, que la microglía está involucrada en la progresión de la ELA, en este caso, se demostró que cuando se transplantaba la microglía de un ratón silvestre a un ratón transgénico hSOD<sup>G93A</sup>, se retrasa el inicio de los síntomas de la enfermedad y hay una mayor supervivencia de estos, sugiriendo que la microglía del animal silvestre protege del daño a las NM. En la figura 14, se observa que en la etapa final de la enfermedad (semana 19) hay una pérdida total de NM en el asta ventral de la médula espinal, debido a que no hay células positivas a ChAT, en contraste hay una gran cantidad de células positivas a GFAP. Por lo tanto, es posible que el deterioro de los animales transplantados, esté relacionado con las condiciones que existen en la médula espinal del animal transgénico y probablemente los mecanismos que causen el daño a las NM motoras endógenas también causen daño a las NM transplantadas.

Una posible explicación para la recuperación observada en este trabajo es que las células que se transplantaron actuaran como una fuente de factores tróficos para las NM endógenas logrando prolongar su supervivencia. Con relación a esto, se ha reportado que progenitores neuronales humanos que secretan GDNF (hNPC<sup>GDNF</sup>) son capaces de integrarse en la ME de ratas que expresan la hSOD1 mutada. Además, se observó que el trasplante no tuvo efectos colaterales, observándose mayor expresión de marcadores colinérgicos en las NM cercanas al sitio del trasplante y un aumento en la supervivencia de los animales tratados

(Klein *et al.* 2005). En otro estudio, donde se transplantaron las células hNPC<sup>GDNF</sup> en el mismo modelo animal, se encontró que este factor protege a las NM durante el inicio de los síntomas y en las etapas finales de la enfermedad. Sin embargo, los animales tratados finalmente se paralizaron y murieron debido a que no se lograron mantener las uniones neuromusculares, ya que aunque el GDNF protege al soma de la NM, este factor no es capaz de prevenir la pérdida de la inervación hacia la musculatura. Estos antecedentes plantean la necesidad de utilizar varias estrategias para evitar la muerte y degeneración de las NM (Susuki *et al.*, 2007).

Para que exista una recuperación en los animales paralizados debido a la pérdida de NM, es necesario que las células transplantadas sobrevivan y se integren, adicionalmente estas deben tener la capacidad de extender sus axones hacia la musculatura y formar uniones neuromusculares. En el estudio de Deshpande y colaboradores (2006) demostró que el trasplante de NM derivadas de CTE de la línea HBG3, se logró una recuperación funcional, en ratas donde hay pérdida de NM debida al virus Sindbis. En este trabajo, adicionalmente se emplearon moléculas para evitar la inhibición del crecimiento axonal como el dibutilil AMP cíclico y el rolipram. Asimismo, se realizó un co-trasplante, en el músculo, de CTN humanas que secretan GDNF, con la finalidad de atraer los axones hacia su blanco y así formar uniones musculares funcionales. Este es el único trabajo donde se ha demostrado una recuperación de la función motora mediante el trasplante de NM derivadas de CTE (Deshpande *et al.*, 2006). Cabe mencionar que el modelo que emplean para generar la parálisis en las ratas, no es un modelo que tenga similitud con la ELA, por lo tanto aun falta por verificar si esta estrategia es válida también en el modelo de ELA familiar en roedores.

## Conclusiones y perspectivas

En este trabajo se diferenciaron NM derivadas de CTE de la línea HBG3 con la adición de AR y SHH, utilizando este protocolo de diferenciación, logramos identificar, en estas células marcadores específicos de NM. Asimismo, ensayamos la capacidad de estas células para causar una recuperación funcional al ser transplantadas en un modelo de ELA familiar en ratas, en las cuales ocurre una pérdida de NM, la parálisis y la muerte. Los resultados obtenidos indican que las NM derivadas de CTE se pueden integrar en la médula espinal de los animales transgénicos y causar una recuperación transitoria cuando se comparan con los animales que no fueron transplantados. Sin embargo éstos animales se paralizan y mueren y al analizar la médula espinal de estos en la etapa final de la enfermedad se observa la ausencia de NM tanto endógenas como de las transplantadas.

Por esta razón, se hace necesario el empleo de estrategias adicionales para que las células transplantadas logren integrarse, sobrevivir y enviar sus axones hacia el músculo para formar uniones neuromusculares. Tomando como ejemplo el trabajo de Deshpande *et al.* 2006, se pueden emplear moléculas como el rolipram y el dAMPc para evitar la inhibición del crecimiento axonal y moléculas que sirvan para guiar el crecimiento de los axones de las NM hacia el músculo.

Otra vertiente que puede tomar este trabajo, es la de estudiar durante el desarrollo embrionario, mediante trasplante intrauterino de NM en embriones de rata hSOD<sup>G93A</sup>, las condiciones que permitan que las células transplantadas puedan sobrevivir y causar una recuperación en este modelo de ELA familiar en roedores. Esta estrategia experimental es posible, ya que se sabe que en el desarrollo embrionario no existe inhibición del crecimiento axonal y se están formando las uniones musculares funcionales.

## Referencias

Abbondanzo SJ, et al. (1993). "Derivation of embryonic stem cell lines". Method Enzymol 225, 803-823.

Abe, K., et al. (1995). "Induction of nitrotyrosine-like immunoreactivity in the lower motor neuron of amyotrophic lateral sclerosis." Neurosci Lett 199(2): 152-4.

Andersen, P. M., et al. (2001). "The geographical and ethnic distribution of the D90A CuZn-SOD mutation in the Russian Federation." Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord 2(2): 63-9.

Ang, L. C., et al. (1992). "Effects of astrocytes, insulin and insulin-like growth factor I on the survival of motoneurons in vitro." J Neurol Sci 109(2): 168-72.

Appel, B., et al. (1995). "Motoneuron fate specification revealed by patterned LIM homeobox gene expression in embryonic zebrafish". Development 121, 4117-4125.

Arber, S., et al. (1999). "Requirement for the homeobox gene Hb9 in the consolidation of motor neuron identity." Neuron 23(4): 659-74.

Avilion A., et al. (2003) Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. Genes Dev; 17:126-140.

Azzouz, M., et al. (2004). "VEGF delivery with retrogradely transported lentivector prolongs survival in a mouse ALS model". Nature 429, 413-417.

Barber, S. C. et al. (2006). "Oxidative stress in ALS: a mechanism of neurodegeneration and a therapeutic target." Biochim Biophys Acta 1762(11-12): 1051-67.

Batinic-Haberle, I., et al. (2004). "New class of potent catalysts of O<sub>2</sub>-dismutation. Mn(III) ortho-methoxyethylpyridyl- and di-ortho-methoxyethylimidazolylporphyrins." Dalton Trans(11): 1696-702.

Beckman, J. S., et al. (1994). "Reactions of nitric oxide, superoxide and peroxynitrite with superoxide dismutase in neurodegeneration." Prog Brain Res 103: 371-80.

Beers, D. R., et al. (2006). "Wild-type microglia extend survival in PU.1 knockout mice with familial amyotrophic lateral sclerosis." Proc Natl Acad Sci U S A 103(43): 16021-6.

Briscoe, J., et al. (2000). A homeodomain protein code specifies progenitor cell identity and neuronal fate in the ventral neural tube. Cell 101, 435-445.

Bruijn, L. I. y D. W. Cleveland (1996). "Mechanisms of selective motor neuron death in ALS: insights from transgenic mouse models of motor neuron disease." Neuropathol Appl Neurobiol 22(5): 373-87.

Bruijn, L. I., et al. (2004). "Unraveling the mechanisms involved in motor neuron degeneration in ALS." Annu Rev Neurosci 27: 723-49.

Chambers, I., et al. (2003). "Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells." Cell 113(5): 643-55.

Corti, S., et al. (2004). Wild-type bone marrow cells ameliorate the phenotype of SOD1-G93A ALS mice and contribute to CNS, heart and skeletal muscle tissues. Brain 127, 2518–2532.

Dani, C., et al. (1997). Differentiation of embryonic stem cells into adipocytes invitro. J. Cel. Sci. 110, 1279-1285.

Deshpande, D.M. et al.(2006). "Recovery from paralysis in adult rats using embryonic stem cells". Ann. Neurol. 60, 32–44.

Desnuelle, C., et al. (2001). "A double-blind, placebo-controlled randomized clinical trial of alpha-tocopherol (vitamin E) in the treatment of amyotrophic lateral sclerosis. ALS riluzole-tocopherol Study Group." Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord 2(1): 9-18.

Devos, D., et al. (2004). "Low levels of the vascular endothelial growth factor in CSF from early ALS patients." Neurology 62(11): 2127-9.

Doetschman, T. C., et al. (1985). "The in vitro development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium." J Embryol Exp Morphol 87: 27-45.

Doniach, T. (1995). "Basic FGF as an inducer of anteroposterior neural pattern". Cell 83, 1067–1070.

Edlund, T. y Jessell, T. M. (1999) "Progression from extrinsic to intrinsic signaling in cell fate specification: a view from the nervous system." Cell 96, 211–224.

Eisen, J. S. (1991) "Determination of primary motoneuron identity in developing zebrafish embryos." Science 252, 569–572.

Estevez, A. G., et al. (1999). "Induction of nitric oxide-dependent apoptosis in motor neurons by zinc-deficient superoxide dismutase." Science 286(5449): 2498-500.

Ericson, J., et al. (1997). "Graded Sonic Hedgehog signaling and the specification of cell fate in the ventral neural tube". Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. 62, 451–466.



Evans, M. J. y M. H. Kaufman (1981). "Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos." Nature 292(5819): 154-6.

Fitzmaurice, P. S., et al. (1996). "Evidence for DNA damage in amyotrophic lateral sclerosis." Muscle Nerve 19(6): 797-8.

Gage, F. H. (2000). "Mammalian neural stem cells." Science 287(5457): 1433-8.

Garbuzova-Davis, S., et al. (2003). "Intravenous administration of human umbilical cord blood cells in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis: distribution, migration, and differentiation". J. Hematother. Stem Cell Res. 12, 255–270.

Gavalas, A. y Krumlauf, R. (2000). "Retinoid signaling and hindbrain patterning". Curr. Opin. Genet. Dev. 10, 380–386.

Graf, M., (2005). "High dose vitamin E therapy in amyotrophic lateral sclerosis as add-on therapy to riluzole: results of a placebo-controlled double-blind study." J Neural Transm 112(5): 649-60.

Gurney, M. E., H. Pu, et al. (1994). "Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu,Zn superoxide dismutase mutation." Science 264(5166): 1772-5.

Harada, A., et al. (1998). "Golgi vesiculation and lysosome dispersion in cells lacking cytoplasmic dynein." J Cell Biol 141(1): 51-9.

Harper, J. M., et al. (2004). "Axonal growth of embryonic stem cell-derived motoneurons in vitro and in motoneuron-injured adult rats." Proc Natl Acad Sci U S A 101(18): 7123-8.

Howland, D. S., et al. (2002). "Focal loss of the glutamate transporter EAAT2 in a transgenic rat model of SOD1 mutant-mediated amyotrophic lateral sclerosis (ALS)." Proc Natl Acad Sci U S A 99(3): 1604-9.

Jessell, T. M. (2000). "Neuronal specification in the spinal cord: inductive signals and transcriptional codes." Nat Rev Genet 1(1): 20-9.

Kaspar, B.K., et al. (2003). "Retrograde viral delivery of IGF-1 prolongs survival in a mouse ALS model". Science 301, 839–842.

Kawasaki, H., et al. (2000). "Induction of midbrain dopaminergic neurons from ES cells by stromal cell-derived inducing activity." Neuron 28(1): 31-40.

Kerckhoff, H., et al. (1994). "Insulin-like and fibroblast growth factors in spinal cords, nerve roots and skeletal muscle of human controls and patients with amyotrophic lateral sclerosis." Acta Neuropathol 87(4): 411-21.

Kirschstein, R. y Skirboll, L.R. (2001). "Stem Cells: Scientific Progress and Future Research Directions". National Institutes of Health. Report prepared by the National Institutes of Health.

Klein, S. M., et al. (2005). "GDNF delivery using human neural progenitor cells in a rat model of ALS." Hum Gene Ther 16(4): 509-21.

Lumsden, A. y Krumlauf, R. (1996). "Patterning the vertebrate neuraxis". Science 274, 1109–1115.

Lupo, G., et al. (2006). "Mechanisms of ventral patterning in the vertebrate nervous system". Nat Rev Neurosci, 2006. 7(2): p. 103-14.

Kraus, R. L., et al. (2005). "Antioxidant properties of minocycline: neuroprotection in an oxidative stress assay and direct radical-scavenging activity." J Neurochem 94(3): 819-27.

Maina, F. and R. Klein (1999). "Hepatocyte growth factor, a versatile signal for developing neurons." Nat Neurosci 2(3): 213-7.

Marti, E., et al. (1995). "Requirement of 19K form of Sonic hedgehog for induction of distinct ventral cell types in CNS explants". Nature 375, 322–325.

Martin, G.R., (1981). "Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells". Proc Natl Acad Sci U S A, 1981. 78(12): p. 7634-8.

Matsumoto, A., et al. (2006). "Disease progression of human SOD1 (G93A) transgenic ALS model rats." J Neurosci Res 83(1): 119-33.

Matthews, R. T., L. Yang, et al. (1998). "Coenzyme Q10 administration increases brain mitochondrial concentrations and exerts neuroprotective effects." Proc Natl Acad Sci U S A 95(15): 8892-7.

Mazzini, L., K. Mareschi, et al. (2008). "Stem cell treatment in Amyotrophic Lateral Sclerosis." J Neurol Sci 265(1-2): 78-83.

Miles, G. B., et al. (2004). "Functional properties of motoneurons derived from mouse embryonic stem cells." J Neurosci 24(36): 7848-58.

Miller, T.M., et al. (2005). "Virus-delivered small RNA silencing sustains strength in amyotrophic lateral sclerosis". Ann. Neurol. 57, 773–776.

Muhr, J., et al. (1999). Convergent inductive signals specify midbrain, hindbrain, and spinal cord identity in gastrula stage chick embryos. Neuron 23, 689–702.

Nagai, M., et al. (2001). "Rats expressing human cytosolic copper-zinc superoxide dismutase transgenes with amyotrophic lateral sclerosis: associated mutations develop motor neuron disease." J Neurosci 21(23): 9246-54.

Nagai, M., et al. (2007). "Astrocytes expressing ALS-linked mutated SOD1 release factors selectively toxic to motor neurons." Nat Neurosci 10(5): 615-22.

Niederreither, K., et al. (1999). "Embryonic retinoic acid synthesis is essential for early mouse post-implantation development". Nature Genet. 21, 444–448.

Palacios, R., et al. (1995). "In vitro generation of hematopoietic stem cells from an embryonic stem cell line." Proc Natl Acad Sci U S A 92(16): 7530-4.

Pease, S., et al. (1990). "Isolation of embryonic stem (ES) cells in media supplemented with recombinant leukemia inhibitory factor (LIF)." Dev Biol 141(2): 344-52.

Pesce, M. and H. R. Scholer (2000). "Oct-4: control of totipotency and germline determination." Mol Reprod Dev 55(4): 452-7.

Pfaff, S. L., et al. (1996). Requirement for LIM homeobox gene *Isl1* in motor neuron generation reveals a motor neuron-dependent step in interneuron differentiation. Cell 84,309–320.

Placzek, M., et al. (2000). "The case for floor plate induction by the notochord." Curr. Opin. Neurobiol. 10, 15–22.

Pierani., et al. (1999). "A Sonic Hedgehog independent, retinoid-activated pathway of neurogenesis in the ventral spinal cord". Cell 97, 903–915.

Pituello, F. (1997). "Neuronal specification: generating diversity in the spinal cord". Curr. Biol. 7, 701–704.

Poh A. et al. (2002). "Patterning of the vertebrate ventral spinal cord." Int J Dev Biol 46(4): 597-608.

Ralph, G.S., et al. (2005). "Silencing mutant SOD1 using RNAi protects against neurodegeneration and extends survival in an ALS model". Nat. Med. 11, 429–433.

Rathjen, J., et al. (2002). "Directed differentiation of pluripotent cells to neural lineages: homogeneous formation and differentiation of a neuroectoderm population." Development 129(11): 2649-61.

- Reaume, A. G., et al. (1996). "Motor neurons in Cu/Zn superoxide dismutase-deficient mice develop normally but exhibit enhanced cell death after axonal injury." Nat Genet 13(1): 43-7.
- Ripps, M. E., et al. (1995). "Transgenic mice expressing an altered murine superoxide dismutase gene provide an animal model of amyotrophic lateral sclerosis." Proc Natl Acad Sci U S A 92(3): 689-93.
- Rosen, D. R., et al. (1993). "Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis." Nature 362(6415): 59-62.
- Schoenwolf, G. C. (1982). "On the morphogenesis of the early rudiments of the developing central nervous system." Scan Electron Microsc(Pt 1): 289-308.
- Sejvar, J. J., et al. (2005). "Amyotrophic lateral sclerosis mortality in the United States, 1979-2001." Neuroepidemiology 25(3): 144-52.
- Shaw, P. J., et al. (1995). "CSF and plasma amino acid levels in motor neuron disease: elevation of CSF glutamate in a subset of patients." Neurodegeneration 4(2): 209-16.
- Slack, J.M.W. (2001) *Essential Developmental Biology*. Blackwell Science. Pp 13.
- Smith, R.A., et al. (2006). "Antisense oligonucleotide therapy for neurodegenerative disease". J. Clin. Invest. 116, 2290–2296.
- Stewart, C. L., et al. (1992). "Blastocyst implantation depends on maternal expression of leukaemia inhibitory factor." Nature 359(6390): 76-9.
- Storkebaum E., et al. (2005). "Treatment of motoneuron degeneration by intracerebroventricular delivery of VEGF in a rat model of ALS". Nat Neurosci 8(1): 85-92.
- Sun, W., H. Funakoshi, et al. (2002). "Overexpression of HGF retards disease progression and prolongs life span in a transgenic mouse model of ALS." J Neurosci 22(15): 6537-48.
- Suzuki, M., J. McHugh, et al. (2007). "GDNF secreting human neural progenitor cells protect dying motor neurons, but not their projection to muscle, in a rat model of familial ALS." PLoS ONE 2(1): e689.
- Tanabe, Y., et al. (1998). "Specification of motor neuron identity by the MNR2 homeodomain protein". Cell 95, 67–80.
- Volterra, A., et al. (1994). "Glutamate uptake inhibition by oxygen free radicals in rat cortical astrocytes." J Neurosci 14(5 Pt 1): 2924-32.
- Wang, J., et al. (2003). "Copper-binding-site-null SOD1 causes ALS in transgenic mice: aggregates of non-native SOD1 delineate a common feature." Hum Mol Genet 12(21): 2753-64.

Wichterle, H., I., et al. (2002). "Directed differentiation of embryonic stem cells into motor neurons." Cell 110(3): 385-97.

Wilczak, N., R. A. de Vos, et al. (2003). "Free insulin-like growth factor (IGF)-I and IGF binding proteins 2, 5, and 6 in spinal motor neurons in amyotrophic lateral sclerosis." Lancet 361(9362): 1007-11.

Wobus, A. M., et al. (1984). "Characterization of a pluripotent stem cell line derived from a mouse embryo." Exp Cell Res 152(1): 212-9.

Yan, J., et al. (2006). "Combined immunosuppressive agents or CD4 antibodies prolong survival of human neural stem cell grafts and improve disease outcomes in amyotrophic lateral sclerosis transgenic mice". Stem Cells. 24(8): p. 1976-85.

Zhang, S. C., et al. (2001). "In vitro differentiation of transplantable neural precursors from human embryonic stem cells." Nat Biotechnol 19(12): 1129-33.

Yan, Q., et al. (1995). "In vivo neurotrophic effects of GDNF on neonatal and adult facial motor neurons." Nature 373(6512): 341-4.