



UNIVERSIDAD
NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO



PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS
(Instituto de Fisiología Celular)

**La progesterona y el 17 β -estradiol incrementan la
diferenciación de neuronas motoras derivadas de células
troncales embrionarias**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

P R E S E N T A:

Rodrigo López González

Tutor: Dr. Iván Velasco Velázquez

MÉXICO, D. F.

Febrero de 2012



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.

Índice

Lista de abreviaturas.....	3
Resumen.....	6
Abstract.....	7
Introducción.....	8
Células troncales embrionarias (CTE).....	8
Formación de las neuronas motoras (NM) durante el desarrollo embrionario.....	10
Diferenciación de NM a partir de células pluripotenciales.....	14
Hormonas esteroides.....	18
Receptores de hormonas esteroides.....	20
Receptores de estrógenos.....	21
Receptores de progesterona.....	23
Efectos no genómicos mediados por hormonas esteroides.....	26
Expresión de ER y PR <i>in vivo</i>	28
Efectos neuroprotectores de la progesterona y el estradiol.....	29
Efecto de la progesterona y el estradiol sobre las CTE.....	32
Efecto de la progesterona y el estradiol en la diferenciación neuronal.....	34
Hipótesis.....	37
Objetivos.....	37
Materiales y Métodos.....	37
Protocolo para la generación de NM derivadas de CTE.....	37
Tratamientos farmacológicos.....	38
Procedimiento para la inmunofluorescencia.....	39
Conteo celular.....	39
Cuantificación de NM positivas a proteína fluorescente verde por citometría de flujo.....	40
Cuantificación de la expresión de marcadores de NM por RT-PCR cuantitativa.....	41
Análisis estadístico.....	42
Resultados.....	42
Discusión.....	56
Conclusiones.....	59
Perspectivas.....	60
Referencias.....	61

Lista de abreviaturas

3 β HSD	3 β Hidroxi-esteroide deshidrogenasa, del inglés 3 β Hydroxi-Steroid Dehydrogenase
AF	Función de activación, del inglés Activation Function
AR	Receptor de andrógenos, del inglés Androgen Receptor
BMP	Proteína morfogénica de hueso, del inglés Bone Morphogenetic Protein
BDNF	Factor neurotrófico derivado del cerebro, del inglés Brain Derived Neurotrophic Factor
BrdU	Bromodeoxiuridina
BSA	Albumina sérica de bovino, del inglés Bovine Serum Albumin
CDK	Cinasa dependiente de ciclina, del inglés Cyclin Dependent Kinase
ChAT	Transferasa de acetil colina, del inglés Choline Acetyl transferase
CNPase	Diesterasa de nucleótidos cíclicos, del inglés Cyclic Nucleotide Diesterase
CTE	Células Troncales Embrionarias
DHE	Dehidroepiandrosterona
EB	Cuerpos embrioides, del inglés Embryoid Bodies
ELA	Esclerosis Lateral Amiotrófica
EGF	Factor de crecimiento epidermal, del inglés Epidermal Growth Factor
ER	Receptor de estrógenos, del inglés Estrogen Receptor
ERP	Elementos de respuesta a progesterona
ERR	Receptores relacionados a los ER
FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos, del inglés Fibroblast Growth Factor
GFP	Proteína verde fluorescente, del inglés Green Fluorescent Protein
GPR30	Receptor de estrógenos acoplado a proteína G, del inglés G-Protein Coupled Estrogen Receptor
GR	Receptor de glucocorticoides, del inglés Glucocorticoid Receptor

HB9	Motor neuron and pancreas homeobox 1
HSP	Proteína de choque térmico, del inglés Heat Shock Protein
IGF	Factor de crecimiento insulínico, del inglés Insulin Growth Factor
Irx3	Iroquois 3
iPSC	Células troncales pluripotentes inducibles, del inglés inducible Pluripotent Stem Cells
LIF	Factor inhibitorio de la leucemia, del inglés Leukemia Inhibitory Factor
MEF	Fibroblastos embrionarios de ratón, del inglés Mouse Embryonic Fibroblasts
MR	Receptor de mineralocorticóides, del inglés Mineralocorticoid Receptor
MPP	1,3-Bis (4-hidroxifenil)-4-metil-5-[4-(2-piperidinil etoxi) fenol]-1H-pirazol
MPTP	1-metil-4-fenil-1, 2, 3, 6-tetrahidropiridina
Nkx 2.2	Nk2 homeodominio 1, del inglés Nk2 homeobox 2
Nkx 6.1	Nk6 homeodominio 1, del inglés Nk6 homeobox 1
NM	Neuronas Motoras
NSC	Células troncales neurales, del inglés Neural Stem Cells
NPC	Células progenitoras neurales, del inglés Neural Progenitor Cells
Olig2	Factor de transcripción de linaje oligodendrocítico, del inglés Oligodendrocyte Lineage Transcription Factor 2
PC	Células progenitoras, del inglés Progenitor Cells
PCNA	Antígeno nuclear de proliferación celular, del inglés Proliferating Cell Nuclear Antigen
PFA	Paraformaldehído
PGRMC	Componente del receptor de progesterona de membrana del inglés Progesterone Receptor Membrane Component
PHTPP	4-[2-fenil-5,7bis (trifluorometil) pirazol [1,5-a]pirimidin-3-il] fenol

RA	Ácido retinoico, del inglés Retinoic Acid
RALDH2	Retinaldehído deshidrogenasa 2
RAR	Receptor de ácido retinoico
PR	Receptor de progesterona, del inglés Progesterone Receptor
SSEA	Antígeno embrionario de etapa específica, del inglés Stage-Specific Embryonic Antigen
SGZ	Zona subgranular, del inglés Subgranular Zone
SHH	Sonic Hedgehog
SMA	Atrofia muscular espinal, del inglés Spinal Muscular Atrophy
SNC	Sistema nervioso central
Sox1	Sex determining region box 1
SVZ	Zona subventricular, del inglés Subventricular Zone
TRA	Antígeno de rechazo tumoral, del inglés Tumor Rejection Antigen
VACHT	Transportador vesicular de acetil-colina, del inglés Vesicular Acetyl Choline Receptor

Resumen

Las células troncales embrionarias (CTE) tienen la capacidad de diferenciarse a derivados de las tres capas germinales. La diferenciación de neuronas motoras (NM) derivadas de CTE involucra la formación de cuerpos embrionarios (EB) con la adición de ácido retinoico y Sonic Hedgehog. En este trabajo analizamos el efecto de la progesterona y el estradiol sobre la diferenciación de NM, puesto que estas hormonas modifican la proliferación y la diferenciación neural de células pluripotentes. Cuando se realizó la diferenciación adicionando 100 nM de progesterona observamos un incremento de NM, el cual fue abatido a niveles por debajo del control al co-incubarse con el antagonista del receptor de progesterona RU 486. La adición de concentraciones nanomolares de estradiol también causó un aumento de NM comparado con el control y este efecto fue revertido con un antagonista general del receptor de estrógenos (ER) ICI 182,780. Adicionalmente, se emplearon antagonistas específicos del ER- α 1,3-Bis (4-hidroxifenil)-4-metil-5-[4-(2-piperidinil etoxi) fenol]-1H-pirazol (MPP) y ER- β 4-[2-fenil-5,7bis (trifluorometil) pirazol [1,5-a]pirimidin-3-il] fenol (PHTPP). La co-incubación de MPP con estradiol produjo una disminución en el número de NM, mientras que PHTPP no tuvo efecto. Lo anterior fue confirmado mediante experimentos de citometría y mediante el análisis de la expresión de marcadores de NM por RT-PCR cuantitativa. La proliferación celular aumentó en EB tratados con progesterona, mientras que la apoptosis no fue modificada con ningún tratamiento. Nuestros resultados indican que el incremento de NM causado por la progesterona y el estradiol es mediado por receptores intracelulares. Además, el efecto inductor del estradiol se debió a la activación del ER- α .

Abstract

Embryonic stem (ES) cells have the capacity to differentiate into endodermal, mesodermal, and ectodermal lineages. Motor neuron (MN) differentiation of mouse ES cells involves embryoid bodies formation with addition of Sonic hedgehog and retinoic acid. In this work, using immunocytochemistry, flow cytometry, and quantitative RT-PCR, we investigated whether progesterone or 17 β -estradiol have inductive effects on ES cell derived MN, as it has been demonstrated that these hormones modify proliferation and neural differentiation of pluripotent cells. When 100 nM progesterone was added during differentiation, we found higher proportions of MN, compared to the control condition; coincubation of progesterone with the progesterone receptor (PR) antagonist RU-486 caused a decrease in the number of MN to a percentage even lower than controls. The addition of nanomolar concentrations of 17 β -estradiol also significantly induced MN differentiation. This effect of estradiol was completely antagonized by addition of the general estrogen receptor (ER) antagonist ICI 182,780. To identify the ER subtype mediating the increase on MN differentiation, we incubated estradiol with the ER- α antagonist MPP or with the ER- β blocker PHTPP. When we co-incubated 17 β -estradiol with MPP, we found a significant decrease in the percentage of MN. In contrast, the co-incubation of 17 β -estradiol with PHTPP had no effect on the induction of MN differentiation. All these effects on cell number were confirmed by significant changes in the expression of the MN markers Islet-1 and Choline acetyl transferase, assessed by real-time RT-PCR. Cell proliferation in embryoid bodies was significantly enhanced by progesterone treatment. No changes in apoptotic cell death were found in differentiating cells after progesterone or 17 β -estradiol addition. Our findings indicate that progesterone and 17 β -estradiol induce a higher proportion of MN derived from mouse ES cells through intracellular PR and ER, respectively. Furthermore, the effect of estradiol was mediated by specific activation of ER- α .

Introducción

Células Troncales Embrionarias

Las células troncales se caracterizan por poseer la capacidad de auto-renovarse y de producir progenie diferenciada. Las células troncales se pueden clasificar por su origen en adultas y embrionarias, ya sea que provengan de tejidos adultos o de tejidos embrionarios. Existe otra clasificación de las células troncales basada en la capacidad de tipos celulares diferenciados que pueden producir. Las células troncales unipotenciales solo pueden generar un tipo celular, las células troncales multipotenciales dan origen a varios tipos celulares de un tejido y por último las células troncales pluripotenciales generan 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. En la década de 1980, las CTE fueron establecidas a partir de embriones de ratón en etapa pre-implantación [1, 2]. Las células troncales de ratón se derivan de la masa celular interna de embriones en la etapa de blastocisto de 3.5 días de desarrollo. Los embriones se sembraron inicialmente en una capa de fibroblastos inactivados en su capacidad mitótica. Después de varios días en cultivo, las células de la masa celular interna forman colonias de células pluripotentes que pueden ser expandidas, disgregadas y resembradas, siempre que se encuentren en condiciones que eviten su diferenciación espontánea (Figura 1) [3]. El papel de estos fibroblastos es el de proveer factores de crecimiento necesarios para la inhibición de la diferenciación. El principal factor que inhibe la diferenciación de las CTE de ratón es el factor inhibitorio de la leucemia (LIF); [4]. El LIF tiene la capacidad de mantener un cultivo de CTE pluripotente, sin necesidad de cultivarse sobre una capa de fibroblastos inactivos [5].

Las CTE expresan marcadores que pueden ser utilizados para identificarlas en estado pluripotente, como la fosfatasa alcalina, los antígenos embrionarios de etapa específico

(SSEA), los factores de transcripción Oct-4, Nanog, Sox2 y una alta actividad de telomerasa. Estos marcadores se regulan de manera negativa durante la diferenciación de éstas células [6, 7].

Debido a que las CTE son pluripotentes, éstas pueden diferenciarse hacia múltiples linajes *in vitro* bajo ciertas condiciones experimentales. Las condiciones que se requieren para inducir la diferenciación de las CTE incluyen la ausencia de LIF y de células nodrizas, o la adición de factores de diferenciación como el ácido retinoico (RA). Cuando las CTE son cultivadas en suspensión sobre una superficie no adhesiva forman cuerpos embrioides (EB), que muestran algunas similitudes con un embrión en desarrollo [8]. Los EB 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 lugar células terminalmente diferenciadas [9].

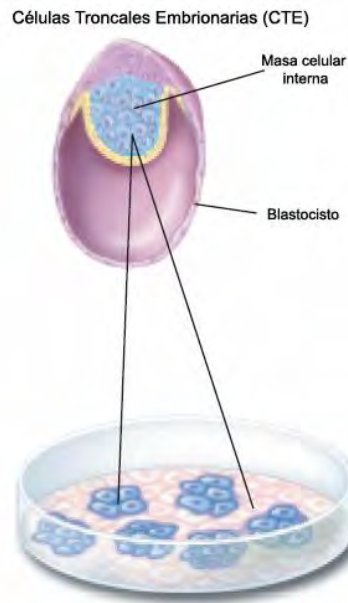


Figura 1. Las CTE se derivan de la masa celular interna del blastocisto y pueden ser expandidas *in vitro*, manteniendo su estado pluripotente (modificada de Terese Winslow 2008).

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

para las terapias de reemplazo celular 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 ha definido completamente [10]. Sin embargo, las neuronas motoras (NM) de la médula espinal representan un subtipo dentro del sistema nervioso central con una ruta de especificación neuronal bien definida [11].

Formación de las NM durante el desarrollo embrionario

El sistema nervioso se origina a partir del ectodermo. La inducción neural especifica la placa neural, la cual después da lugar a una estructura cilíndrica llamada el tubo neural. En mamíferos y aves el tubo neural consiste de una sola capa de células multipotentes, conocidas como la zona ventricular. 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 programas de proliferación y migración antes de adquirir su forma y función finales [12].

La organización anatómica del sistema nervioso central (SNC) es debida a una regionalización del neuroepitelio en etapas tempranas del desarrollo. La placa neural primitiva se encuentra subdividida en regiones que originan distintos progenitores. Las primeras etapas de la diferenciación neural están controladas por moléculas de señalización que son secretadas en distancias variables a través del tejido neural [13]. La señalización a través del eje rostro-caudal del tubo neural establece las principales subdivisiones del sistema nervioso central, el cerebro anterior, medio, posterior y la médula espinal [14]. La señalización dorso-ventral tiene un papel importante en establecer la diversidad de los tipos celulares, dentro de cada subdivisión del sistema nervioso central [15]. Sin embargo, esta diversidad no puede ser explicada solamente por la acción de las señales en estos dos sistemas. En la médula espinal, por ejemplo, parece que existen señales transmitidas

localmente entre las neuronas en desarrollo que se requieren para lograr el repertorio completo de subtipos neuronales [11].

La médula espinal es una estructura caudal, cuya regionalización se establece poco después de la inducción neural, a través de la programación de destinos celulares por una serie de señales extrínsecas. Muchos factores como FGF-4, los retinoides, las proteínas morfogénicas de hueso (BMP), las proteínas Wnt y la actividad caudalizante del mesodermo paraxial, han sido implicados en la adquisición del carácter caudal neural [16, 17]. La diferenciación de las células de la médula espinal requiere la acción de una señal mediada por retinoides que es provista por el mesodermo paraxial [17]. La capacidad para sintetizar retinoides se refleja en la expresión de una enzima clave en la síntesis de retinoides, la retinaldehído deshidrogenasa 2 (RALDH2) [18]. La síntesis de retinoides por el mesodermo paraxial parece ser un evento crítico para el establecimiento temprano de la identidad de las células del cerebro posterior y de la médula espinal [19].

La especificación de los distintos 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), NM e interneuronas en posiciones más dorsales [11].

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 [20]. La principal actividad de señalización proveniente 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* e *in vitro* puede inducir la diferenciación de las células de la placa del piso, NM e interneuronas [21]. Asimismo, la eliminación de la señalización por la notocorda o el bloqueo con anticuerpos *in vitro* reprime la diferenciación de estos tipos celulares ventrales [22, 23]. 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 [24].

Varios estudios han demostrado que un grupo de proteínas homeodominio expresadas por las células progenitoras ventrales actúan como factores intermediarios en la señalización mediada por SHH [23, 24]. Estas proteínas se pueden clasificar con base en su patrón de expresión y en su modo de regulación por SHH. La expresión de las proteínas clase I es reprimida en un umbral de concentraciones de SHH y como consecuencia se forman límites de expresión en la región ventral que generan los dominios de progenitores. De manera inversa, la expresión de las proteínas de la clase II requiere de la señalización de SHH y ésta se logra en un umbral de concentraciones de SHH distintas, por lo tanto sus límites de expresión dorsales pueden delinear a dominios de progenitores. 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 (Figura 2).

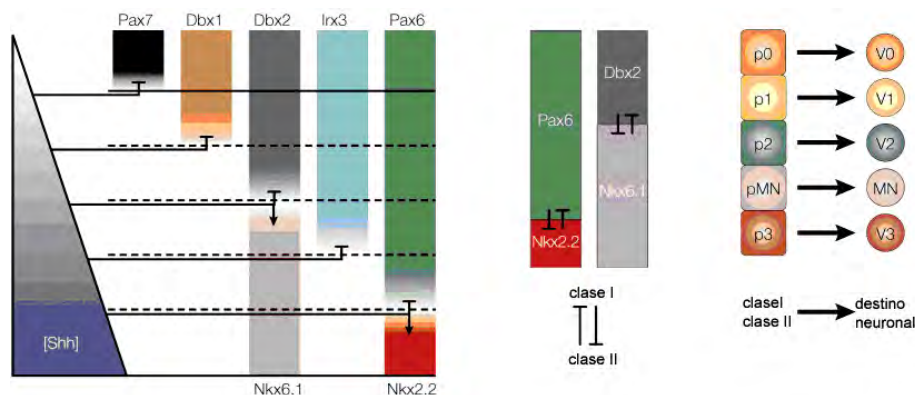


Figura 2. Varias proteínas homeodominio expresadas por las células progenitoras ventrales actúan como factores intermediarios en la señalización mediada por SHH. La expresión de las proteínas clase I es reprimida en un umbral de concentraciones de SHH. La expresión de las proteínas de la clase II requiere de la señalización de SHH en un umbral de concentraciones distintas. Esto establece los diferentes dominios de progenitores en la médula espinal (Modificado de [11]).

Las proteínas homeodominio expresadas por las células progenitoras parecen especificar la identidad de cada una de las clases de neuronas postmitóticas que se derivan de los

dominios de progenitores. 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 [25]. 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 [25, 26]. La acción combinada de tres proteínas homeodominio, Nkx6.1, Nkx2.2 y Irx3, restringen la generación de NM a un solo dominio de progenitores. La expresión del factor de transcripción Islet1 se requiere inicialmente para la generación de todas las NM (Figura 3). 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 [27]. Dentro del dominio de NM, 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 NM funcionando como un determinante de su identidad y una vez que se induce regula de manera positiva su expresión [26].

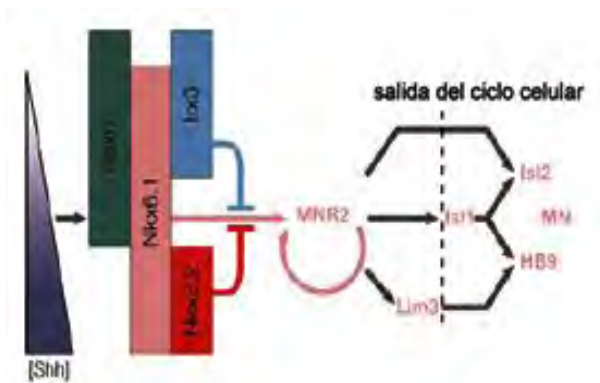


Figura 3. Proteínas homeodominio que funcionan río abajo de SHH. Nkx6.1, Nkx2.2 e Irx3 delimitan el dominio que genera a las NM. Nkx6.1 es suficiente para inducir la expresión de MNR2. A su vez, MNR2 es capaz de regular positivamente a Islet1, Islet2, Lim3 y HB9 (modificado de [11]).

Todas las NM se derivan de un solo dominio de progenitores neuronales [25], pero adquieren varios subtipos e identidades distintas, que se han definido por la posición de sus cuerpos celulares en la médula espinal y en sus patrones de proyección axonal a la periferia

[28, 29]. Las diferentes subclases de NM definidas anatómicamente son distintas también a nivel molecular, especificándose por una expresión restringida de factores de transcripción. Las NM representan un tipo de los cientos de tipos celulares diferentes se generan durante el desarrollo del sistema nervioso de los vertebrados, estableciendo la diversidad que es esencial para la formación de circuitos neuronales. La degeneración de tipos específicos de neuronas trae consigo desórdenes neurológicos [10].

Diferenciación de NM a partir de células pluripotentes

La descripción de los principales procesos y las moléculas que participan en la diferenciación de MN durante el desarrollo embrionario, sirvió como base para generar MN *in vitro* a partir de CTE. El primer trabajo donde fue demostrada la capacidad de las CTE para formar NM fue en un estudio donde se aisló una línea de CTE denominada HBG3, a partir 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 NM, el gen *hb9*. En este estudio, la diferenciación de NM se llevó a cabo mediante la formación de EB, los cuales se trataron con RA y un agonista de SHH (Hh-Ag1.3) o el SHH recombinante para estimular su diferenciación. Los autores encontraron que el tratamiento con RA induce la expresión de marcadores caudales del sistema nervioso central como, *Hoxc6*, *Hoxc7* y *Hoxc8*, mientras que el tratamiento conjunto con SHH induce la expresión de factores transcripción de tipo homeodominio y del tipo hélice asa hélice básica (bHLH), *NKx6.1* y *Olig2* característicos de NM. Las NM diferenciadas bajo estas condiciones presentan los marcadores neuronales β tubulina III y NeuN y los marcadores de NM *Islet1*, *HB9* y *ChAT*. Una vez que las NM fueron caracterizadas *in vitro*, éstas fueron trasplantadas en el tubo neural en desarrollo de embriones de pollo en la etapa 15-17 de Hamilton y Hamburger [30]. De manera interesante, se observó que las NM trasplantadas se integraron y sobrevivieron en la médula espinal de los embriones de pollo y proyectaron axones hacia la musculatura axial y apendicular formando sinapsis [10]. En un trabajo posterior se evaluaron las propiedades funcionales de las NM derivadas de la línea HBG3 y se demostró que las NM generaban potenciales de acción, expresaban receptores para neurotransmisores y extendían axones al ser co-cultivadas con la línea de

células de músculo C2C12 formando uniones neuromusculares *in vitro* [31]. Asimismo, existen estudios donde se ha logrado reproducir el protocolo para generar NM derivadas de CTE. Harper *et al.* [32] demostraron que neuronas NM derivadas de CTE son capaces de extender sus axones *in vivo* cuando se trasplantan en ratas adultas y tienen la capacidad de formar uniones neuromusculares *in vitro* al ser co-cultivadas con mioblastos. La habilidad de las NM derivadas de las 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).

Uno de los ejemplos más destacados donde se demuestra la capacidad de las NM derivadas de CTE de producir una recuperación funcional es el reportado por Deshpande *et al.* [33]. En este trabajo se trasplantaron NM provenientes de la línea HBG3 en ratas paralizadas mediante la infección del virus Sindbis. Utilizando una mezcla de trasplante de NM, y la administración de dibutilil AMP cíclico y Rolipram (para inhibir la repulsión del crecimiento axonal por parte de la glía) junto con el co-trasplante en el nervio ciático de NPC que secretan el factor neurotrófico derivado de la glía (GDNF), se promueve el crecimiento de los axones de las NM hacia la musculatura formándose uniones musculares *in vivo* y generando una recuperación funcional en las ratas paralizadas.

Las NM derivadas de CTE se han trasplantado en modelos animales de enfermedades neurodegenerativas como la ELA. Nosotros hemos trasplantado NM derivadas de CTE en la médula espinal de ratas que sobre-expresan una forma mutada de la superóxido dismutasa humana G93A (hSOD1^{G93A}), un modelo animal que recapitula varios de las características de la ELA en humanos. En ese trabajo se encontró que el trasplante de las NM causa una recuperación en la función motora evaluada mediante la prueba de rotarod. Sin embargo, en las siguientes semanas las ratas hSOD1^{G93A} se deterioran en su función motora y se paralizaron en las etapas finales de la enfermedad. Cuando se analizó la médula espinal de las ratas hSOD1^{G93A} trasplantadas no se encontraron las NM endógenas ni las trasplantadas, sugiriendo que el ambiente de la médula espinal de las ratas transgénicas causó la degeneración de las NM trasplantadas ya que las NM trasplantadas en ratas

silvestres sobreviven más de dos meses sin signos de degeneración [34]. Esto indica que es necesario buscar estrategias complementarias para tratar estas enfermedades degenerativas.

Los protocolos empleados para producir NM a partir de CTE de ratón han sido adaptados para diferenciar NM derivadas de primates y de humanos. Se ha reportado que las CTE de monos *Cynomolgus*, se pueden diferenciar a NM mediante el tratamiento con SHH y el cocultivo sobre células estromales PA6. Bajo estas condiciones experimentales se generan neuronas β tubulina III positivas que co-expresan Islet1. Las CTE de monos también se pueden diferenciar a NM mediante la formación de EB tratados con RA, este método de diferenciación produce neuronas β tubulina III positivas, 50% de las cuales co-expresan Islet1. Adicionalmente, se demostró que las NM derivadas de los monos tienen la capacidad de integrarse después de ser trasplantadas en ratones que fueron lesionados en la corteza motora. Las NM trasplantadas causaron una mejora en la función motora en los ratones 28 días después del trasplante [35]. En un estudio donde se comparó el potencial neurogénico de CTE humanas y de monos *Cynomolgus*, se encontró que ambas líneas celulares son capaces de formar rosetas neurales *in vitro*, las cuales son positivas para los marcadores neurales Nestina y Sox1. Los NPC de ambas líneas, se diferencian a neuronas β tubulina III positivas y una proporción de estas neuronas son ChAT, Islet1 y HB9 positivas cuando son tratadas con RA 1 μ M y SHH 500 ng/ml. Este tratamiento causa un aumento en la expresión de los marcadores de NM hb9, Islet1 y Olig2 en ambas líneas. Las NM motoras terminalmente diferenciadas son electrofisiológicamente funcionales, lo cual fue evaluado por el disparo de potenciales de acción generados por las NM después de la estimulación eléctrica y debido a que las NM tienen la capacidad de formar uniones neuromusculares *in vitro* con la línea de células musculares C2C12 [36]. En otro reporte se exploró la diferenciación de CTE humanas a NM. Las CTE sembradas sobre células estromales MS5 generan rosetas neurales y al ser expuestas a AR 1 μ M y SHH 500 ng/ml se induce su diferenciación a NM diferenciadas que expresan los marcadores Islet1, HB9 y ChAT. Cuando las NM son trasplantadas en la médula espinal de ratas adultas se integran y sobreviven durante seis semanas manteniendo su fenotipo neuronal [37]. Los resultados anteriores indican que las CTE de primates y humanos son funcionales y producen recuperación cuando son trasplantadas en modelos animales de daño neuronal.

Aunque las NM generadas a partir de CTE humanas pueden ser útiles en la terapia de reemplazo celular, su uso es controversial debido a que para derivar estas células se requiere de la manipulación y extracción de células de embriones humanos. Por lo cual, en años recientes se ha explorado la posibilidad de reprogramar células somáticas a un estado pluripotente. Recientemente se ha demostrado que la introducción de cuatro factores de transcripción (Oct4, c-Myc, Sox2 y Klf4) son suficientes para reprogramar células somáticas de ratón [38] y de humano [39] para producir células troncales pluripotentes inducibles (iPSC), por sus siglas en inglés, La derivación de estas líneas de iPSC es relevante debido a que estas células se pueden generar derivados de las tres capas germinales al igual que las CTE. Además, poseen la ventaja de que se pueden generar iPSC específicas de cada paciente.

El primer reporte de la diferenciación de NM a partir de iPSC se realizó mediante el aislamiento de fibroblastos de pacientes con esclerosis lateral amiotrófica. La reprogramación se logró a partir de la transfección de los factores Klf4, Sox2, Oct4 y cMyc y se lograron generar colonias pluripotentes que expresaban los antígenos asociados a CTE SSEA3, SSEA4, TRA 1-81, TRA1-60, así como una alta actividad de fosfatasa alcalina. Las colonias de iPSC se pueden diferenciar hacia derivados de las tres capas germinales. La diferenciación de las iPSC hacia NM se llevó a cabo mediante la formación de EB que fueron tratados con RA y un agonista de SHH. Después de la diferenciación, una gran proporción de células expresaba el marcador neuronal β tubulina III y algunas de estas células expresaban HB9, Islet1 y ChAT [40]. Adicionalmente, se han generado iPSC a partir de células somáticas de pacientes con atrofia muscular espinal (SMA), por sus siglas en inglés, estas células fueron reprogramadas con el uso de construcciones lentivirales que codifican para los factores de transcripción Oct4, Nanog, Sox2 y Lin28. Las colonias de iPSC generadas en estas condiciones se pueden propagar *in vitro*, forman teratomas y tienen un cariotipo normal. Cuando estas células son sometidas a un protocolo de diferenciación en el cual se adiciona RA y SHH se producen neuronas β tubulina III positivas que expresan los factores HoxB4, Islet1 y Olig2, lo cual sugiere que se pueden generar NM a partir de iPSC humanas. Sin embargo, al cultivar estas neuronas por tiempos prolongados, se observa una disminución en el número de NM y una disminución en su

tamaño, lo que puede ser un signo de degeneración [41]. Se ha demostrado que las NM derivadas de iPSC y CTE humanas presentan propiedades electrofisiológicas similares, generando potenciales de acción en respuesta a la inyección de corriente cuando son diferenciadas mediante la formación de EB tratados con RA y el agonista de SHH purmorfamina. [42]

Aunque los avances en el campo de la diferenciación de NM a partir de células pluripotentes es prometedor y en el largo plazo se podrían generar terapias de reemplazo celular en enfermedades degenerativas, aún es necesario encontrar condiciones en las que la diferenciación del tipo celular deseado sea más eficiente, aumentando la proporción de células en los protocolos de diferenciación y por esta razón existe una búsqueda de compuestos que puedan generar una mayor cantidad del tipo neuronal de interés.

Hormonas esteroides

Las hormonas esteroides participan en la regulación de varias funciones biológicas además de las que desempeñan durante la reproducción como son la proliferación celular, la apoptosis, la homeostasis celular, la inflamación, el metabolismo, la diferenciación y el desarrollo embrionario [43]. En el caso del sistema nervioso, estas hormonas participan en procesos como la neuroprotección, la proliferación de precursores neurales y la diferenciación neuronal.

Las hormonas esteroides pueden ser sintetizadas en las gónadas, la placenta, las glándulas adrenales y el cerebro. El precursor de estas hormonas es el colesterol, que por una serie de reacciones enzimáticas catalizadas por proteínas de la familia de P450 mitocondriales y otras proteínas, dirigen la síntesis de distintos esteroides en una célula en particular. La determinación del tipo de esteroide que se sintetiza en cada célula depende del nivel de expresión de cada enzima y la competencia de éstas por los distintos sustratos. El primer paso limitante en la síntesis de hormonas esteroides es la conversión del colesterol a pregnenolona. Una vez que ésta se ha sintetizado puede ser convertida a los distintos tipos de hormonas esteroides por enzimas específicas. Primero, la pregnenolona se puede

convertir en progesterona por medio de la enzima 3β hidroxio-esteroide deshidrogenasa (3β HSD) o puede ser hidroxilada produciendo 17-hidroxipregnenolona y ser convertida a dehidroepiandrosterona vía enzimas P450 mitocondriales, la cual es convertida a andrógenos por la enzima 17β HSD para formar androstenediol y después testosterona vía 3β HSD. La enzima P450 aromatasa convierte testosterona a estradiol, mientras que la 5α reductasa convierte la testosterona a di-hidro testosterona. Asimismo, la progesterona puede ser metabolizada a glucocorticoides o mineralocorticoides por diferentes enzimas.

Además de los sitios clásicos donde se había reportado que ocurría la síntesis de esteroides, en la década de 1980, Baulieu y sus colaboradores reportaron por primera vez que las neuronas tienen la capacidad de sintetizar esteroides [44-46]. Basándose en experimentos donde se medía el contenido de dehidroepiandrosterona (DHE) en el SNC, se descubrió que estos niveles eran mayores a los encontrados en el suero y que estos niveles se mantenían después de que la eliminación de las glándulas adrenales, demostrando que la DHEA es sintetizada en el SNC. Este tipo de esteroides que son sintetizados en el cerebro fueron denominados neuroesteroides para diferenciarlos de los esteroides que se sintetizan en los órganos de la periferia. Los esteroides más importantes que cumplen con ese criterio incluyen DHEA, pregnenolona y sus derivados sulfatados, DHEA sulfato y pregnenolona sulfato, progesterona, deoxicortisona, 3α , 5α , tetrahidroprogesterona y alopregnanolona. Los neuroesteroides pueden ser sintetizados por neuronas y células gliales y ejercen varios efectos durante el desarrollo embrionario y la etapa adulta [47]. Estos efectos han sido estudiados en varias especies incluyendo los humanos. Los neuroesteroides pueden influenciar procesos como el sueño, la respuesta al estrés y la memoria.

Dentro de las hormonas esteroides, la progesterona y el estradiol son dos hormonas de las cuales se han reportado varios efectos en el SNC como la proliferación de precursores neurales, la neuroprotección y la diferenciación neuronal. De manera general, se conoce que la progesterona ejerce varios efectos que incluyen la diferenciación del endometrio, el control de la implantación, la maduración del epitelio mamario y la modulación de la hormona liberadora de gonadotropina. Por otro lado, el 17β -estradiol que es secretado en el flujo sanguíneo por las glándulas adrenales y las gónadas, juega un papel importante

mediando el desarrollo y comportamiento sexual, las funciones reproductivas, la proliferación y diferenciación de varios tejidos. Por ejemplo, el 17 β -estradiol es responsable de la proliferación del tejido uterino y mamario [48].

Los mecanismos por los cuales las hormonas esteroides y sus derivados ejercen sus efectos incluyen los mecanismos genómicos mediados por receptores nucleares y que son dependientes de la transcripción de genes y los mecanismos no genómicos o rápidos que involucran la generación de segundos mensajeros intracelulares y varias cascadas de señalización, como el flujo iónico (como el calcio), la modulación del AMP cíclico y las vías de señalización de proteínas cinasas.

Receptores de hormonas esteroides

Los receptores de progesterona y estrógenos son miembros de la superfamilia de receptores nucleares, que muy probablemente se originaron de un ancestro común. Esta superfamilia se compone de 18 miembros que son divididos en dos clases. La clase I incluye a los receptores de hormonas esteroides: receptor de estrógenos (ER) α y β , los receptores de progesterona (PR) A y B, receptor de glucocorticoides (GR), receptor de mineralocorticoides (MR) y el receptor de andrógenos (AR). La clase II incluye los receptores de RA α , β , y γ , receptor X de retinoides α , β , y γ , receptor de vitamina D, receptor de peroxisoma activado por proliferación α , β , y γ y el receptor de tiroideas α y β . Todos los miembros de la superfamilia de los receptores nucleares son factores de crecimiento inducibles, que se vuelven activos al unirse a sus ligandos [48].

Los receptores de hormonas esteroides, que como ya se mencionó, pertenecen a la superfamilia de receptores nucleares, son proteínas modulares que consisten de una región carboxilo terminal que es el dominio de unión a ligando, un dominio central de unión al DNA altamente conservado y un dominio amino terminal. Dentro de estos dominios existen por lo menos dos funciones de activación (AF). AF-1 que se encuentra en el dominio amino terminal funciona independientemente de ligando. El dominio AF2 que se encuentra en el extremo carboxilo es el dominio de unión a ligando, este dominio también participa en la

interacción con péptidos conocidos como co-reperesores o co-activadores. El dominio de unión a ligando y el de unión al DNA son regiones altamente conservadas, el dominio C de los receptores nucleares, que contiene el dominio de unión al DNA es altamente homólogo entre los miembros de la familia. El dominio contiene dos motivos de dedos de zinc, que no solo son responsables de la unión al DNA, ya que también participan en la dimerización de los receptores, permitiendo la formación de homodímeros y heterodímeros. Adicionalmente, el dominio contiene dos alfa hélices, una de las cuales interacciona con el surco mayor del DNA, mientras que la segunda estabiliza el complejo [49] (Figura 4).

El dominio D también conocido región de bisagra y contiene un residuo de serina (S305) que puede ser fosforilado en el ER, sin embargo, la función exacta de la región de bisagra en el receptor de progesterona no se conoce. Los receptores de hormonas esteroides comparten una gran homología a nivel de su secuencia, además conservan la estructura tridimensional y los dominios proteicos, particularmente los relacionados a la unión a ligando, la unión al DNA, a la dimerización y a la activación transcripcional [50].

El dominio amino terminal es variable con respecto al tamaño y la estructura primaria pero es importante para la actividad transcripcional. Adicionalmente, la región amino terminal contiene motivos serina/treonina que pueden regulados por varias proteínas cinasas. La función fisiológica de la fosforilación no se conoce pero podría estar involucrada en la interacción entre distintas vías de comunicación, la modulación de AF-1 y la interacción con proteínas co-activadoras [43].

Receptores de estrógenos

Se han descrito dos tipos de receptores de estrógenos en mamíferos, el receptor α y el receptor β , los cuales son codificados a partir de dos genes distintos. En condiciones normales ambos receptores son intracelulares, pero difieren en la homología de sus dominios, sus constantes de afinidad y su especificidad de ligandos. Su expresión y distribución varía de manera espacio-temporal. El ER- α cuenta con 8 exones codificantes, a partir de los cuales se pueden generar más de cinco transcritos del ER- α , los cuales, se han

encontrado en humanos debido al uso alternativo de exones, exones duplicados e intrones exónicos [51].

El ER- α humano fue aislado por primera vez en 1962, su gen fue clonado en el mismo año [52] y fue localizado en el brazo largo del cromosoma 6 [53]. Tres décadas después, en 1993 fue reportado el primer knockout del ER- α y se demostró que el desarrollo puede llevarse a cabo sin el ER- α [54]. Hasta ese momento, se sabía que el ER- α era el único que mediaba las respuestas del estradiol, pero en 1996 el ER- β fue clonado [55] y localizado en el cromosoma 14 [56]. Además del knockout del ER- α , el knockout ER- β y los ratones knockouts dobles de ER α/β mostraron principalmente afectaciones en las funciones reproductivas [57].

El estradiol se une con gran afinidad al ER, mientras que los productos de su metabolismo, como la estrona y el estriol, se unen con menor afinidad. La acción de los estrógenos puede ser influenciada farmacológicamente por anti-estrógenos o por moduladores selectivos de los ER. Los dímeros ER α y β se unen al DNA con una afinidad comparable como homo o heterodímeros a los mismos elementos de respuesta a estrógenos y regulan un grupo similar de genes [58].

Con relación a la estructura del ER, se conoce que el dominio A/B del receptor de estrógenos también conocido como AF-1 presenta distintas variantes de splicing alternativo que pueden modular la actividad transcripcional inhibiendo la transactivación cuando se lleva a cabo la heterodimerización de los receptores con formas completas del ER. De manera interesante, la AF-1 del ER- β contiene un dominio represor que disminuye la actividad transcripcional total del ER enmascarando la activación del dominio amino terminal y solo funciona en el contexto de un represor [59].

En la región carboxilo terminal se encuentra el dominio E, que es el dominio de unión a ligando y un sitio de interacción con los péptidos co-represores o co-activadores. El dominio carboxilo terminal F representa los últimos 45 aminoácidos en el ER- α y aproximadamente los últimos 30 aminoácidos del ER- β y probablemente funciona para

reprimir la dimerización de los receptores, por lo tanto, previene una inadecuada activación del ligando [60, 61]. El sitio de unión a ligando del ER se puede unir a una gran variedad de compuestos como los estrógenos, hidrocarburos aromáticos policíclicos, pesticidas y una clase de sustancias parecidas a los estrógenos conocidas como xeno-estrógenos [62]. Los sitios de unión al ligando y los de interacción con los péptidos co-activadores y represores están formados por 12 alfa hélices.

Receptores de Progesterona

Cómo la mayoría de esteroides, la progesterona ejerce su acción a través de la unión y la activación de receptores nucleares definidos como factores de transcripción activados por ligando. En ausencia de la hormona los receptores se encuentran asociados con varias proteínas chaperonas como la proteína de choque térmico (HSP) 90, Hsp 70 y Hsp 40 entre otras. La interacción con proteínas chaperonas es esencial para la unión de la hormona al receptor y como un vínculo con los sistemas de transporte celulares. Una vez que la progesterona se une al receptor ocurre un cambio de conformación que permite la disociación de las chaperonas y dimerización de estos, los cuales posteriormente interaccionan con elementos de respuesta a progesterona (ERP) específicos en los promotores de los genes blanco. Cuando los receptores se unen a los ERP ocurre una interacción con la maquinaria de transcripción debido a la unión con los co-activadores de receptores a esteroides. Los co-activadores se unen al RP a través de un motivo alfa hélice LXXLL conservado. El receptor de progesterona fue descubierto en 1970 y fue localizado en el brazo largo del cromosoma 11 del pollo [63]. Los ratones deficientes para el PR muestran anomalías reproductivas pleiotrópicas que incluyen la incapacidad de ovular, displasia uterina e inflamación, desarrollo deficiente de la glándula mamaria, anomalías en la función del timo y el comportamiento sexual [64].

Se ha reportado la existencia de dos isoformas del receptor de progesterona, la isoforma A y B. Ambas isoformas se expresan en cantidades aproximadamente equimolares en aves y humanos mientras que la isoforma A es la predominante en el ratón [65]. En aves, ambas proteínas son sintetizadas por traducción alternativa de un único RNA mensajero. La

isoforma A se encuentra truncada en su región amino-terminal y la isoforma B está completa. Ambas formas del receptor están codificadas por el mismo gen (que contiene 8 exones) con un inicio de la traducción situada en distintos codones. En humanos y ratón las isoformas se generan a partir de dos RNA mensajeros distintos que se sintetizan por transcripción alternativa a partir de dos promotores [66-68].

Como otros receptores de esteroides, el PR está compuesto de una región amino terminal variable (codificada por el exón 1), un dominio conservado de unión al DNA (codificada por los exones 2 y 3), una región variable tipo bisagra (codificada por el exón 4) y una región conservada de unión a ligando (codificada por los exones 4 al 8). Los 164 aminoácidos sobrantes de la isoforma B constituyen una función de activación adicional conocida como AF-3 (que no contiene la isoforma A).

Existe evidencia de que la isoforma A del PR puede actuar como un inhibidor transcripcional dominante del PR-B e inclusive puede inhibir a miembros de la superfamilia de receptores nucleares entre los que se incluyen el ER, AR, MR y el GR. Por otro lado, la región amino terminal que comprende los últimos 165 aminoácidos de la AF-1 de PR-B, también conocido como el segmento B río arriba (BUS), por sus siglas en inglés, (B-upstream segment), tiene una función de activación [69]. Adicionalmente, el dominio BUS puede suprimir el dominio inhibidor de PR-B y puede hacer que los antagonistas del PR sean inefectivos [70]. Este dominio puede influenciar la acción de los receptores en los antagonistas del receptor ejerciendo un efecto en PR-A y su dominio inhibidor.

La estructura del dominio de unión del PR fue descrito por primera vez en 1998 [71]. A diferencia del ER, el dominio AF2 del PR tiene 10 alfa hélices, donde la hélice 2 se encuentra ausente, mientras que la hélice 10 y 11 se encuentran condensadas en una unidad continua llamada H12 debido a su homología con la H12 del ER. Hasta la fecha el AF-2 del PR no se ha logrado cristalizar junto con un co-activador, por esta razón, es difícil describir de manera exacta a naturaleza de la interacción. Pero, la homología de la H12 del ER y el PR sugiere que la H12 de PR también participa en el proceso de unión a los co-activadores [72].

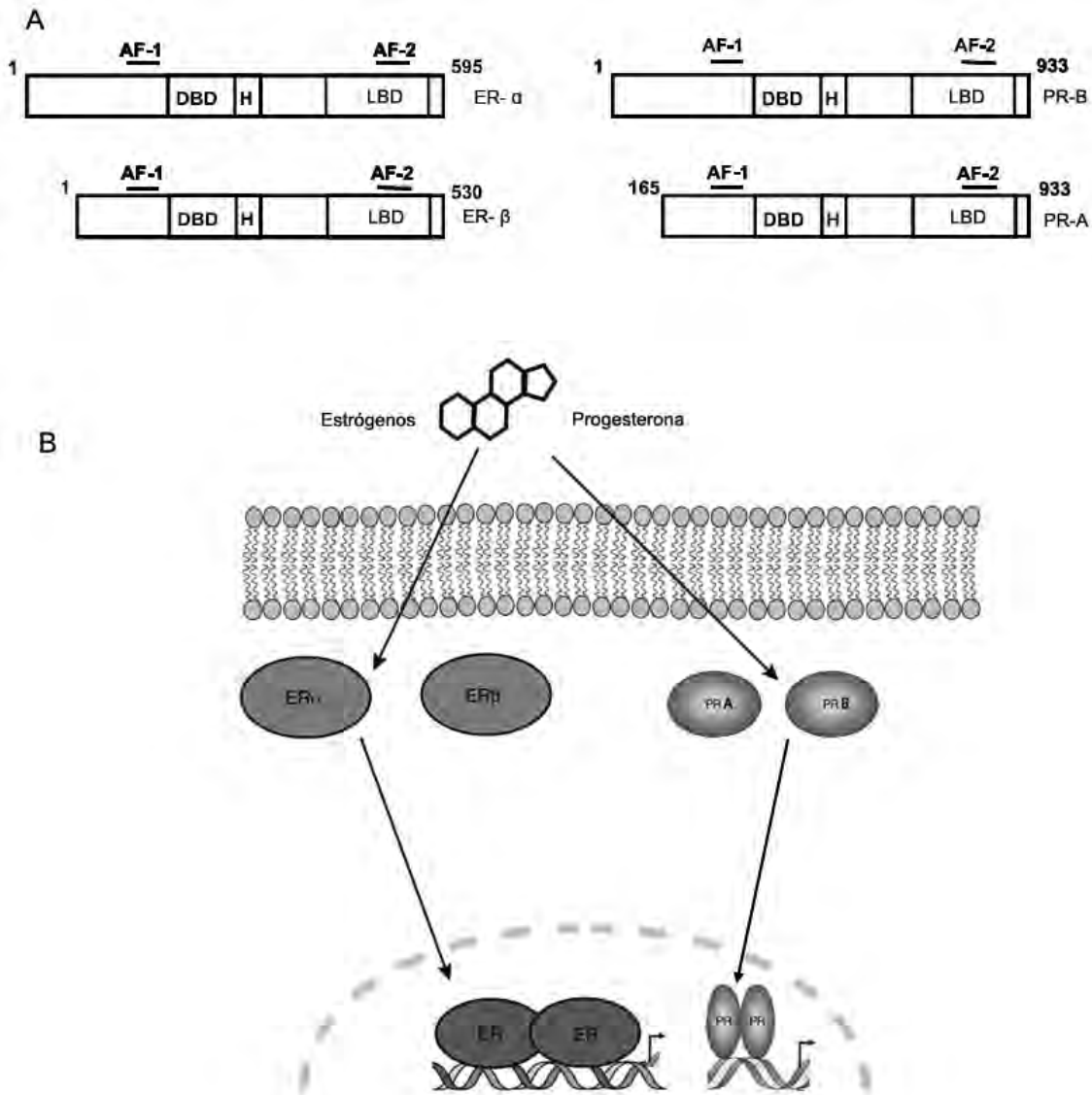


Figura 3. Estructura y modo de acción de los receptores nucleares de progesterona y estrógenos. La estructura general de los receptores de estrógenos (ER) y de progesterona (PR), consiste de un dominio de unión a ligando (LBD), en la región carboxilo terminal, que contiene la función de activación (AF) 2, un dominio de unión al DNA (DBD), una región de bisagra (H) y una región amino terminal que contiene la AF1. (A) Se muestra la estructura de los ER α y β , que son generados a partir de dos genes independientes y de los PR A y B que son codificados por el mismo gen pero con un inicio de la transcripción distinto, por lo cual, el PR A carece de los primeros 164 aminoácidos (B). Las hormonas esteroideas progesterona y 17 β -estradiol pueden ejercer sus efectos por mecanismos genómicos mediados por receptores nucleares que al unirse a su ligando adquieren la capacidad de modular la transcripción de genes. Modificado de [73] y [74].

Efectos no genómicos mediados por hormonas esteroides

Existen algunas respuestas de los esteroides que no ajustan al modelo genómico de acción, ya que ocurren de manera rápida. Por ejemplo, la reacción acrosomal en los espermatozoides es inducida por la progesterona y se lleva a cabo segundos después de que el espermatozoide entra en contacto con esta hormona esteroide. Aunque a veces es difícil distinguir entre los efectos genómicos y los efectos rápidos de los esteroides debido a que existe controversia acerca de los receptores que están mediando los fenómenos no genómicos. En la actualidad se han descrito múltiples acciones extra nucleares generadas por estrógenos. Estos efectos han sido observados en varios tejidos y líneas celulares. A nivel de sistema nervioso central, se ha demostrado que los estrógenos limitan el daño neuronal y la muerte, posiblemente por una señalización mediante PI3K, PKC, ERK o la cinasa de la glucógeno sintetasa 3- β (GSK3- β). Los modelos utilizados incluyen daño por accidente cerebrovascular, administración de glutamato, o por 1-metil-4-fenil-1, 2, 3, 6-tetrahidropiridina (MPTP), toxina empleada para generar un modelo animal de la enfermedad de Parkinson.

El primer reporte de efectos no genómicos inducidos por los estrógenos fue llevado a cabo en ratas ovariectomizadas en las cuales la administración de estradiol producía un aumento en los niveles de AMPc en el útero [75]. Años más tarde, se describieron sitios específicos de unión a estrógenos en la membrana celular [76]. Se demostró que los receptores aislados de membrana eran idénticos a los clásicos ER- α y ER- β ya que eran detectados por los mismos anticuerpos mediante técnicas de identificación inmunológicas [77-79]. La mayor parte de los trabajos relacionados con el ER en membrana identifican una proteína de 66 kDa [80, 81]. Esta proteína de 66 kDa se ha identificado en zonas de caveolas lipídicas. Estas caveolas son regiones de lípidos que contienen proteínas de señalización como las cinasas ERK1/2, Src, Ras, receptores acoplados a proteínas G y los receptores para EGF e IGF [82].

Además de los receptores clásicos, se ha demostrado la existencia de otros receptores para estrógenos en la membrana celular, conocidos como receptores relacionados a los ER, de

los cuales se han identificado tres isoformas ERR α , β y γ . Estos receptores tienen una alta homología con los ER en su región de unión al ligando. Asimismo, se demostró que estos receptores se expresan en distintos tejidos como el cerebro, el riñón, el corazón, el intestino y el músculo esquelético [83]. Finalmente se ha reportado otro ER en la membrana designado GPR30, este receptor se encuentra acoplado a proteínas G [84]. Se ha visto que este receptor puede responder a estrógenos en la membrana plasmática [85].

Una de las primeras evidencias de efectos no genómicos mediados por la progesterona, fue que su administración en altas dosis produce anestesia en ratas [86]. Otra evidencia importante es que en células de la granulosa, que no expresan el PR, la progesterona inhibe la apoptosis de manera esteroide-específica y dosis dependiente. Este fenómeno se da por la unión de la progesterona un receptor, de 60 kDa, localizado en la membrana plasmática. Este receptor es capaz de unir progesterona con baja afinidad pero es incapaz de unir progestágenos sintéticos y antagonistas de progesterona [87]. Adicionalmente, se han descrito proteínas de 54 y 57 kDa que son capaces de unir progesterona en la membrana de espermatozoides, que pueden ser detectadas mediante un anticuerpo contra el PR clásico [88]. Asimismo, en modelos de carcinoma mamario murino se ha logrado detectar la presencia en membrana plasmática de ambas isoformas del PR clásico de ratón, PR-A (83 kDa) y PR-B (115 kDa), mediante técnicas de western blot y de microscopía confocal [89, 90]. Adicionalmente, se ha descrito en la fracción microsomal de hígado de rata una proteína de membrana, denominada componente 1 del receptor de progesterona de membrana (PGRMC1), con un peso molecular de entre 26 y 28 kDa, también denominada 25-Dx [91, 92]. Esta proteína, presenta un dominio transmembrana amino terminal y un dominio citoplasmático de unión al ligando, de manera interesante, se ha encontrado que PGRMC1 se expresa en las membranas de las neuronas de la médula espinal. Otro tipo de PR membranar es una proteína de siete pasos transmembranales que se encuentra acoplado a una proteína G [93].

Los mecanismos de señalización no clásica desencadenados por hormonas esteroides presenta un amplio espectro de efectos observados, y a su vez las respuestas pueden ser completamente antagónicas dependiendo del tipo celular en el cual ocurren, destacándose

distintas vías rápidas de señalización, como la regulación de la activación de proteínas cinasas, la modulación de los niveles intracelulares de Ca^{2+} , inosítoles fosfato y AMP cíclico, que pueden ser inducidas por varias hormonas esteroides generando una gran variedad de respuestas biológicas.

Expresión de ER y PR *in vivo*

Los receptores de estradiol y progesterona se expresan en varias etapas del desarrollo y en la edad adulta en distintas regiones del SNC. En las primeras etapas del desarrollo del embrión de ratón y mediante experimentos de RT-PCR se logró determinar que el ER se expresa en niveles altos en el ovocito, que aún no ha sido fertilizado. Sin embargo esos niveles disminuyen en el embrión de 2 días y llegan a ser casi indetectables en el embrión de ocho células, pero los niveles de expresión se recuperan en el blastocisto. Por otro lado, se observó que el PR se expresa solamente en la etapa de blastocisto [94]. En otro reporte se describe que los transcritos del ER se expresan solo en el ovocito y que no hay expresión en el embrión de este receptor hasta el día 8 y 10 de desarrollo en el ratón [95]. Los ER α y β se expresan en las NSC del cerebro medio, existe evidencia que el ER α se expresa preferencialmente en el ratón y que el tipo β se expresa más en humano [96]. El ER se expresa en precursores neuronales del cerebro en desarrollo y en las NSC adultas de la SVZ y la SGZ del hipocampo se expresan ambos tipos del ER [97-99]. Adicionalmente, se ha detectado mediante inmunocitoquímica que las NM de la médula espinal extraídas de rata de 15 días de desarrollo expresan la enzima aromatasa, los ER y los PR [100]. Asimismo, la enzima P450c17, que participa en la síntesis de hormonas esteroides, se ha detectado tanto en neuronas como en astrocitos de la médula espinal de ratas adultas mediante inmunohistoquímica y RT-PCR [101]. En el caso de los PR, se ha reportado que se expresan de manera amplia en el SNC, sin restricción hacia los distintos tipos celulares. Sin embargo, su expresión puede variar dependiendo de la región del cerebro, el tipo celular o el estatus hormonal. Ambas isoformas del PR se expresan en varias regiones del SNC como el hipocampo, la corteza, el tallo cerebral, el bulbo olfatorio, el hipotálamo, el cerebelo y médula espinal.

Dentro de los efectos que ejercen las hormonas esteroideas se encuentran algunos que son de especial interés ya que tienen influencia sobre las neuronas como lo son la neuroprotección, la proliferación neuronal y la diferenciación.

Efectos neuroprotectores del estradiol y la progesterona

En estudios *in vitro* se ha demostrado que los estrógenos protegen a las neuronas contra el daño producido por el glutamato, la privación de glucosa y los efectos tóxicos del péptido β amiloide [102, 103]. Otros estudios sugieren que los estrógenos pueden suprimir la activación de la microglía, mediando la neuroprotección de manera indirecta al disminuir la inflamación en el cerebro [104]. Se ha demostrado que el estradiol protege contra la muerte apoptótica después de la privación de glucosa y oxígeno en cultivos primarios de oligodendrocitos de manera dosis-dependiente [105]. Se ha establecido que los estrógenos también pueden tener un efecto protector al incrementar los niveles de Bcl-2 en neuronas derivadas de la línea NT2 [106] y en neuronas corticales [103], cuando las neuronas son expuestas a peróxido de hidrogeno o glutamato. En un modelo *in vivo* de isquemia en ratas, los transcritos de Bcl-2 y la proteína se incrementan con el tratamiento de 17 β -estradiol. Estos resultados indican que el estradiol previene el daño por isquemia, al menos en parte, regulando a Bcl-2.

La isquemia cerebral y la reperfusión son los responsables de la generación de estrés oxidante debido a que generan especies reactivas de oxígeno. Las neuronas son particularmente sensibles al daño oxidante debido a su alta demanda energética. El daño a la mitocondria causa alteraciones en la producción de ATP y genera especies reactivas de oxígeno que compromete las defensas antioxidantes de las células y produce apoptosis y necrosis. Existe evidencia de que los estrógenos pueden suprimir la generación de especies reactivas de oxígeno en el cerebro de ratas hembra y macho. Se han encontrado efectos similares en la línea PC-12 indicando que los estrógenos inhiben la generación de superóxido en la mitocondria [107]. Además, se ha encontrado que el estradiol tiene la capacidad de estabilizar los niveles de ATP reduciendo los niveles de estrés oxidante lo cual aumenta la sobrevivencia celular [108]. Adicionalmente, se ha demostrado que los

estrógenos tienen la capacidad de modular la actividad de enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa, la catalasa y los niveles de glutatión [109].

En ratas ovariectomizadas en las cuales se indujo quirúrgicamente una oclusión de la arteria media cerebral, se observa una disminución en el número de células BrdU positivas en la SVZ. El tratamiento con estradiol recupera e incluso aumenta el número de células BrdU positivas en la parte dorsal de la SVZ cuatro días después de la oclusión. La mayoría de las células positivas a BrdU fueron neuroblastos o neuronas inmaduras. De manera interesante, estos efectos no se observaron en los animales knockout para el ER α y β , sugiriendo, que estos receptores son esenciales para recuperar la proliferación de estas células. Sin embargo se propone un mecanismo indirecto de acción debido a que los autores no pudieron detectar los ER en la SVZ por inmunocitoquímica [110].

Existe una gran cantidad de reportes sobre el efecto protector de la progesterona en modelos animales de isquemia cerebral. Aunque la mayoría de los estudios se ha enfocado en la animales macho, los efectos neuroprotectores de progesterona en modelos de oclusión de la arteria media del cerebro se han observado tanto en animales hembras como macho. En estos modelos, el tiempo en el que se induce el daño es de entre 1 y 2 horas y la mejoría debido al tratamiento de progesterona se observa a las 7 horas después de la isquemia, reflejándose en una mejora cognitiva después de 21 horas. El nivel de protección debido a la progesterona varía de entre un 20 y un 50% en la reducción del área infartada dependiendo del tiempo en que se produce la isquemia y de la dosis de progesterona que se administra, la dosis de 8 mg/kg de progesterona reduce el daño al hipocampo después de 21 días [111]. Además, la progesterona previene la muerte neuronal en el núcleo caudado [112] y en el hipocampo [113].

En estudios *in vitro*, se ha demostrado, que la progesterona puede reducir los niveles de malonaldehído, que es un marcador de estrés de oxidante. Por otro lado, la progesterona previene la disminución de los niveles de glutatión causados en un modelo de isquemia cerebral global [114]. De manera similar, la expresión de enzimas antioxidantes como la

superóxido dismutasa, la glutatión peroxidasa y catalasa se han detectado después de la administración de progesterona en un modelo de oclusión de la arteria carótida [115].

Se ha demostrado que la progesterona puede proteger a las neuronas de la toxicidad debida al glutamato y que esto está relacionado con un aumento en los niveles de transcritos y la proteína del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) en neuronas corticales empleando un sistema de cultivo organotípico. La activación de las MAPK y la PI3K se encuentra asociada a este efecto ya que se requiere de su activación para que la progesterona pueda mediar la neuroprotección [116, 117].

La administración de progesterona 16 mg/kg y alopregnanolona 4, 8 y 16 mg/kg durante 5 días previenen la muerte neuronal por apoptosis en un modelo de trauma por contusión en la corteza prefrontal de ratas macho adultas. Estos tratamientos, inhiben la activación glial en el sitio de la lesión reduciendo la inflamación debida a los astrocitos proinflamatorios. Adicionalmente, se demostró que la progesterona inhibe a las proteínas pro-apoptóticas Bax y caspasa 3, así como la fragmentación del DNA. Finalmente, se observó que las ratas mejoraron en las pruebas de aprendizaje espacial con el tratamiento de progesterona [118]. La progesterona modula la expresión de BDNF en NM en degeneración lo cual podría representar un efecto neuroprotector [119].

La progesterona tiene un papel importante en la formación y la reparación de las vainas de mielina [46, 120, 121]. Los efectos de los progesterona sobre la promoción de la mielinización es mediada por un incremento en la transcripción de genes que codifican para la síntesis de proteínas de la mielina. De hecho, la progesterona incrementa el número de oligodendrocitos que expresan la proteína básica de la mielina y la diesterasa de nucleótidos cíclicos (CNPasa) en cultivos gliales preparados de ratas neonatales. Se ha demostrado que la progesterona promueve la mielinización de neuronas del cerebelo induciendo la proliferación y diferenciación de oligodendrocitos mielinizantes [122]. El significado fisiológico de la síntesis y el metabolismo de la progesterona por los oligodendrocitos sugiere que estos esteroides gobiernan varios aspectos de la síntesis de mielina [123].

Efecto de la progesterona y el estradiol sobre las CTE

Se ha descrito que los ER y los PR se expresan en CTE de ratón y de humano, que su expresión es dinámica durante la diferenciación de estas células y que inclusive pueden participar en la diferenciación hacia distintos linajes celulares, incluidos los neurales. En un estudio donde se exploró la expresión de varios miembros de la familia de receptores nucleares (PR, ER α y β , RAR α y β 2, GR y las proteínas asociadas al ER α , β y γ) en CTE de ratón se observó que la expresión de PR se incrementa hasta cuatro veces en cuanto las CTE comienzan a diferenciarse, ya sea porque se les deja de administrar LIF, o mediante el tratamiento con RA. De manera interesante, se encontró que su expresión precede a la expresión de ER- α , contrario a lo que ocurre en la mayoría de los tejidos adultos. Sin embargo, algunos receptores como el ER- β , RAR α , GR y las proteínas asociadas al ER- α , β y γ no presentaron cambios durante la diferenciación de las CTE. Por otro lado, el ER- α y el RAR β 2 no fueron detectados después de que el LIF se retiró de las CTE. Mediante análisis de binding se estimó que hay unas 5700 ± 900 moléculas de PR por célula diferenciada después de 4 días. Cuando se llevó a cabo la diferenciación de las CTE mediante la formación de EB que fueron tratados con RA se detectó la expresión del PR después de 8 a 12 horas, lo cual coincidió con la expresión de los genes de formación de patrones *Hoxb1* y *Hoxa5* mientras que la proteína Nestina fue detectada 24 horas después del tratamiento con RA. Los EB de 8 días de diferenciación expresan de manera abundante de las dos isoformas del PR mientras que en las CTE solo se expresa una pequeña cantidad de PR-B. En cuanto a la expresión de ER se encontró que en CTE indiferenciadas el ER β es expresado constitutivamente a niveles bajos, el ER- α no se expresa en CTE indiferenciadas y solo se expresa en EB de 7 y 8 días. La transfección transitoria del ER α ni los estrógenos y antiestrógenos afectó la expresión de PR en las CTE. En la mayoría de los tejidos blanco de los estrógenos (glándula mamaria, útero y la pituitaria) la expresión del PR es aumentada con el tratamiento de estrógenos. Adicionalmente se observó que el tratamiento con progesterona o con su antagonista RU 486 no modifica la expresión del marcador de ectodermo Nestina o el de mesodermo Brachyury en EB de 8 días. [124].

En otro trabajo se encontró que las CTE humanas y los EB derivados de éstas expresan los receptores de progesterona. Se demostró que el tratamiento con progesterona produce un incremento en la expresión de Nestina en EB. Las colonias de CTE humanas tratadas con RU 486 previo a la formación de EB forman esferas sólidas que no cavitan y no expresan el marcador Nestina. Asimismo, cuando a los EB se les adiciona RU 486 se inhibe la formación de rosetas neuroectodermales después de 17 días en cultivo. Esto sugiere un papel importante de la progesterona durante la diferenciación neuronal *in vitro* [125].

En CTE humanas de la línea Miz hES1 y en EB formados a partir de estas, se analizó la expresión del GR, PR y ER mediante RT-PCR. Encontrándose que la expresión del GR y ER- α no se modifica con la formación de EB, mientras que el PR presenta una baja expresión en CTE que disminuye hasta dos veces en EB. Por otro lado, el ER- β se expresa en EB de dos días y su expresión disminuye en EB de 4 y 6 días. Mediante análisis de inmunocitoquímica se encontró que los receptores de estrógenos α y β tienen una localización nuclear en EB de 2 y 6 días. Sin embargo, el PR no fue detectado en los EB. Finalmente, se demostró que el tratamiento de estradiol, progesterona e hidrocortisona en EB no tienen efecto sobre la expresión de marcadores de neuroectodermo NF 68 kDa y la enolasa, mientras que el tratamiento con estrógenos aumenta la expresión de los marcadores de endodermo [126].

El tratamiento con progesterona 1 y 10 pmol/l causa un incremento en la proliferación de CTE de ratón, el cual fue evaluado mediante el ensayo de MTT y la incorporación de BrdU. Experimentos de citometría de flujo muestran que la proporción de CTE en fase S es mayor cuando las células se tratan con progesterona, indicando que la progesterona acelera el proceso de mitosis. Lo anterior está acompañado por un aumento dosis dependiente en la expresión de ciclina D1, CDK4, CDK2, ciclina E, PCNA c-Fos y c-Myc, sugiriendo que la progesterona incrementa a proliferación de CTE por la regulación de las ciclinas, cdk y protooncogenes. Por otro lado se observó que el tratamiento con progesterona produce un aumento en la diferenciación de CTE y una disminución en Oct-4 [127].

Las CTE de ratón expresan los ER α y β . El tratamiento de estradiol induce la expresión de ambos ER, pero no modifica los niveles de expresión de Oct4. El tratamiento con estradiol causa un aumento en la incorporación de timidina y BrdU en concentraciones que van de 1 pM a 10 μ M después de 8 horas de tratamiento, causando un aumento en la expresión de los protooncogenes c-Fos, c-Jun y c-Myc y estos efectos son revertidos con el antagonista de los ER tamoxifen a una concentración de 1 μ M. De manera interesante, el tratamiento con el conjugado estradiol-BSA, que es impermeable a la célula, también produce un incremento en la incorporación de timidina y de BrdU. Este efecto no es sensible a la adición de tamoxifen y está más relacionado a la fosforilación de las MAPK p44/42, la expresión de ciclina D1, ciclina E y cdk2 y 4 ya que fue inhibido por la adición PD 98054 10 μ M. Indicando, que efectos genómicos y no genómicos participan en el aumento en la proliferación de CTE causada por el estradiol [128].

Efecto de la progesterona y el estradiol en la diferenciación neuronal

El tratamiento de EB derivados de CTE de ratón con RA mas estradiol 1 μ M causa un aumento en el porcentaje de neuronas MAP2 positivas comparado con la condición control. Cuando las células disociadas de EB se siembran sobre fibronectina causan un aumento en el largo de las neuritas y el tratamiento con estradiol aumenta la ramificación de las neuritas cuando se utiliza como sustrato gelatina y fibronectina [129].

En la línea de células tumorales Ntera2 que exhibe características de precursores neuroepiteliales comprometidos hacia linajes neuronales, la adición de RA promueve la diferenciación de estas células a neuronas MAP2, Tau y GAD 67 positivas. En estas condiciones de cultivo y después de 4 semanas de tratamiento se detectó que el 93% de neuronas diferenciadas expresan la enzima 3 β HSD y la presencia de progesterona en el medio de cultivo de las células Ntera2, alcanzando una concentración de 302 pg/mg de proteína. [130].

Existen reportes donde se demuestra la existencia de receptores de estrógenos en la membrana de células progenitoras neurales (NPC) aisladas del telencéfalo de ratón. Cuando

las NSC son tratadas con estrógenos hay una fosforilación de ERK después de 15 minutos de tratamiento con estradiol a una concentración de 1 μ M, lo cual coincide con una respuesta no genómica, ya que después de 30 minutos la fosforilación de ERK disminuyó. Asimismo, cuando las células se trataron con ICI 182, 780 el efecto de la fosforilación no se bloquea. Por otro lado, se demostró que el tratamiento con estrógenos, aumenta la proliferación de los NPC y que este efecto es debido a los ER nucleares ya que el tratamiento previo con un antagonista de ER ICI 182, 780 disminuye este efecto evaluado mediante la incorporación de BrdU y el ensayo de MTT. Además se encontró que el ER- β se expresa más en la NPC mientras que el ER- α se encuentra principalmente en las neuronas diferenciadas. Finalmente en este trabajo se observó que el estradiol induce la diferenciación hacia oligodendrocitos de manera independiente a los ER clásicos [131]. El estradiol promueve la proliferación de células estriatales y corticales de ratón [132] y de humano [133]. Los efectos de proliferación encontrados en ambos casos involucran la activación de ERK. Los efectos proliferativos de los estrógenos se han observado también en precursores de neuronas dopaminérgicas derivados de CTE [134].

Además de los reportes antes mencionados se ha visto que la progesterona y el estradiol ejercen efectos sobre las NSC adultas. Se ha demostrado que en ratas hembra, la proliferación de precursores neurales hipocampales es significativamente más alta durante la etapa de proestro, lo cual está acompañado por una disminución en el número de núcleos picnóticos en esa estructura. La ovariectomía afecta de manera significativa la incorporación de BrdU en esta estructura y la administración exógena de estradiol en niveles similares a los del proestro recuperan la proliferación a niveles normales [135]. Asimismo, se ha encontrado la expresión de los receptores de progesterona PGRMC1 y 2 en NPC aisladas de la SGZ del giro dentado del hipocampo de ratas adultas. El tratamiento de progesterona en una concentración de 10 nM induce un aumento en la incorporación de BrdU comparable al tratamiento con bFGF 20 ng/ml, este comportamiento tiene una tendencia a disminuir a concentraciones más altas 1 mM y 10 mM. La progesterona induce una entrada a la fase S del ciclo celular en las NPC 6 horas después de su administración, lo que indica que es un potente agente mitogénico. En relación con esto, el tratamiento con progesterona aumenta la expresión de genes relacionados con la progresión del ciclo celular como CDK-

4 y CDK2, ciclina A y PCNA y disminuye la expresión de inhibidores del ciclo celular. Este efecto sobre la proliferación es independiente de los metabolitos de progesterona, ya que al co-incubar con finasteride (que bloquea la transformación de la progesterona a 5α dihidroprogesterona y $AP\ \alpha$) no modifica el efecto mitogénico de la progesterona en las NPC. Además, la presencia del receptor PGRMC1 es necesaria para observar el efecto en la proliferación, ya que solo las células positivas PGRM1 co-expresan PCNA y su disminución mediante el uso de RNA de interferencia específico para PGRM1 causa un decremento en la proliferación de las NPC, lo que indica que los mecanismos no genómicos mediados por la progesterona son importantes para la proliferación de los NPC. Además del hecho de que los PR clásicos no fueron detectados en estas células [136].

Se han reportado efectos de las hormonas esteroides progesterona y estradiol sobre NM en distintos modelos experimentales. En un trabajo donde se analizó la expresión y localización de los AR y los ER en NM diferenciadas a partir de una línea celular, generada a partir de la fusión de neuronas de la médula de espinal de embriones de 13 días de desarrollo con células de neuroblastoma N18TG2, se observó una localización citoplasmática de los ER α y β aún con el tratamiento con estrógenos a su vez el AR se localiza en el núcleo cuando se agrega su ligando el propionato de testosterona. Por otro lado, cuando se analizaron las NM faciales de ratón adulto se encontró que el ER α se expresa en el citoplasma y en el núcleo mientras que el AR se expresa solo en el citoplasma y cuando se agrega su ligando no se transloca al núcleo [137].

En el pez cebra *Danio rerio* se ha demostrado que los estrógenos tienen efectos sobre la formación de uniones neuromusculares y la ramificación axonal, ya que el tratamiento con estrógenos incrementa el número de vesículas positivas para el VACHT así como un aumento en la ramificación de los axones en las NM. Por el contrario, la ausencia de estrógeno con el tratamiento de un inhibidor de la aromatasa disminuye número de vesículas positivas para el VACHT, la ramificación y la longitud de los axones [138].

Debido a que se han identificado una gran cantidad de efectos ejercidos por las hormonas esteroides sobre las células troncales neurales, precursores neurales y neuronas

diferenciadas y tomando en cuenta que las CTE y los EB pueden responder a estas hormonas debido a que expresan los ER y PR, es de gran interés conocer el efecto de estas hormonas sobre la diferenciación de NM derivadas de CTE, por lo que se plantea la siguiente hipótesis.

Hipótesis

Debido a que las hormonas esteroides progesterona y estradiol afectan varios procesos en distintas poblaciones de células troncales con capacidad neurogénica, tales como la proliferación y la diferenciación, es posible que la adición de estas hormonas pueda incrementar la diferenciación *in vitro* de células troncales embrionarias a NM.

Objetivos

Estudiar el efecto de la progesterona y el 17 β -estradiol sobre la diferenciación de NM diferenciadas a partir de CTE.

Determinar si el efecto de estas hormonas esteroides es mediado por receptores nucleares mediante el uso de antagonistas de los receptores.

Materiales y métodos

Protocolo para la generación de NM derivadas de células troncales embrionarias.

Expansión *in vitro* de CTE

La expansión de las CTE de ratón de la línea HBG3, (en la cual la GFP se expresa bajo los elementos reguladores del gen *hb9*) se llevó a cabo sobre fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs) inactivados mitóticamente. Las CTE fueron mantenidas en medio KOES, el cual, fue suplementado con 1000 U/ml de LIF (Chemicon, USA), para que se mantuvieran en estado pluripotente.

Diferenciación de NM derivadas de CTE

Formación de EB y tratamiento con AR + SHH

Para llevar a cabo la diferenciación de NM, las CTE que se encontraban proliferando sobre los MEF fueron sembradas en cajas de cultivo tratadas previamente con una solución de gelatina 0.1%, a las células cultivadas en estas condiciones se le adicionaron medio KOES mas 1000 U/ml de LIF. Una vez que las células alcanzaron un 70% de confluencia, se disociaron con tripsina/EDTA al 0.25% y se transfirieron a cajas de petri para generar EB, que son agregados celulares que contienen derivados de las tres capas germinales, que se forman partir de CTE en suspensión. Los EB se mantuvieron en medio DFNK, (medio de que promueve la diferenciación neuronal) durante 2 días en ausencia de LIF. Con la finalidad de hacer más eficiente la diferenciación hacia NM, los EB fueron tratados con RA 2 μ M y SHH 100 ng/ml durante 4 días más. Después de seis días en cultivo, se observa en los EB la expresión de la GFP indicativo de la diferenciación hacia NM.

Tratamientos farmacológicos

Para establecer los efectos de las hormonas esteroides progesterona y 17 β -estradiol sobre la diferenciación de NM derivadas de CTE, se llevó a cabo el protocolo de diferenciación de NM mediante la formación de EB, como ya se ha descrito. Los EB fueron tratados durante todo el periodo de la diferenciación con las siguientes concentraciones de 17 β -estradiol y progesterona (encapsuladas en ciclodextrina), en experimentos independientes, 1, 10 y 100 nM. La condición control consistió del tratamiento con 30 nM de ciclodextrina en ambas condiciones. Adicionalmente, con el propósito de conocer el mecanismo de acción de la progesterona y el estradiol sobre la diferenciación de NM. Se llevaron a cabo experimentos que consistieron en co-incubar el antagonista de los receptores nucleares de estrógenos ICI 182, 780 (Sigma) a una concentración de 2 μ M y el antagonista de los receptores de progesterona RU486 a una concentración de 10 μ M (Tocris, USA). Finalmente, con el propósito de conocer cuál de los dos tipos del receptor de estrógenos podría estar mediando el efecto sobre la diferenciación de NM se hicieron experimentos empleando antagonistas selectivos de los receptores α y β de estrógenos. El antagonista específico del receptor α 1,3-Bis (4-hidroxifenil)-4-metil-5-[4-(2-piperidinil etoxi)fenol]-1H-pirazol (MPP) dihidroclorido se empleó a una concentración de 10 nM (Tocris) y el

antagonista específico del receptor β 4-[2-fenil-5,7bis (trifluorometil) pirazol [1,5-a]pirimidin-3-il] fenol (PHTPP) se utilizó a una concentración de 1 μ M (Tocris). Todos los tratamientos farmacológicos se aplicaron durante todo el periodo de diferenciación de NM.

Una vez que se llevaron a cabo los experimentos de diferenciación con los tratamientos de progesterona, estradiol y sus respectivos antagonistas, los EB se disociaron mecánicamente en una solución de papaina/L-cisteína + DNAasa I y la suspensión celular obtenida se resembró sobre cajas de cultivo tratadas con Matrigel durante 2 días y fue analizada mediante inmunocitoquímica. Asimismo, se emplearon EB de 4 días en todas las condiciones experimentales ensayadas, y fueron analizados mediante inmunocitoquímica.

Procedimiento para la inmunocitoquímica

El procedimiento de inmunocitoquímica consistió en retirar el medio a las células que se encuentran en cultivo y se lavó 3 veces con PBS durante 5 minutos. Posteriormente, las células se fijaron en una solución de paraformaldehído (PFA) al 4% en PBS, pH=7.3 durante 20 minutos. La solución de PFA se retiró y las células se lavaron con una solución PBS con albúmina sérica de bovino (BSA) al 0.1% 3 veces por 5 minutos. Después, se agregó la solución de bloqueo (10% suero normal de cabra en PBS) + tritón X-100 al 0.3% para permeabilizar las células. Después se aplicaron los anticuerpos primarios en una dilución adecuada en solución de bloqueo, toda la noche a 4°C. Se retiró el anticuerpo primario, las células fueron lavadas con una solución PBS + albumina al 0.1% 3 veces por 5 minutos y se colocaron los anticuerpos secundarios generalmente en una dilución 1:500 en PBS con BSA al 0.1%. El anticuerpo secundario fue retirado y se lavó con PBS + BSA al 0.1% 3 veces por 5 minutos. Por último, se adicionó el compuesto Hoechst 32258 5 μ g/ml en una dilución 1:5000 para distinguir los núcleos de las células.

En este trabajo se emplearon los siguientes anticuerpos primarios: anti GFP hecho en conejo (Molecular Probes, USA) en una dilución 1:500, anti β tubulina III hecho en ratón (Covance, USA) en una dilución 1:1000. Asimismo, se emplearon los anticuerpos secundarios Alexa 488 anti conejo y Alexa 568 anti ratón (Molecular Probes) en una dilución de 1:500 por cada uno. Para la inmunocitoquímica de los EB se emplearon los anticuerpos anti caspasa 3 hecho en conejo (Cell Signaling, USA) en una dilución 1:200 y

anti histona H3 fosforilada hecho en conejo (Cell Signaling) en una dilución 1:200 y como anticuerpo secundario se utilizó alexa 568 anti conejo en una dilución de 1:500.

Conteo celular

El análisis de conteo celular se realizó en EB de 4 días y en las células disociadas que fueron diferenciadas a NM, en las condiciones experimentales antes mencionadas (tratamientos con progesterona, 17 β -estradiol y sus antagonistas) y en condiciones control (ciclodextrina y etanol 70%), tomando como base fotografías de inmunocitoquímica a partir de 10 campos tomados al azar por duplicado de las células positivas para GFP y β tubulina III en el caso de las células disociadas. En el caso de los EB, se registraron las células positivas para caspasa 3 y la histona H3 fosforilada en EB a partir de 10 campos tomados al azar por duplicado. Las fotografías fueron capturadas con la cámara digital Nikon DMX 1200F y procesadas con el programa de adquisición de imágenes Nikon ACT-1 (Nikon Corp., Tokio, Japón). Los resultados que se presentan son representativos de al menos tres experimentos.

Cuantificación de NM GFP positivas por citometría de flujo

Con la finalidad de corroborar los datos obtenidos de la cuantificación de NM por inmu, se llevó a cabo una cuantificación de NM diferenciadas GFP positivas mediante citometría de flujo. Los EB en las condiciones control y experimentales fueron disociados (como se describió anteriormente). Las células disociadas obtenidas en cada condición experimental se pasaron a través de un filtro para eliminar agregados celulares. Los experimentos de citometría se realizaron en un citómetro FACSCalibur de Beckton Dickinson y se analizaron 10,000 células en cada condición experimental. Como control positivo se emplearon CTE de la línea B5 que expresan constitutivamente la GFP y como control negativo se utilizaron CTE de la línea HBG3 sin diferenciar. El análisis de la cuantificación de NM GFP positivas y la construcción de los histogramas se realizó con la ayuda del programa Flowjo versión 7.5.

Cuantificación de la expresión de marcadores de NM por RT-PCR cuantitativa

Para conocer si la expresión de algunos marcadores de NM se modifica con el tratamiento de progesterona y estradiol se llevaron a cabo experimentos de RT-PCR cuantitativa. Se analizó el nivel de expresión del marcador neuronal β tubulina III y los marcadores de NM Islet1 y ChAT en las distintas condiciones experimentales. Para llevar a cabo estos experimentos, se aisló RNA de EB mediante el método de TRIZOL (Invitrogen, USA) a los 4 días (islet1) y 6 días (β tubulina III y ChAT) de diferenciación. Una vez que el RNA fue aislado y posterior al tratamiento con DNasa I (Invitrogen) el RNA se retro-transcribió usando 1 μ g de RNA con 100 U de la retrotranscriptasa del virus de la leucemia de Moloney (MMLV-RT, Invitrogen), 10 U de inhibidor de RNasa (RNase out, Invitrogen), 0.25 μ g de hexámeros aleatorios (invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante y empleando el buffer recomendado (75 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 10 mM dithiotreitol, 50 mM Tris-HCl, and pH 8.3). La retro-transcripción se llevó a cabo de la siguiente forma: 10 minutos a 80 °C, 60 minutos a 50 °C y 15 minutos a 75 °C. El DNA complementario (cDNA) resultante de esa reacción fue usado como sustrato para realizar la PCR cuantitativa con oligonucleótidos específicos para β tubulina III, Islet1 y ChAT. Las reacciones de PCR se hicieron con 2.5 U de Taq polimerasa recombinante (Invitrogen), 5 μ M de Syto9, 1.5 mM de MgCl₂, 400 nM de oligonucleótidos y 2 mM de dNTPs en el buffer recomendado (Invitrogen) y 200 ng de cDNA. La PCR cuantitativa se realizó con el sistema Rotor Gene 6000 (Corbet life science, USA). Para las reacciones de PCR se utilizaron los siguientes oligonucleótidos: GAPDH (5'-gatgggtgtgaaccacgaga-3' y 5'-agtgatggcatggactgtgg-3'), Islet1 (5'-accaattgtccaaccacat-3' y 5'-tcccatcctaacaagcac-3'), β Tubulina III (5'-tgaggcctcctctcacaagt-30 y 5'-cgcacgacatctagga ctga-3'), y ChAT (5'-agcctgaggccatcaccttc-3' y 5'-ttggcttgg ttgggcctct-3').

La cuantificación relativa de los niveles de expresión se llevó a cabo normalizando los valores de cada reacción con respecto a GAPDH y comparando cada condición experimental con la condición control. Adicionalmente se realizaron curvas de disociación en cada una de las reacciones para verificar que un solo producto de PCR fue amplificado.

Análisis estadístico

Todos los datos presentados están descritos como la media \pm error estándar. Se llevó a cabo la prueba de ANOVA seguida de una prueba de Newman-Keuls para determinar diferencias significativas entre los tratamientos analizados. Se utilizó el programa estadístico GraphPad Prism 5.00 para Windows (GraphPad software, San Francisco, California USA). Los valores menores a 0.05 son considerados estadísticamente significativos.

Resultados

La progesterona induce un incremento en el número de NM diferenciadas a partir de CTE a través de la activación del PR

Con la finalidad de determinar el efecto de la progesterona en la diferenciación de NM derivadas de CTE, se llevaron a cabo experimentos en los cuales se ensayó la diferenciación de NM, a partir de la formación de EB a los cuales se le adicionaron diferentes concentraciones de progesterona 1, 10 y 100 nM. Después de que se llevaron a cabo estos tratamientos durante el periodo de diferenciación, se encontraron incrementos en el número de NM diferenciadas, siendo un incremento estadísticamente significativo el tratamiento con 100 nM de progesterona $P < 0.05$, comparado con la condición control (ciclodextrina) (Figura 5). Es importante señalar que la proporción de neuronas β tubulina III positivas no se modificó con el tratamiento de progesterona en ninguna de las concentraciones probadas (Figura 10).

Para determinar si el efecto de la progesterona sobre la diferenciación de MN, es mediado a través de la activación del PR nuclear, se realizaron experimentos con el antagonista de los PR RU486 a una concentración de 10 μ M, el cual fue administrado en los EB de forma individual o junto con progesterona 100 nM. Después de llevar a cabo los experimentos con el antagonista se observó un decremento en el número de NM con el tratamiento de RU 486. El antagonista bloqueó los efectos de la progesterona e inclusive produjo una disminución en el número de NM comparado con la condición control (Figura 6). Adicionalmente, se encontró que la adición RU 486 causó una disminución en el número de

neuronas β tubulina III positivas del 22 ± 2.8 % en la condición control a una proporción del 3.6 ± 0.7 cuando se agrega solo y 3.4 ± 0.6 cuando se co-incubó con progesterona 100 nM (Figura 10).

El 17 β -estradiol estimula la diferenciación de NM mediante la activación del receptor α de estrógenos

Después de que fue establecido el efecto de la progesterona. Se examinó el efecto del 17 β -estradiol durante el proceso de diferenciación de NM. Cuando se administraron las concentraciones de 1, 10 y 100 nM de estradiol se observó un aumento en la diferenciación de NM. Este incremento, fue estadísticamente significativo en las concentraciones de 10 y 100 nM comparado con la condición control (ciclodextrina) (Figura 7). Con la finalidad de conocer si el 17 β -estradiol estaba mediando sus efectos a través de receptores nucleares se diseñaron experimentos en los cuales los EB fueron tratados con el antagonista general de los ER ICI 182, 70 y se encontró que el incremento en la diferenciación de NM debido a la administración de 17 β -estradiol 100 nM fue revertido a porcentajes similares a los de la condición control cuando se co-incubó con ICI 182, 70 a una concentración de 2 μ M (Figura 8). Asimismo, se encontró que el antagonista ICI 182, 70 no produjo ningún efecto sobre la diferenciación neuronal cuando fue incubado con los EB durante todo el periodo de la diferenciación.

Debido a que el ICI 182, 70 ejerce su efecto antagónico sobre los dos tipos de ER. Se decidió utilizar antagonistas específicos de los ER, MPP para el ER- α y PHTPP para el ER- β para discernir si el aumento en el número de NM debido a la administración de 17 β -estradiol estaba mediado por la activación de alguno de estos receptores. Cuando se trataron a los EB con 17 β -estradiol 100 nM y el antagonista MPP se observó una disminución el número de NM similar a la condición control. Por otro lado, El tratamiento de los EB con estradiol 100 nM y el inhibidor PHTPP no tuvo ningún efecto sobre la diferenciación de NM. Además, el tratamiento con los antagonistas de cada uno de los ER tampoco tuvo un efecto sobre la diferenciación de NM (Figura 9). Los resultados anteriores sugieren que el efecto producido por el estradiol es mediado por la activación del ER- α . Es importante

señalar que al igual que en las condiciones que fueron previamente evaluadas, la proporción de neuronas β tubulina III positivas no cambió con el tratamiento de estradiol o en combinación con los antagonistas (Figura 10).

El incremento de NM con los tratamientos de progesterona y estradiol fue verificado mediante la cuantificación de NM GFP positivas por citometría de flujo

La expresión de la GFP bajo el promotor de HB9 además de ser útil para monitorear la diferenciación de NM, también permitió la cuantificación de NM GFP positivas mediante citometría de flujo. Los EB de la línea HBG3 fueron diferenciados y tratados en las diferentes condiciones experimentales ya mencionadas (progesterona, 17 β -estradiol y sus antagonistas) y de manera similar a los resultados encontrados mediante la cuantificación por inmunocitoquímica (Figuras 5-9), el tratamiento con estradiol 100 nM produjo un incremento en el número de células GFP positivas comparado con la condición control. Este incremento de células GFP positivas fue revertido a niveles similares al control cuando se co-incubó con el antagonista del ER- α MPP, mientras que el tratamiento con el antagonista del ER- β PHTPP no tuvo ningún efecto sobre el número de células GFP positivas. Por otro lado, el tratamiento con progesterona 100 nM también incrementa el número de NM y el antagonista RU 486 revierte este incremento a niveles por debajo del control cuando fue co-incubado con progesterona o en ausencia de esta hormona, como ya se había observado en las cuantificaciones hechas por inmunocitoquímica (Figura 11).

El tratamiento con progesterona y estradiol induce un aumento en la expresión de marcadores de NM

Con la finalidad de validar los efectos encontrados con los tratamientos de progesterona y estradiol sobre la diferenciación de NM derivadas de CTE, se realizaron experimentos para cuantificar la expresión de transcritos de algunos marcadores de NM por RT-PCR cuantitativa en las condiciones en las que se agregaron la progesterona y el 17 β -estradiol comparado con la condición control. El tratamiento con 100 nM de 17 β -estradiol causó un aumento significativo en la expresión de los marcadores de NM Islet1 y ChAT, este efecto

fue revertido a niveles similares a la condición control con la adición de MPP, mientras que el PHTPP no tuvo efecto sobre la expresión de estos marcadores. De igual manera, el tratamiento con progesterona provocó un aumento en la expresión de los marcadores Islet1 y ChAT. Sin embargo, el tratamiento con RU 486 causó una disminución de estos marcadores a niveles por debajo del control cuando se administra solo o con la progesterona. Para corroborar que el efecto observado es específico de NM, se analizó la expresión del marcador neuronal β tubulina III y de manera interesante, no se encontró una diferencia en la expresión de sus transcritos con el tratamiento de estradiol y sus antagonistas, ni con el tratamiento con progesterona. Sin embargo, el tratamiento con RU 486 produjo una disminución en la expresión de este marcador a niveles por debajo del control (Figura 12). Los resultados anteriores indican que la progesterona y el 17 β -estradiol tienen la capacidad de aumentar la expresión de transcritos clave para la diferenciación *in vitro* de las NM.

El tratamiento con progesterona estimula la proliferación de EB durante la diferenciación de NM

El aumento en la diferenciación de algún tipo celular en particular puede deberse a una mayor proliferación de los precursores de estas células o a una disminución en la muerte apoptótica. Por lo tanto, se investigó si los tratamientos con estradiol y progesterona tenían algún efecto sobre la proliferación y la muerte apoptótica. Cuando se analizaron EB de cuatro días de diferenciación se encontró que el tratamiento con 100 nM de progesterona causó un incremento significativo en el número de células positivas para la Histona H3 fosforilada (que es un marcador de células que se encuentran en mitosis), comparado con la condición control, mientras que en los EB tratados con 17 β -estradiol no se encontró un incremento significativo (Figura 13). En el caso de la cuantificación de células positivas a la forma activa de la Caspasa 3, no se encontró diferencia significativa entre los EB de 4 días tratados progesterona y la condición control. En el caso del tratamiento con 17 β -estradiol se observó una disminución en el número de células positivas para la Caspasa 3. Sin embargo, esta diferencia no fue estadísticamente significativa con respecto a la condición control (Figura 14).

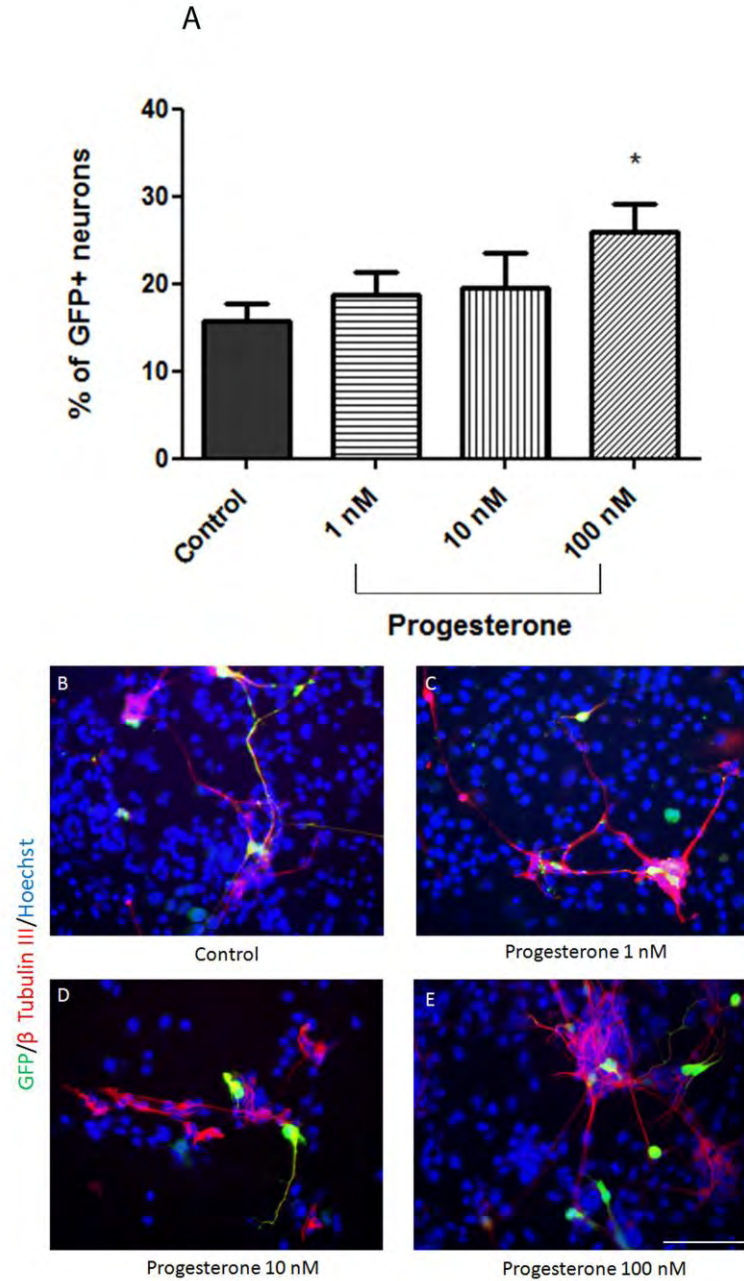


Figura 5. La progesterona induce un incremento significativo en el número de NM diferenciadas a partir de CTE. (A). Fotos representativas de inmunocitoquímicas de las condiciones: Control (ciclodextrina, B), progesterona 1 nM (C), 10 nM (D) y 100 nM (E). La marca de GFP (verde) co-localiza con β -tubulina III (rojo). Los núcleos fueron teñidos con Hoechst 32258. * $P < 0.05$ comparado con el control. La escala corresponde a 100 μ m.

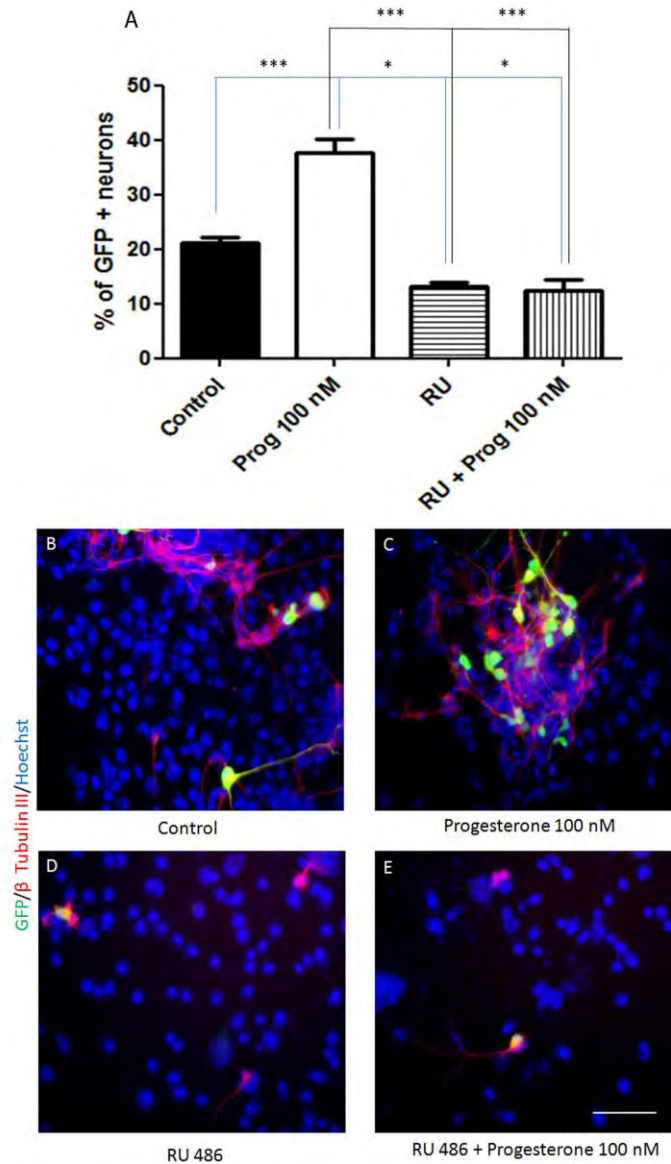


Figura 6. El antagonista del receptor de progesterona RU 486 abate el incremento causado por el tratamiento con progesterona a un valor por debajo de la condición control (**A**). Fotos representativas de inmunocitoquímicas de las condiciones: Control (etanol + ciclodextrina, **B**), 100 nM progesterona (**C**), 10 μ M RU 486 (**D**), 10 μ M RU 486 + 100 nM progesterona (**E**). Los núcleos fueron teñidos con Hoechst 32258. * $P < 0.05$ y comparado con el control *** $P < 0.001$ comparado con el control y progesterona 100 nM. La escala corresponde a 100 μ m.

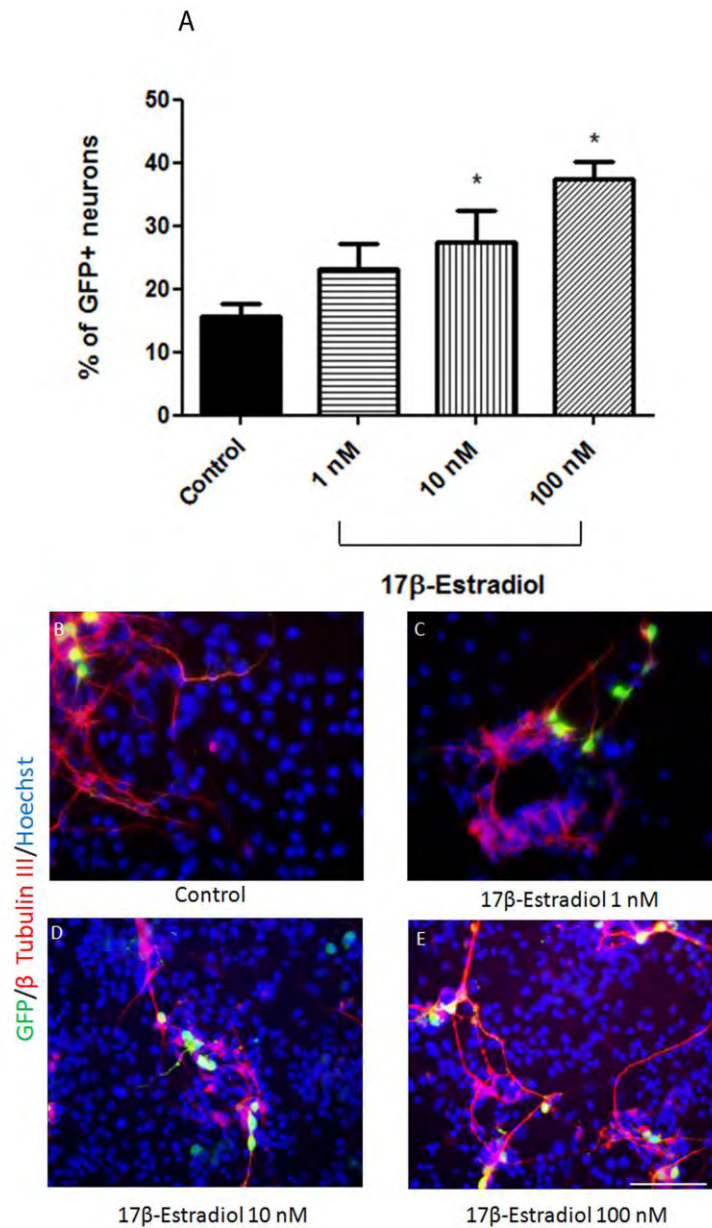


Figura 7. El 17 β -estradiol induce un incremento significativo en el número de NM diferenciadas a partir de CTE. (A). Fotos representativas de inmunocitoquímicas de las condiciones: Control (ciclodextrina, B), 17 β -estradiol 1 nM (C), 10 nM (D) y 100 nM (E). La marca de GFP (verde) co-localiza con β -tubulina III (rojo), Los núcleos fueron teñidos con Hoechst 32258. *P < 0.05 comparado con el control. La escala corresponde a 100 μ m.

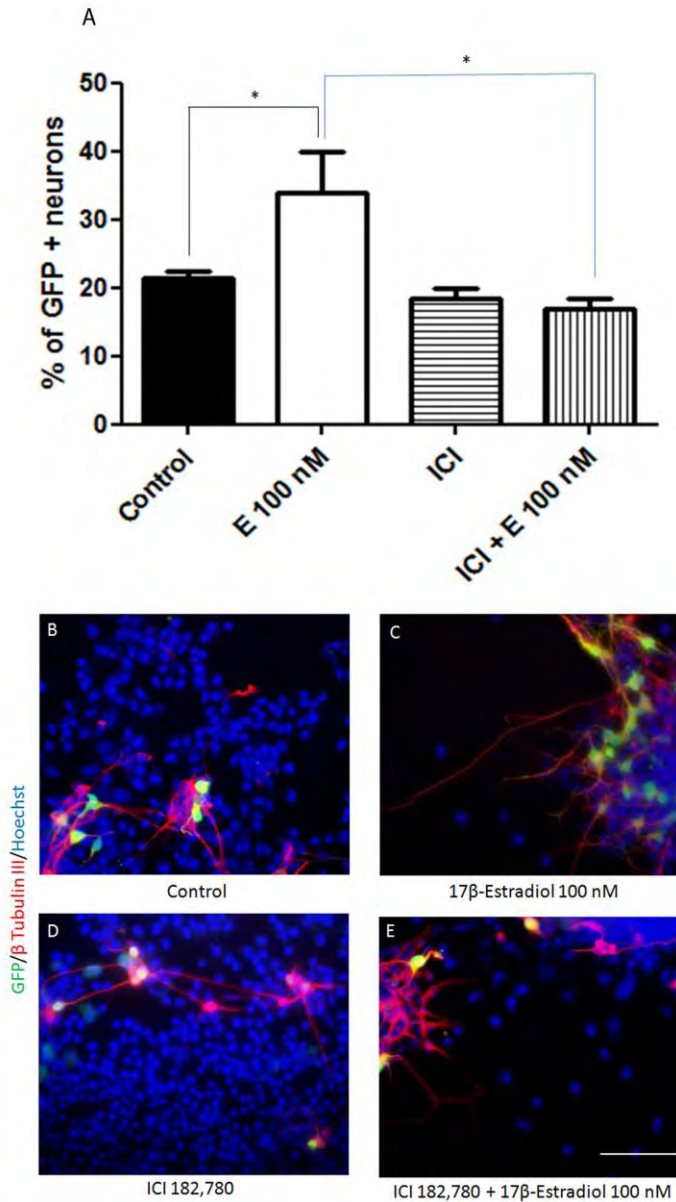


Figura 8. El antagonista del receptor de estrógenos ICI 187, 780 revierte el incremento causado por el tratamiento con 17 β -estradiol 100 nM a un valor similar al de la condición control (A). Fotos representativas de inmunocitoquímicas de las condiciones: Control (etanol + cyclodextrina), (B), 100 nM 17 β -estradiol (C), 2 μ M ICI 187, 780 (D), 2 μ M ICI 187, 780 + 100 nM 17 β -estradiol (E) Los núcleos fueron teñidos con Hoechst 32258. * $P < 0.05$ comparado con el control y 17 β -estradiol 100 nM. La escala corresponde a 100 μ m.

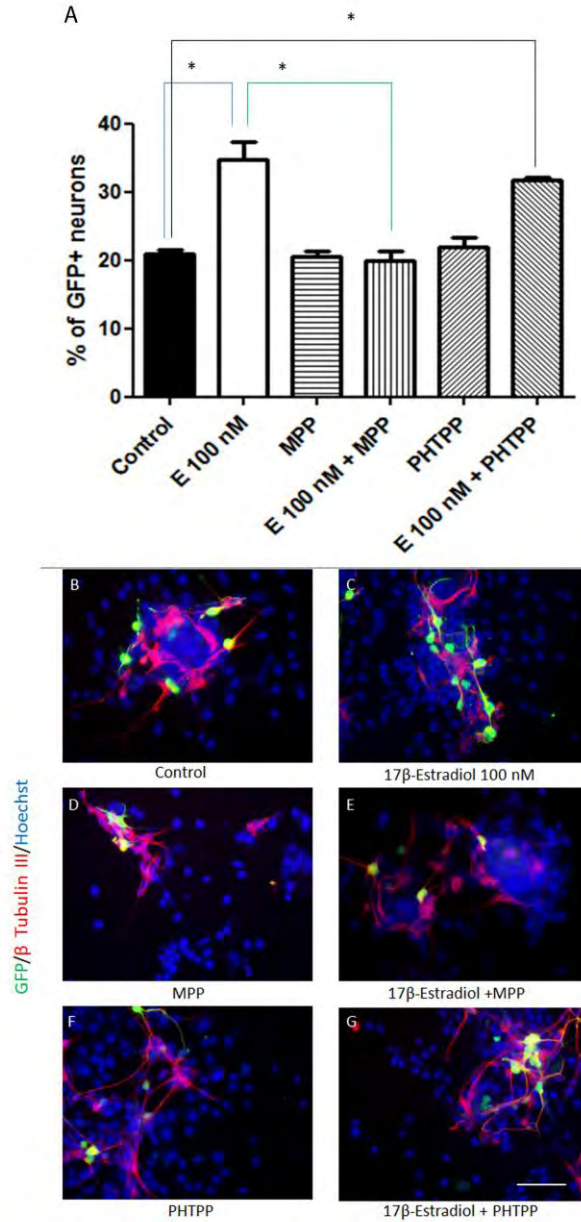


Figura 9. El antagonista del receptor α de estrógenos MPP disminuye el efecto causado por 17 β -estradiol 100 nM, disminuyendo el número de NM a un porcentaje similar a la condición control. Mientras que el PHTPP no tuvo efecto sobre la diferenciación de NM (A). Fotos representativas de inmunocitoquímicas de las condiciones: Control (DMSO + ciclodextrina, B), 100 nM 17 β -estradiol (C), 10 nM MPP (D) MPP + 100 nM estradiol (E), 1 μ M PHTPP (F), PHTPP + 100 nM 17 β -estradiol (G). Los núcleos fueron teñidos con Hoechst 32258. * $P < 0.05$ comparado con el control y 17 β -estradiol 100 nM. La escala corresponde a 100 μ m.

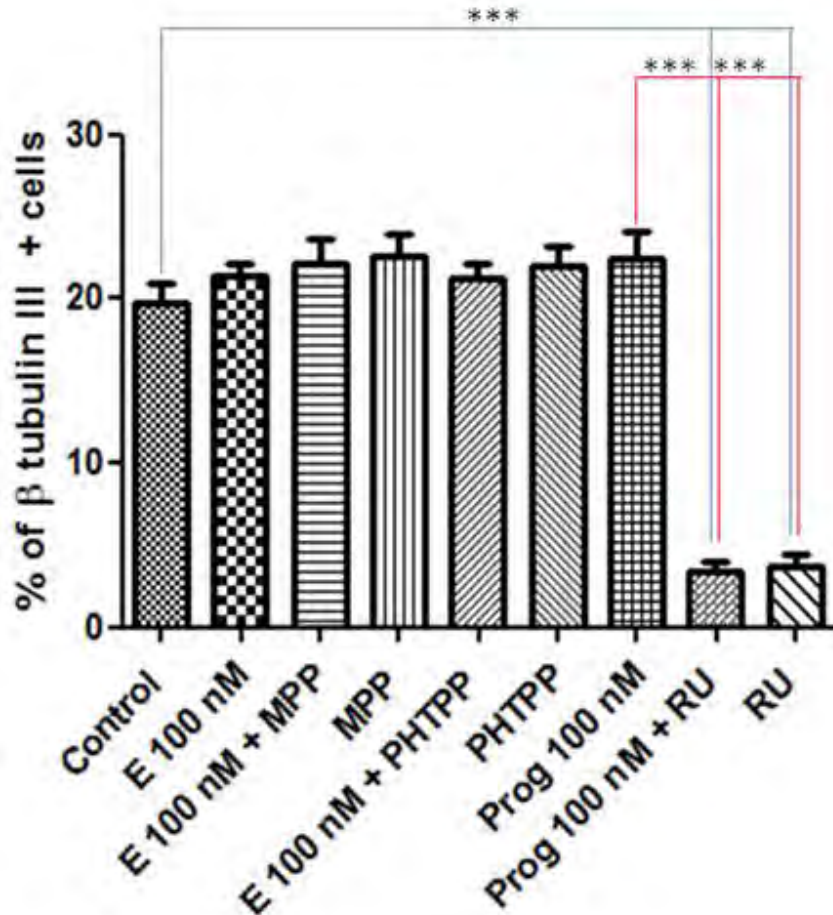


Figura 10. La diferenciación neuronal evaluada mediante la cuantificación de células β tubulina III + con respecto al total de células no se altera con el tratamiento de 17 β -estradiol o progesterona. El porcentaje de neuronas β tubulina III no se modifica con el tratamiento de 17 β -estradiol 100 nM y los antagonistas del ER α y β MPP y PHTPP con respecto a la condición control (ciclodextrina). El tratamiento con progesterona 100 nM tampoco modifica el porcentaje de neuronas, pero el tratamiento con RU 486 + progesterona y RU 486 causa un decremento estadísticamente significativo en el número de NM β tubulina III positivas. *** $P < 0.001$ comparado con el control y progesterona. Se muestra el promedio de tres experimentos independientes.

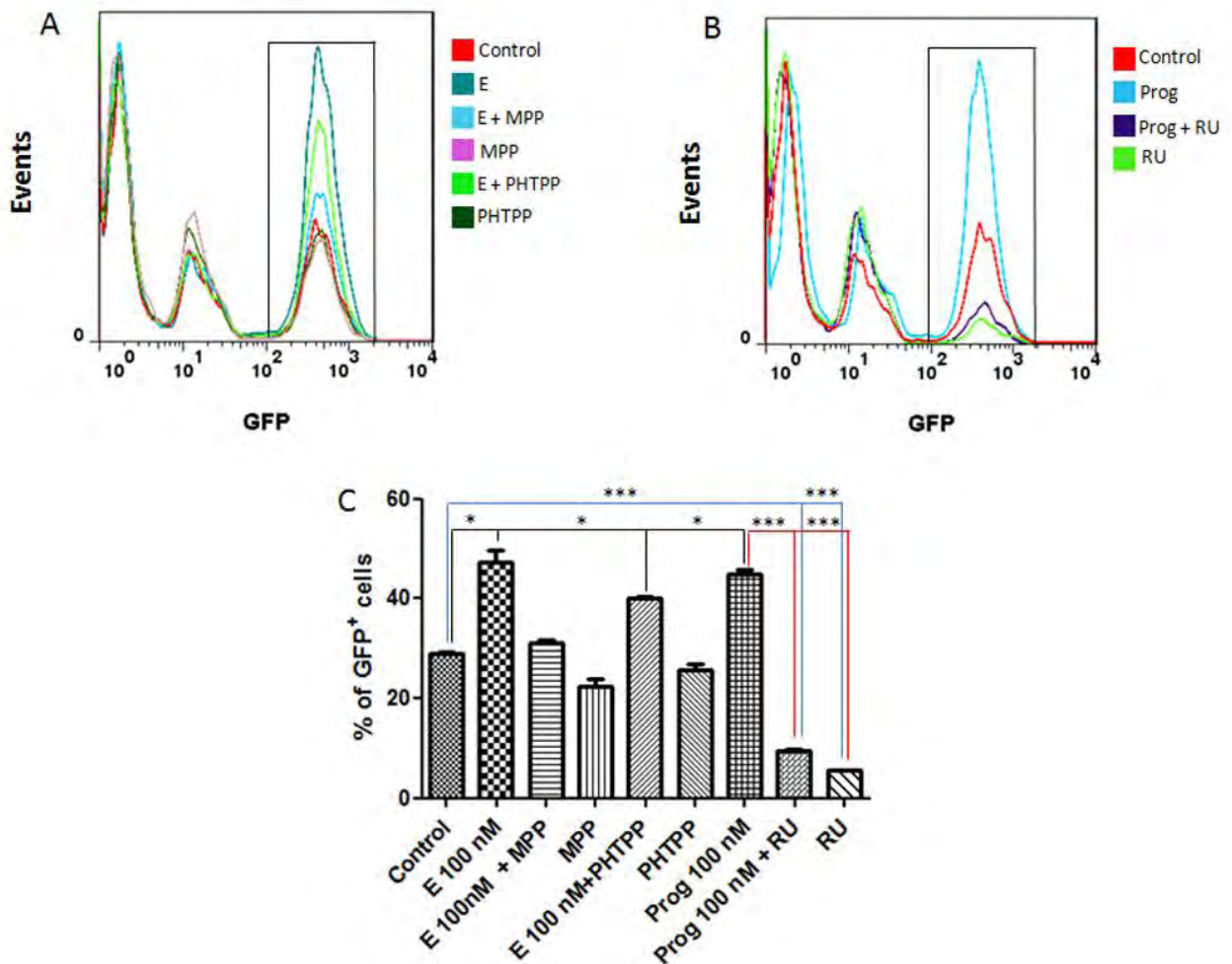


Figura 11. La cuantificación de células GFP + por citometría de flujo mostró incrementos significativos con el tratamiento de progesterona y 17 β -estradiol. El 17 β -estradiol causa un incremento en el número de células GFP +, el efecto del 17 β -estradiol se revierte con el antagonista MPP mientras que el PHTPP no tiene efecto en el número de células GFP+ En (A) se muestra un experimento representativo. Asimismo, se observó un incremento en las células GFP + con el tratamiento de progesterona el cual es abatido a niveles por debajo del control con el antagonista RU-486. En (B) se muestra un experimento representativo y en (C), promedio de experimentos independientes. *P < 0.05 y ***P < 0.001 comparado con el control y progesterona.

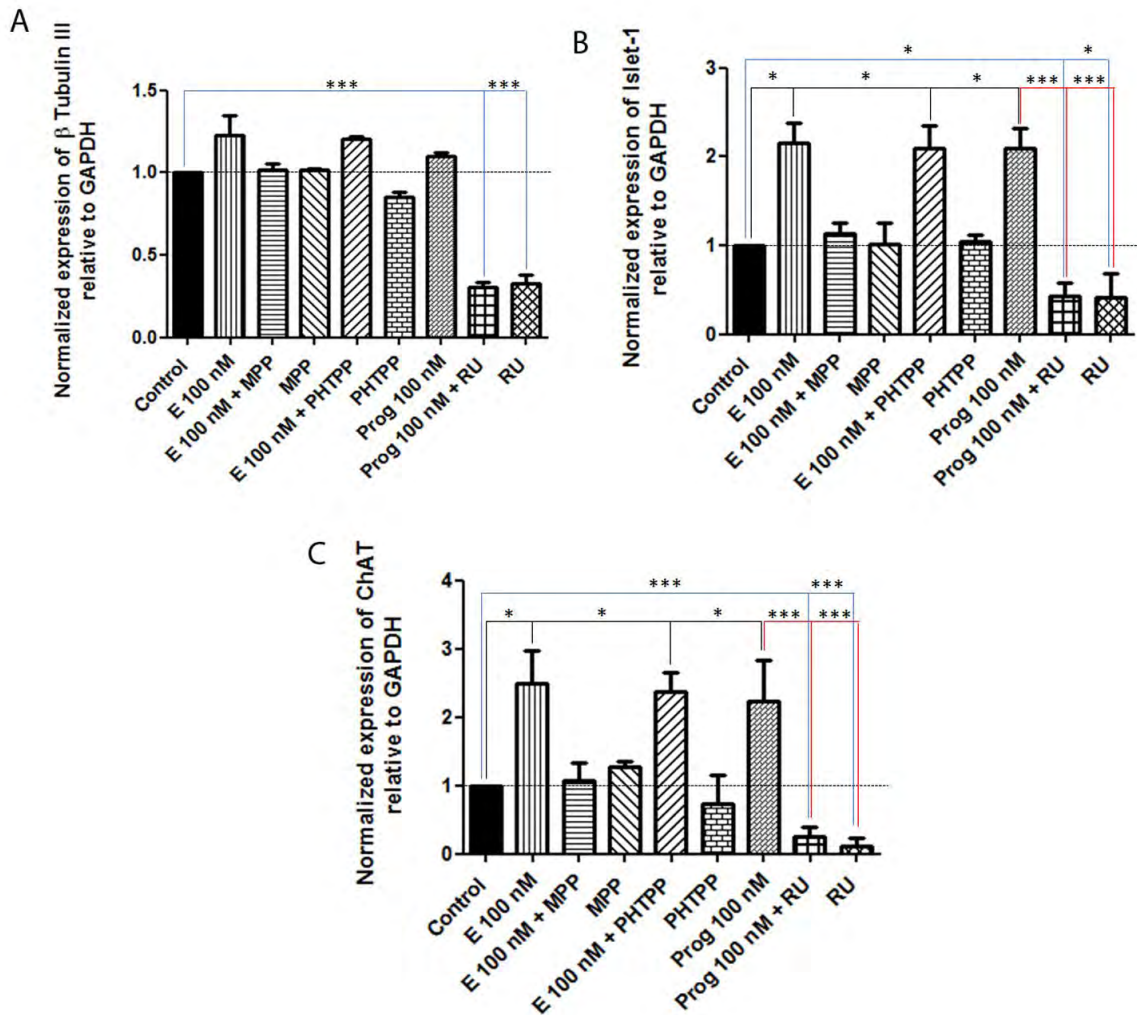


Figura12. La progesterona y el 17 β -estradiol inducen un incremento en la expresión de los marcadores de NM, Islet1 y ChAT. La expresión del marcador neuronal β tubulina III no se modificó con los tratamientos de estradiol y sus antagonistas ni con la progesterona. Sin embargo, el antagonista del PR RU 486 causó una disminución en este marcador (A). El estradiol causa un incremento significativo en la expresión de Islet1 y ChAT, este efecto de revirtió con el antagonista MPP mientras que el PHTPP no tuvo efecto en la expresión de ambos marcadores (B y C). Asimismo se observa un incremento en la expresión de Islet1 y ChAT con el tratamiento de progesterona el cual es abatido a niveles por debajo del control con el antagonista RU 486 (B y C). Se muestra el promedio de tres experimentos independientes. *P < 0.05 y ***P < 0.001 comparado con el control y progesterona.

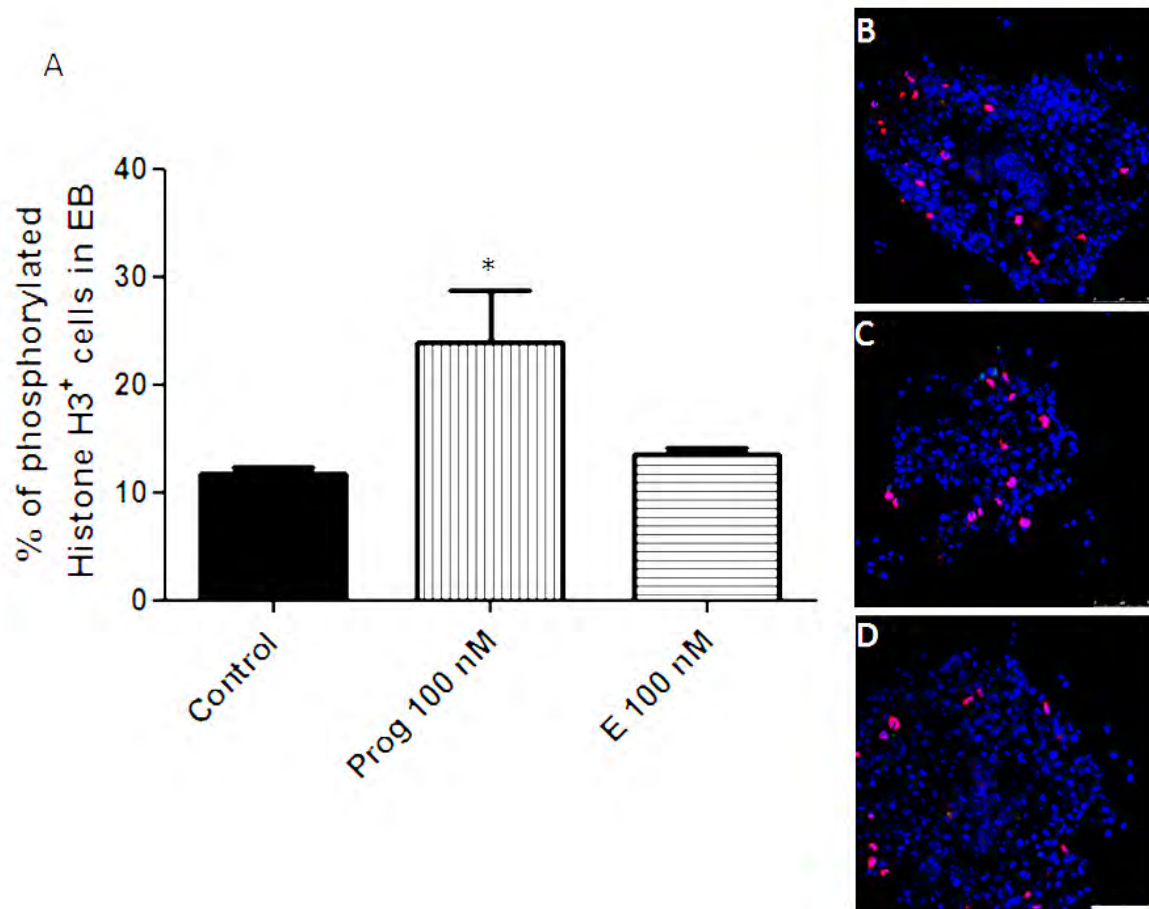


Figura 13. El tratamiento con progesterona induce un incremento en la proliferación de EB de cuatro días de diferenciación (A). Los EB de cuatro días fueron cortados y sometidos a inmunocitoquímica con un anticuerpo para la histona H3 fosforilada (pHH3). La progesterona indujo un aumento en el número de células positivas a anti pHH3 (B) comparado con el control (C) Mientras que el tratamiento con 17 β -estradiol no tuvo efecto (D), Los núcleos fueron teñidos con Hoechst 32258, se muestra el promedio de tres experimentos independientes. *P < 0.05 comparado con el control ciclodextrina. La escala corresponde a 100 μ m.

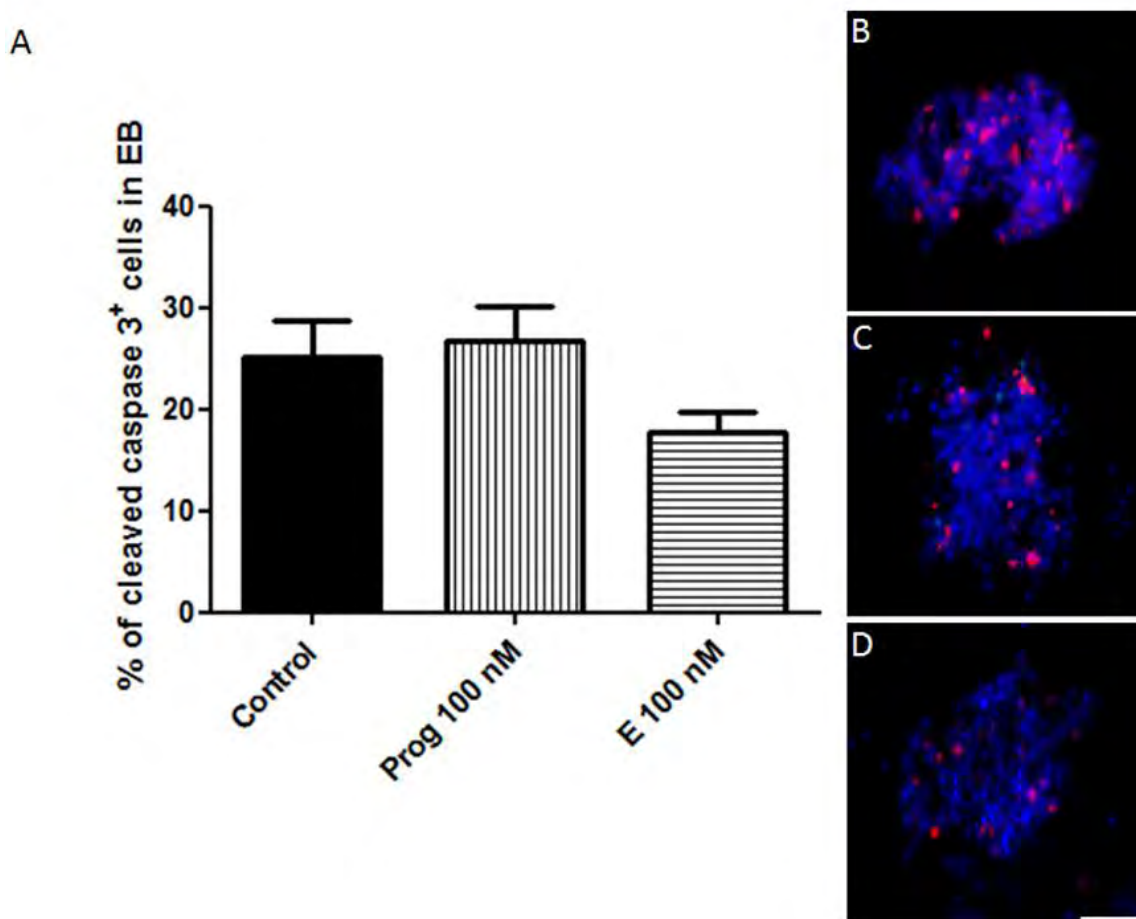


Figura 14. El tratamiento con progesterona y estradiol no modifican la muerte apoptótica en EB de cuatro días de diferenciación (A). Los EB de cuatro días fueron cortados y sometidos a inmunocitoquímica con un anticuerpo para la Caspasa 3. Ni la progesterona (C) ni el 17 β -estradiol (D) tienen efecto sobre la proporción de células Caspasa 3 positivas, comparado con la condición control (ciclodextrina) (B). Los núcleos fueron teñidos con Hoechst 32258, se muestra el promedio de tres experimentos independientes. La escala corresponde a 100 μ m.

Discusión

Los resultados que se han presentado, muestran que la adición de concentraciones nanomolares de las hormonas esteroides progesterona y 17 β -estradiol inducen un incremento en el porcentaje de NM diferenciadas a partir de CTE de ratón diferenciadas mediante la formación de EB tratados con AR+SHH. Estos resultados fueron validados mediante análisis de inmunocitoquímica, citometría de flujo y RT-PCR cuantitativa. Existe evidencia asociada a los efectos de las hormonas esteroides en la neuroprotección [139, 140], neurogénesis [141], la proliferación de NSC [133, 136] y la diferenciación neuronal [96, 142]. Con relación a los efectos de la progesterona sobre las NM, se ha establecido que el tratamiento con progesterona aumenta la sobrevivencia de NM posterior al daño causado por axotomía en ratas [143]. Además, la progesterona protege a las neuronas de la médula espinal [144] y tiene efectos neuroprotectores en modelos animales donde existe degeneración de NM [145].

Existen reportes acerca de los efectos de la progesterona sobre CTE, entre los cuales se incluye un incremento en la proliferación y viabilidad de CTE de ratón después del tratamiento con progesterona [127] y el requerimiento de la progesterona para una apropiada diferenciación neuronal en CTE humanas [125]. De acuerdo con los datos mencionados, en este trabajo se observó un incremento en la proliferación de EB y un aumento en el número de NM cuando se administraron 100 nM de progesterona durante el proceso de diferenciación a partir de CTE; estos hallazgos coinciden con otros reportes que muestran un aumento en la diferenciación de neuronas dopaminérgicas derivadas de CTE tratadas con progesterona durante la proliferación de precursores neurales. [146] y con el hecho de que la adición de progesterona en CTE humanas induce la neurulación y la expresión del marcador neural Nestina [125]. El incremento en la diferenciación de NM estuvo asociado con el aumento en la expresión de los marcadores de NM Islet1 y ChAT. Los efectos causados en la diferenciación de NM y en la expresión de los marcadores de NM Islet1 y ChAT debidos a la administración de progesterona fueron abatidos con el inhibidor de los receptores nucleares de progesterona RU 486 a un porcentaje menor que la condición control, indicando que el mecanismo por el cual actúa la progesterona es

mediado a través de los PR y sugiere que la progesterona puede ser necesaria para la diferenciación neuronal *in vitro*. Ya que se encontró el tratamiento con RU 486 produjo una disminución en el porcentaje de neuronas β tubulina III positivas, así como una disminución en la expresión del marcador neuronal β tubulina III. Estos datos coinciden con un reporte que muestra que el tratamiento con RU 486 causa defectos en la formación de EB derivados de CTE humanas, impide la formación de rosetas neurales y la expresión de Nestina. [125]. Es importante señalar que en este trabajo la formación de EB no se afecta con el tratamiento de RU 486 pero sí es evidente la inhibición sobre la diferenciación neuronal. Sin embargo, estos resultados contrastan con los efectos reportados de la progesterona sobre progenitores neuronales derivados de CTE en el protocolo de 5 pasos para la diferenciación dopaminérgica, ya que en ese trabajo se demuestra que los efectos de la progesterona son independientes de la activación del PR [146]. Adicionalmente, cabe aclarar que el protocolo de diferenciación y el tiempo de administración de la progesterona es distinto en el caso de la diferenciación de NM. Aunque se demostró que la progesterona causó un incremento en la proliferación de EB y un aumento en el número de NM, es necesario verificar si promueve un incremento en la proliferación en la población de progenitores de NM de manera específica, analizando el número de progenitores Olig2 positivos mediante inmunocitoquímica. Adicionalmente, sería interesante analizar si el silenciamiento mediante RNA de interferencia de los PR tendría el mismo efecto sobre la diferenciación de NM que la inhibición farmacológica que se utilizó en este trabajo, ya que el RU486 posee efectos antagónicos sobre los GR.

Otro de los objetivos de este trabajo fue evaluar el efecto del estradiol en la diferenciación de NM. Existe evidencia de que los estrógenos tienen la capacidad de modular varios procesos en NSC y neuronas. Se ha demostrado que antagonistas del ER previenen la apoptosis en NM diferenciadas a partir de una línea celular proveniente de una fusión de células de neuroblastoma de ratón y células de la zona ventral de la médula espinal después de la exposición a TNF- α [147]. Los estrógenos tienen la capacidad de estimular la proliferación y diferenciación de NSC y progenitores neuronales a través del ER [131]. En éste estudio, se encontró un incremento estadísticamente significativo en el porcentaje de NM derivadas de CTE cuando se agregaron 10 y 100 nM de estradiol durante el proceso de

diferenciación. Sin embargo, este efecto inductor parece actuar de manera independiente de la proliferación celular y la muerte celular por apoptosis durante la diferenciación de EB, debido a que no se encontraron diferencias en las células tratadas con 17 β -estradiol en estos parámetros con respecto a la condición control. Lo cual podría sugerir la diferenciación directa como el mecanismo por el cual el estradiol induce el incremento de NM. Nuestros resultados concuerdan con otros hallazgos que demuestran que los estrógenos inducen la diferenciación neuronal en CTE de ratón [129] y con resultados previos en la diferenciación dopaminérgica [134]. Reportes previos han demostrado la expresión de los receptores de estrógenos α y β en CTE de ratón [128, 134], lo cual sugiere que las CTE y los EB tienen los receptores que le permiten a las células a responder ante el 17 β -estradiol. Además, cuando se utilizó el antagonista de los receptores de estrógenos ICI 182, 720 junto con el estradiol se encontró una disminución en el número de NM a niveles similares a la condición control, indicando que el efecto observado es dependiente de los receptores de estrógenos. De manera interesante, cuando se co-incubó el 17 β -estradiol, durante el proceso de diferenciación de NM, junto con el MPP que es antagonista del ER- α , se observó una disminución en el número de NM relativo a los cultivos tratados con 17 β -estradiol solamente. En contraste, el tratamiento de estradiol con el antagonista del ER- β no causó ningún efecto sobre el incremento en la diferenciación debido al tratamiento con 17 β -estradiol. Por lo tanto, en este estudio se logró determinar que la activación del ER- α es responsable del incremento en la diferenciación de NM.

Con respecto a la contribución del 17 β -estradiol en el aumento de la expresión de los marcadores de NM, los resultados muestran incrementos significativos en los marcadores de NM Islet1 y ChAT después del tratamiento con 100 nM de 17 β -estradiol. En relación con lo anterior existe evidencia de que el 17 β -estradiol, a través de la activación de los ER, puede incrementar la expresión de los transcritos de ChAT en la línea celular híbrida (glioma de rata-neuroblastoma de ratón) NG 108-15 diferenciada con RA. De manera similar, en este trabajo se observó que el incremento en la expresión de ChAT con el tratamiento de 17 β -estradiol es revertido con el antagonista del ER, ICI 182, 720 [148]. Los hallazgos presentados en este estudio muestran que en células no transformadas el 17 β -estradiol puede incrementar la expresión del marcador de NM ChAT. Por otro lado,

existe evidencia experimental de que Islet1 y el ER se co-expresan en el hipotálamo y que esta interacción impide la unión de los estrógenos a sus elementos de respuesta en el DNA. Sin embargo, en nuestro sistema experimental Islet1 no parece interferir con los ER en la inducción de NM y puede ser probable que otro contexto celular la interacción de Islet1 y el ER pueda regular de manera diferencial la expresión de sus genes blanco.

Tomando en cuenta todos los resultados mostrados, se puede sugerir una influencia positiva de las hormonas esteroideas progesterona y 17 β -estradiol sobre la diferenciación de las NM. Por lo tanto estas hormonas pueden ser utilizadas para promover la producción de NM a partir de células pluripotentes que eventualmente podrían ser usadas en las terapias de reemplazo celular.

Conclusiones

La adición de concentraciones nanomolares de progesterona o de 17 β -estradiol causan un incremento en el número de NM, así como aumentos en la expresión de los marcadores de NM Islet1 y ChAT.

Los efectos causados por el tratamiento con progesterona fueron abatidos a niveles por debajo del control con el antagonista RU 486, sugiriendo que la progesterona es necesaria para la diferenciación de NM *in vitro*.

En este trabajo se logró identificar que el incremento en el número de NM producido por la adición de 17 β -estradiol es mediado por la activación del ER- α .

La progesterona y estradiol pueden ser usados para estimular la producción *in vitro* de NM diferenciadas a partir de CTE.

Perspectivas

Realizar análisis de microarreglos durante la diferenciación de las NM derivadas de CTE tratadas con progesterona o 17 β -estradiol para determinar qué transcritos relevantes para la diferenciación este tipo neuronal se regulan de manera positiva.

Investigar si la progesterona y el 17 β -estradiol pueden para hacer más eficiente la diferenciación *in vitro* de NM, a partir CTE e iPSC humanas.

Analizar si la progesterona y el 17 β -estradiol pueden promover otros efectos en NM derivadas de CTE, tales como el crecimiento y la ramificación axonal, ya que existe evidencia experimental de que ambas hormonas promueven estos procesos en varios tipos neuronales.

Referencias

1. Evans, M.J. and M.H. Kaufman, *Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos*. Nature, 1981. **292**(5819): p. 154-6.
2. Martin, G.R., *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.
3. Abbondanzo, S.J., I. Gadi, and C.L. Stewart, *Derivation of embryonic stem cell lines*. Methods Enzymol, 1993. **225**: p. 803-23.
4. Stewart, C.L., et al., *Blastocyst implantation depends on maternal expression of leukemia inhibitory factor*. Nature, 1992. **359**(6390): p. 76-9.
5. Pease, S., et al., *Isolation of embryonic stem (ES) cells in media supplemented with recombinant leukemia inhibitory factor (LIF)*. Dev Biol, 1990. **141**(2): p. 344-52.
6. Wobus, A.M., et al., *Characterization of a pluripotent stem cell line derived from a mouse embryo*. Exp Cell Res, 1984. **152**(1): p. 212-9.
7. Pesce, M. and H.R. Scholer, *Oct-4: control of totipotency and germline determination*. Mol Reprod Dev, 2000. **55**(4): p. 452-7.
8. Doetschman, T.C., et al., *The in vitro development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium*. J Embryol Exp Morphol, 1985. **87**: p. 27-45.
9. Palacios, R., E. Golunski, and J. Samaridis, *In vitro generation of hematopoietic stem cells from an embryonic stem cell line*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(16): p. 7530-4.
10. Wichterle, H., et al., *Directed differentiation of embryonic stem cells into motor neurons*. Cell, 2002. **110**(3): p. 385-97.
11. Jessell, T.M., *Neuronal specification in the spinal cord: inductive signals and transcriptional codes*. Nat Rev Genet, 2000. **1**(1): p. 20-9.
12. Schoenwolf, G.C., *On the morphogenesis of the early rudiments of the developing central nervous system*. Scan Electron Microsc, 1982(Pt 1): p. 289-308.
13. Lupo, G., W.A. Harris, and K.E. Lewis, *Mechanisms of ventral patterning in the vertebrate nervous system*. Nat Rev Neurosci, 2006. **7**(2): p. 103-14.
14. Lumsden, A. and R. Krumlauf, *Patterning the vertebrate neuraxis*. Science, 1996. **274**(5290): p. 1109-15.
15. Pituello, F., *Neuronal specification: generating diversity in the spinal cord*. Curr Biol, 1997. **7**(11): p. R701-4.
16. Doniach, T., *Basic FGF as an inducer of anteroposterior neural pattern*. Cell, 1995. **83**(7): p. 1067-70.
17. Muhr, J., et al., *Convergent inductive signals specify midbrain, hindbrain, and spinal cord identity in gastrula stage chick embryos*. Neuron, 1999. **23**(4): p. 689-702.
18. Niederreither, K., et al., *Embryonic retinoic acid synthesis is essential for early mouse post-implantation development*. Nat Genet, 1999. **21**(4): p. 444-8.
19. Gavalas, A. and R. Krumlauf, *Retinoid signalling and hindbrain patterning*. Curr Opin Genet Dev, 2000. **10**(4): p. 380-6.
20. Placzek, M., J. Dodd, and T.M. Jessell, *Discussion point. The case for floor plate induction by the notochord*. Curr Opin Neurobiol, 2000. **10**(1): p. 15-22.

21. Marti, E., et al., *Requirement of 19K form of Sonic hedgehog for induction of distinct ventral cell types in CNS explants*. *Nature*, 1995. **375**(6529): p. 322-5.
22. Chiang, C., et al., *Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking Sonic hedgehog gene function*. *Nature*, 1996. **383**(6599): p. 407-13.
23. Pierani, A., et al., *A sonic hedgehog-independent, retinoid-activated pathway of neurogenesis in the ventral spinal cord*. *Cell*, 1999. **97**(7): p. 903-15.
24. Ericson, J., et al., *Graded sonic hedgehog signaling and the specification of cell fate in the ventral neural tube*. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 1997. **62**: p. 451-66.
25. Briscoe, J., et al., *A homeodomain protein code specifies progenitor cell identity and neuronal fate in the ventral neural tube*. *Cell*, 2000. **101**(4): p. 435-45.
26. Tanabe, Y., C. William, and T.M. Jessell, *Specification of motor neuron identity by the MNR2 homeodomain protein*. *Cell*, 1998. **95**(1): p. 67-80.
27. Pfaff, S.L., et al., *Requirement for LIM homeobox gene *Isl1* in motor neuron generation reveals a motor neuron-dependent step in interneuron differentiation*. *Cell*, 1996. **84**(2): p. 309-20.
28. Eisen, J.S., *Determination of primary motoneuron identity in developing zebrafish embryos*. *Science*, 1991. **252**(5005): p. 569-72.
29. Appel, B., et al., *Motoneuron fate specification revealed by patterned LIM homeobox gene expression in embryonic zebrafish*. *Development*, 1995. **121**(12): p. 4117-25.
30. Hamburger, V. and H.L. Hamilton, *A series of normal stages in the development of the chick embryo*. 1951. *Dev Dyn*, 1992. **195**(4): p. 231-72.
31. Miles, G.B., et al., *Functional properties of motoneurons derived from mouse embryonic stem cells*. *J Neurosci*, 2004. **24**(36): p. 7848-58.
32. Harper, J.M., et al., *Axonal growth of embryonic stem cell-derived motoneurons in vitro and in motoneuron-injured adult rats*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. **101**(18): p. 7123-8.
33. Deshpande, D.M., et al., *Recovery from paralysis in adult rats using embryonic stem cells*. *Ann Neurol*, 2006. **60**(1): p. 32-44.
34. Lopez-Gonzalez, R., P. Kunckles, and I. Velasco, *Transient recovery in a rat model of familial amyotrophic lateral sclerosis after transplantation of motor neurons derived from mouse embryonic stem cells*. *Cell Transplant*, 2009. **18**(10): p. 1171-81.
35. Ikeda, R., et al., *Transplantation of neural cells derived from retinoic acid-treated cynomolgus monkey embryonic stem cells successfully improved motor function of hemiplegic mice with experimental brain injury*. *Neurobiol Dis*, 2005. **20**(1): p. 38-48.
36. Wada, T., et al., *Highly efficient differentiation and enrichment of spinal motor neurons derived from human and monkey embryonic stem cells*. *PLoS One*, 2009. **4**(8): p. e6722.
37. Lee, H., et al., *Directed differentiation and transplantation of human embryonic stem cell-derived motoneurons*. *Stem Cells*, 2007. **25**(8): p. 1931-9.
38. Takahashi, K. and S. Yamanaka, *Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors*. *Cell*, 2006. **126**(4): p. 663-76.
39. Takahashi, K., et al., *Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors*. *Cell*, 2007. **131**(5): p. 861-72.

40. Dimos, J.T., et al., *Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons*. Science, 2008. **321**(5893): p. 1218-21.
41. Ebert, A.D., et al., *Induced pluripotent stem cells from a spinal muscular atrophy patient*. Nature, 2009. **457**(7227): p. 277-80.
42. Karumbayaram, S., et al., *Directed differentiation of human-induced pluripotent stem cells generates active motor neurons*. Stem Cells, 2009. **27**(4): p. 806-11.
43. Edwards, D.P., *Regulation of signal transduction pathways by estrogen and progesterone*. Annu Rev Physiol, 2005. **67**: p. 335-76.
44. Baulieu, E.E., *Neurosteroids: a new function in the brain*. Biol Cell, 1991. **71**(1-2): p. 3-10.
45. Belelli, D., et al., *Neuroactive steroids and inhibitory neurotransmission: mechanisms of action and physiological relevance*. Neuroscience, 2006. **138**(3): p. 821-9.
46. Schumacher, M., et al., *Novel perspectives for progesterone in hormone replacement therapy, with special reference to the nervous system*. Endocr Rev, 2007. **28**(4): p. 387-439.
47. Mellon, S.H., L.D. Griffin, and N.A. Compagnone, *Biosynthesis and action of neurosteroids*. Brain Res Brain Res Rev, 2001. **37**(1-3): p. 3-12.
48. Ellmann, S., et al., *Estrogen and progesterone receptors: from molecular structures to clinical targets*. Cell Mol Life Sci, 2009. **66**(15): p. 2405-26.
49. Bain, D.L., et al., *Nuclear receptor structure: implications for function*. Annu Rev Physiol, 2007. **69**: p. 201-20.
50. Nilsson, S., et al., *Mechanisms of estrogen action*. Physiol Rev, 2001. **81**(4): p. 1535-65.
51. Hirata, S., et al., *Isoform/variant mRNAs for sex steroid hormone receptors in humans*. Trends Endocrinol Metab, 2003. **14**(3): p. 124-9.
52. Greene, G.L., et al., *Sequence and expression of human estrogen receptor complementary DNA*. Science, 1986. **231**(4742): p. 1150-4.
53. Gosden, J.R., P.G. Middleton, and D. Rout, *Localization of the human oestrogen receptor gene to chromosome 6q24----q27 by in situ hybridization*. Cytogenet Cell Genet, 1986. **43**(3-4): p. 218-20.
54. Lubahn, D.B., et al., *Alteration of reproductive function but not prenatal sexual development after insertional disruption of the mouse estrogen receptor gene*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(23): p. 11162-6.
55. Kuiper, G.G., et al., *Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(12): p. 5925-30.
56. Enmark, E., et al., *Human estrogen receptor beta-gene structure, chromosomal localization, and expression pattern*. J Clin Endocrinol Metab, 1997. **82**(12): p. 4258-65.
57. Kregel, J.H., et al., *Generation and reproductive phenotypes of mice lacking estrogen receptor beta*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(26): p. 15677-82.
58. Klinge, C.M., *Estrogen receptor interaction with estrogen response elements*. Nucleic Acids Res, 2001. **29**(14): p. 2905-19.
59. Hall, J.M. and D.P. McDonnell, *The estrogen receptor beta-isoform (ERbeta) of the human estrogen receptor modulates ERalpha transcriptional activity and is a key regulator of the cellular response to estrogens and antiestrogens*. Endocrinology, 1999. **140**(12): p. 5566-78.

60. Skafar, D.F. and S. Koide, *Understanding the human estrogen receptor-alpha using targeted mutagenesis*. Mol Cell Endocrinol, 2006. **246**(1-2): p. 83-90.
61. Cai, J., et al., *Generation of human induced pluripotent stem cells from umbilical cord matrix and amniotic membrane mesenchymal cells*. J Biol Chem. **285**(15): p. 11227-34.
62. Bolger, R., et al., *Rapid screening of environmental chemicals for estrogen receptor binding capacity*. Environ Health Perspect, 1998. **106**(9): p. 551-7.
63. Sherman, M.R., P.L. Corvol, and B.W. O'Malley, *Progesterone-binding components of chick oviduct. I. Preliminary characterization of cytoplasmic components*. J Biol Chem, 1970. **245**(22): p. 6085-96.
64. Lydon, J.P., et al., *Mice lacking progesterone receptor exhibit pleiotropic reproductive abnormalities*. Genes Dev, 1995. **9**(18): p. 2266-78.
65. Schneider, W., et al., *Murine progesterone receptor exists predominantly as the 83-kilodalton 'A' form*. J Steroid Biochem Mol Biol, 1991. **38**(3): p. 285-91.
66. Conneely, O.M., et al., *The chicken progesterone receptor A and B isoforms are products of an alternate translation initiation event*. J Biol Chem, 1989. **264**(24): p. 14062-4.
67. Kastner, P., et al., *Transient expression of human and chicken progesterone receptors does not support alternative translational initiation from a single mRNA as the mechanism generating two receptor isoforms*. J Biol Chem, 1990. **265**(21): p. 12163-7.
68. Shyamala, G., et al., *Impact of progesterone receptor on cell-fate decisions during mammary gland development*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(7): p. 3044-9.
69. Sartorius, C.A., et al., *A third transactivation function (AF3) of human progesterone receptors located in the unique N-terminal segment of the B-isoform*. Mol Endocrinol, 1994. **8**(10): p. 1347-60.
70. Leonhardt, S.A., V. Boonyaratankornkit, and D.P. Edwards, *Progesterone receptor transcription and non-transcription signaling mechanisms*. Steroids, 2003. **68**(10-13): p. 761-70.
71. Williams, S.P. and P.B. Sigler, *Atomic structure of progesterone complexed with its receptor*. Nature, 1998. **393**(6683): p. 392-6.
72. Tanenbaum, D.M., et al., *Crystallographic comparison of the estrogen and progesterone receptor's ligand binding domains*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(11): p. 5998-6003.
73. Bottino, M.C. and C. Lanari, *[Extra nuclear localization of steroid receptors and non genomic activation mechanisms]*. Medicina (B Aires). **70**(2): p. 173-84.
74. Weatherman, R.V., *Untangling the estrogen receptor web*. Nat Chem Biol, 2006. **2**(4): p. 175-6.
75. Szego, C.M. and J.S. Davis, *Adenosine 3',5'-monophosphate in rat uterus: acute elevation by estrogen*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1967. **58**(4): p. 1711-8.
76. Pietras, R.J. and C.M. Szego, *Specific binding sites for oestrogen at the outer surfaces of isolated endometrial cells*. Nature, 1977. **265**(5589): p. 69-72.
77. Norfleet, A.M., et al., *Estrogen receptor-alpha detected on the plasma membrane of aldehyde-fixed GH3/B6/F10 rat pituitary tumor cells by enzyme-linked immunocytochemistry*. Endocrinology, 1999. **140**(8): p. 3805-14.

78. Pappas, T.C., B. Gametchu, and C.S. Watson, *Membrane estrogen receptors identified by multiple antibody labeling and impeded-ligand binding*. FASEB J, 1995. **9**(5): p. 404-10.
79. Pedram, A., M. Razandi, and E.R. Levin, *Nature of functional estrogen receptors at the plasma membrane*. Mol Endocrinol, 2006. **20**(9): p. 1996-2009.
80. Chambliss, K.L., et al., *ERbeta has nongenomic action in caveolae*. Mol Endocrinol, 2002. **16**(5): p. 938-46.
81. Stabile, L.P., et al., *Human non-small cell lung tumors and cells derived from normal lung express both estrogen receptor alpha and beta and show biological responses to estrogen*. Cancer Res, 2002. **62**(7): p. 2141-50.
82. Razandi, M., et al., *Proximal events in signaling by plasma membrane estrogen receptors*. J Biol Chem, 2003. **278**(4): p. 2701-12.
83. Stein, R.A. and D.P. McDonnell, *Estrogen-related receptor alpha as a therapeutic target in cancer*. Endocr Relat Cancer, 2006. **13 Suppl 1**: p. S25-32.
84. Prossnitz, E.R., et al., *Estrogen signaling through the transmembrane G protein-coupled receptor GPR30*. Annu Rev Physiol, 2008. **70**: p. 165-90.
85. Thomas, P., et al., *Identity of an estrogen membrane receptor coupled to a G protein in human breast cancer cells*. Endocrinology, 2005. **146**(2): p. 624-32.
86. Selye, H., *On the Hormonal Activity of a Steroid Compound*. Science, 1941. **94**(2430): p. 94.
87. Peluso, J.J., et al., *Characterization of a putative membrane receptor for progesterone in rat granulosa cells*. Biol Reprod, 2001. **65**(1): p. 94-101.
88. Luconi, M., et al., *Identification and characterization of functional nongenomic progesterone receptors on human sperm membrane*. J Clin Endocrinol Metab, 1998. **83**(3): p. 877-85.
89. Lanari, C., et al., *[Progesterin-induced mammary adenocarcinomas in BALB/c mice. Progression from hormone-dependent to autonomous tumors]*. Medicina (B Aires), 1997. **57 Suppl 2**: p. 55-69.
90. Lanari, C., et al., *The MPA mouse breast cancer model: evidence for a role of progesterone receptors in breast cancer*. Endocr Relat Cancer, 2009. **16**(2): p. 333-50.
91. Meyer, C., et al., *Purification and partial sequencing of high-affinity progesterone-binding site(s) from porcine liver membranes*. Eur J Biochem, 1996. **239**(3): p. 726-31.
92. Selmin, O., et al., *Isolation and characterization of a novel gene induced by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in rat liver*. Carcinogenesis, 1996. **17**(12): p. 2609-15.
93. Tang, Y.T., et al., *PAQR proteins: a novel membrane receptor family defined by an ancient 7-transmembrane pass motif*. J Mol Evol, 2005. **61**(3): p. 372-80.
94. Hou, Q. and J. Gorski, *Estrogen receptor and progesterone receptor genes are expressed differentially in mouse embryos during preimplantation development*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(20): p. 9460-4.
95. Wu, T.C., L. Wang, and Y.J. Wan, *Expression of estrogen receptor gene in mouse oocyte and during embryogenesis*. Mol Reprod Dev, 1992. **33**(4): p. 407-12.
96. Kishi, Y., et al., *Estrogen promotes differentiation and survival of dopaminergic neurons derived from human neural stem cells*. J Neurosci Res, 2005. **79**(3): p. 279-86.

97. Brannvall, K., L. Korhonen, and D. Lindholm, *Estrogen-receptor-dependent regulation of neural stem cell proliferation and differentiation*. Mol Cell Neurosci, 2002. **21**(3): p. 512-20.
98. Isgor, C. and S.J. Watson, *Estrogen receptor alpha and beta mRNA expressions by proliferating and differentiating cells in the adult rat dentate gyrus and subventricular zone*. Neuroscience, 2005. **134**(3): p. 847-56.
99. Perez-Martin, M., et al., *An antagonist of estrogen receptors blocks the induction of adult neurogenesis by insulin-like growth factor-I in the dentate gyrus of adult female rat*. Eur J Neurosci, 2003. **18**(4): p. 923-30.
100. Rakotoarivelo, C., et al., *Receptors to steroid hormones and aromatase are expressed by cultured motoneurons but not by glial cells derived from rat embryo spinal cord*. Neuroendocrinology, 2004. **80**(5): p. 284-97.
101. Kibaly, C., C. Patte-Mensah, and A.G. Mensah-Nyagan, *Molecular and neurochemical evidence for the biosynthesis of dehydroepiandrosterone in the adult rat spinal cord*. J Neurochem, 2005. **93**(5): p. 1220-30.
102. Yao, M., T.V. Nguyen, and C.J. Pike, *Estrogen regulates Bcl-w and Bim expression: role in protection against beta-amyloid peptide-induced neuronal death*. J Neurosci, 2007. **27**(6): p. 1422-33.
103. Sribnick, E.A., et al., *17beta-estradiol attenuates glutamate-induced apoptosis and preserves electrophysiologic function in primary cortical neurons*. J Neurosci Res, 2004. **76**(5): p. 688-96.
104. Mor, G., et al., *Estrogen and microglia: A regulatory system that affects the brain*. J Neurobiol, 1999. **40**(4): p. 484-96.
105. Takao, T., et al., *17beta-estradiol protects oligodendrocytes from cytotoxicity induced cell death*. J Neurochem, 2004. **89**(3): p. 660-73.
106. Singer, C.A., K.L. Rogers, and D.M. Dorsa, *Modulation of Bcl-2 expression: a potential component of estrogen protection in NT2 neurons*. Neuroreport, 1998. **9**(11): p. 2565-8.
107. Razmara, A., et al., *Estrogen suppresses brain mitochondrial oxidative stress in female and male rats*. Brain Res, 2007. **1176**: p. 71-81.
108. Simpkins, J.W. and J.A. Dykens, *Mitochondrial mechanisms of estrogen neuroprotection*. Brain Res Rev, 2008. **57**(2): p. 421-30.
109. Azevedo, R.B., et al., *Regulation of antioxidant enzyme activities in male and female rat macrophages by sex steroids*. Braz J Med Biol Res, 2001. **34**(5): p. 683-7.
110. Suzuki, S., et al., *Estradiol enhances neurogenesis following ischemic stroke through estrogen receptors alpha and beta*. J Comp Neurol, 2007. **500**(6): p. 1064-75.
111. Morali, G., et al., *Post-ischemic administration of progesterone in rats exerts neuroprotective effects on the hippocampus*. Neurosci Lett, 2005. **382**(3): p. 286-90.
112. Cervantes, M., et al., *Neuroprotective effects of progesterone on damage elicited by acute global cerebral ischemia in neurons of the caudate nucleus*. Arch Med Res, 2002. **33**(1): p. 6-14.
113. Gonzalez-Vidal, M.D., et al., *Progesterone: protective effects on the cat hippocampal neuronal damage due to acute global cerebral ischemia*. Arch Med Res, 1998. **29**(2): p. 117-24.

114. Ozacmak, V.H. and H. Sayan, *The effects of 17beta estradiol, 17alpha estradiol and progesterone on oxidative stress biomarkers in ovariectomized female rat brain subjected to global cerebral ischemia*. *Physiol Res*, 2009. **58**(6): p. 909-12.
115. Aggarwal, R., et al., *Neuroprotective effect of progesterone on acute phase changes induced by partial global cerebral ischaemia in mice*. *J Pharm Pharmacol*, 2008. **60**(6): p. 731-7.
116. Atif, F., et al., *Progesterone with vitamin D affords better neuroprotection against excitotoxicity in cultured cortical neurons than progesterone alone*. *Mol Med*, 2009. **15**(9-10): p. 328-36.
117. Kaur, P., et al., *Progesterone increases brain-derived neurotrophic factor expression and protects against glutamate toxicity in a mitogen-activated protein kinase- and phosphoinositide-3 kinase-dependent manner in cerebral cortical explants*. *J Neurosci Res*, 2007. **85**(11): p. 2441-9.
118. Djebaili, M., et al., *The neurosteroids progesterone and allopregnanolone reduce cell death, gliosis, and functional deficits after traumatic brain injury in rats*. *J Neurotrauma*, 2005. **22**(1): p. 106-18.
119. Gonzalez Deniselle, M.C., et al., *Progesterone modulates brain-derived neurotrophic factor and choline acetyltransferase in degenerating Wobbler motoneurons*. *Exp Neurol*, 2007. **203**(2): p. 406-14.
120. Ibanez, C., et al., *Steroids and the reversal of age-associated changes in myelination and remyelination*. *Prog Neurobiol*, 2003. **71**(1): p. 49-56.
121. Schumacher, M., et al., *Local synthesis and dual actions of progesterone in the nervous system: neuroprotection and myelination*. *Growth Horm IGF Res*, 2004. **14 Suppl A**: p. S18-33.
122. Ghoumari, A.M., E.E. Baulieu, and M. Schumacher, *Progesterone increases oligodendroglial cell proliferation in rat cerebellar slice cultures*. *Neuroscience*, 2005. **135**(1): p. 47-58.
123. Gago, N., et al., *Progesterone and the oligodendroglial lineage: stage-dependent biosynthesis and metabolism*. *Glia*, 2001. **36**(3): p. 295-308.
124. Sauter, C.N., et al., *Differentiation of murine embryonic stem cells induces progesterone receptor gene expression*. *Exp Cell Res*, 2005. **311**(2): p. 251-64.
125. Gallego, M.J., et al., *The pregnancy hormones human chorionic gonadotropin and progesterone induce human embryonic stem cell proliferation and differentiation into neuroectodermal rosettes*. *Stem Cell Res Ther*. **1**(4): p. 28.
126. Hong, S.H., et al., *Expression of estrogen receptor-alpha and -beta, glucocorticoid receptor, and progesterone receptor genes in human embryonic stem cells and embryoid bodies*. *Mol Cells*, 2004. **18**(3): p. 320-5.
127. Shen, S.W. and H.Y. Song, *Progesterone promotes propagation and viability of mouse embryonic stem cells*. *Sheng Li Xue Bao*, 2009. **61**(5): p. 431-8.
128. Han, H.J., J.S. Heo, and Y.J. Lee, *Estradiol-17beta stimulates proliferation of mouse embryonic stem cells: involvement of MAPKs and CDKs as well as protooncogenes*. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2006. **290**(4): p. C1067-75.
129. Murashov, A.K., et al., *17beta-Estradiol enhances neuronal differentiation of mouse embryonic stem cells*. *FEBS Lett*, 2004. **569**(1-3): p. 165-8.
130. Pistritto, G., et al., *Differentiation-dependent progesterone synthesis and metabolism in NT2-N human neurons*. *Exp Neurol*, 2009. **217**(2): p. 302-11.

131. Okada, M., et al., *Estrogen Stimulates Proliferation and Differentiation of Neural Stem/Progenitor Cells through Different Signal Transduction Pathways*. Int J Mol Sci. **11**(10): p. 4114-23.
132. Martinez-Cerdeno, V., S.C. Noctor, and A.R. Kriegstein, *Estradiol stimulates progenitor cell division in the ventricular and subventricular zones of the embryonic neocortex*. Eur J Neurosci, 2006. **24**(12): p. 3475-88.
133. Wang, J.M., L. Liu, and R.D. Brinton, *Estradiol-17beta-induced human neural progenitor cell proliferation is mediated by an estrogen receptor beta-phosphorylated extracellularly regulated kinase pathway*. Endocrinology, 2008. **149**(1): p. 208-18.
134. Diaz, N.F., et al., *Estradiol promotes proliferation of dopaminergic precursors resulting in a higher proportion of dopamine neurons derived from mouse embryonic stem cells*. Int J Dev Neurosci, 2009. **27**(5): p. 493-500.
135. Tanapat, P., et al., *Estrogen stimulates a transient increase in the number of new neurons in the dentate gyrus of the adult female rat*. J Neurosci, 1999. **19**(14): p. 5792-801.
136. Liu, L., et al., *Progesterone increases rat neural progenitor cell cycle gene expression and proliferation via extracellularly regulated kinase and progesterone receptor membrane components 1 and 2*. Endocrinology, 2009. **150**(7): p. 3186-96.
137. Tetzlaff, J., L. Tanzer, and K.J. Jones, *Cellular localization of androgen and estrogen receptors in mouse-derived motoneuron hybrid cells and mouse facial motoneurons*. Dev Neurobiol, 2007. **67**(10): p. 1362-70.
138. Houser, A., et al., *Effects of estrogen on the neuromuscular system in the embryonic zebrafish (Danio rerio)*. Brain Res. **1381**: p. 106-16.
139. Meyer, M., et al., *Stage dependent effects of progesterone on motoneurons and glial cells of wobbler mouse spinal cord degeneration*. Cell Mol Neurobiol. **30**(1): p. 123-35.
140. Vongher, J.M. and C.A. Frye, *Progesterone in conjunction with estradiol has neuroprotective effects in an animal model of neurodegeneration*. Pharmacol Biochem Behav, 1999. **64**(4): p. 777-85.
141. Azizi, H., et al., *Dehydroepiandrosterone stimulates neurogenesis in mouse embryonal carcinoma cell- and human embryonic stem cell-derived neural progenitors and induces dopaminergic neurons*. Stem Cells Dev. **19**(6): p. 809-18.
142. Bukovsky, A., M.R. Caudle, and M. Svetlikova, *Steroid-mediated differentiation of neural/neuronal cells from epithelial ovarian precursors in vitro*. Cell Cycle, 2008. **7**(22): p. 3577-83.
143. Labombarda, F., et al., *Cellular basis for progesterone neuroprotection in the injured spinal cord*. J Neurotrauma, 2002. **19**(3): p. 343-55.
144. Ogata, T., et al., *Steroid hormones protect spinal cord neurons from glutamate toxicity*. Neuroscience, 1993. **55**(2): p. 445-9.
145. Gonzalez Deniselle, M.C., et al., *Progesterone neuroprotection in the Wobbler mouse, a genetic model of spinal cord motor neuron disease*. Neurobiol Dis, 2002. **11**(3): p. 457-68.
146. Diaz, N.F., et al., *Progesterone increases dopamine neurone number in differentiating mouse embryonic stem cells*. J Neuroendocrinol, 2009. **21**(8): p. 730-6.

147. Das, A., et al., *Estrogen receptor agonists and estrogen attenuate TNF-alpha-induced apoptosis in VSC4.1 motoneurons*. J Endocrinol. **208**(2): p. 171-82.
148. Yamamuro, Y. and S. Aizawa, *Asymmetric regulation by estrogen at the cholinergic gene locus in differentiated NG108-15 neuronal cells*. Life Sci. **86**(23-24): p. 839-43.

Research Communication

Progesterone and 17 β -Estradiol Increase Differentiation of Mouse Embryonic Stem Cells to Motor Neurons

Rodrigo López-González¹, Ignacio Camacho-Arroyo² and Iván Velasco¹

¹Instituto de Fisiología Celular–Neurociencias, Universidad Nacional Autónoma de México, México

²Facultad de Química, Departamento de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, México

Summary

Embryonic stem (ES) cells have the capacity to differentiate into endodermal, mesodermal, and ectodermal lineages. Motor neuron (MN) differentiation of mouse ES cells involves embryoid bodies formation with addition of Sonic hedgehog and retinoic acid. In this work, using immunocytochemistry, flow cytometry, and quantitative RT-PCR, we investigated whether progesterone or 17 β -estradiol have inductive effects on ES cell-derived MN, as it has been demonstrated that these hormones modify proliferation and neural differentiation of pluripotent cells. When 100 nM progesterone was added during differentiation, we found higher proportions of MN, compared to the control condition; coinubation of progesterone with the progesterone receptor (PR) antagonist RU-486 caused a decrease in the number of MN to a percentage even lower than controls. The addition of nanomolar concentrations of 17 β -estradiol also significantly induced MN differentiation. This effect of estradiol was completely antagonized by addition of the general estrogen receptor (ER) antagonist ICI 182,780. To identify the ER subtype mediating the increase on MN differentiation, we incubated estradiol with the ER- α antagonist MPP or with the ER- β blocker PHTPP. When we coinubated 17 β -estradiol with MPP, we found a significant decrease in the percentage of MN. In contrast, the coinubation of 17 β -estradiol with PHTPP had no effect on the induction of MN differentiation. All these effects on cell number were confirmed by significant changes in the expression of the MN markers Islet-1 and Choline acetyl transferase, assessed by real-time RT-PCR. Cell proliferation in embryoid bodies was significantly enhanced by progesterone treatment. No changes in apoptotic cell death were found in differentiating cells after progesterone or 17 β -estradiol addition. Our findings indicate that progesterone and 17 β -estradiol induce a higher proportion of MN derived from mouse ES cells

through intracellular PR and ER, respectively. Furthermore, the effect of estradiol was mediated by specific activation of ER- α . © 2011 IUBMB

IUBMB *Life*, 63(10): 930–939, 2011

Keywords embryoid bodies; progesterone receptors; estrogen receptors; motor neuron induction.

INTRODUCTION

Embryonic stem (ES) cells are derived from the inner cells mass of mammalian embryos at the blastocyst stage, and have the capacity of self-renew and generate cells of the three embryonic cellular layers (1). There is evidence that ES cells can be differentiated *in vitro* into different neuronal types (2, 3). Furthermore, it was established that mouse spinal cord motor neurons (MN) can be generated from ES cells if they are exposed to the signals that recapitulate the *in vivo* differentiation process, namely Sonic hedgehog (Shh) and retinoic acid (RA) (4). Such MN differentiated *in vitro* are functional and can produce different degrees of behavioral recovery when they are transplanted in animal models of paralysis and MN disease (5–7).

Sex steroid hormones participate in many physiological processes, including proliferation of neural precursors, neuronal differentiation or neuroprotection (8–10). Undifferentiated mouse ES cells express progesterone receptor (PR) isoforms A and B, as well as estrogen receptor (ER)- α and ER- β (11, 12). Regarding the effects of sex steroid hormones on ES cells, it has been shown that treatment with 17 β -estradiol stimulates proliferation of these cells (12). In a 5-step differentiation protocol that produces neural precursors from mouse ES cells, there is evidence that 17 β -estradiol promotes the proliferation of Lmx1a-positive dopamine neuron precursor cells (13). Progesterone induces the propagation and viability of mouse ES cells (14) and neuronal differentiation with an increase in the number of dopamine neurons derived from mouse ES cells (15). The aim of this work was to determine the effect of progesterone and 17 β -estra-

Received 26 April 2011; accepted 18 July 2011

Address correspondence to: Iván Velasco, Instituto de Fisiología Celular–Neurociencias, Universidad Nacional Autónoma de México, AP 70-253, México D.F.-04510, México. Tel: +52-55-5622-5649. Fax: +52-55-5622-5607. E-mail: ivelasco@ifc.unam.mx

diol in the differentiation of mouse ES cells to MN using the protocol of RA + Shh stimulation of embryoid bodies (EB).

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Motor Neuron Differentiation

HBG3 mouse ES cells (a kind donation from Dr. Hynek Wichterle, Columbia University) express green fluorescent protein (GFP) under the control of *hb9* promoter and are useful to monitor MN differentiation. HBG3 cells were differentiated as described in previous reports (4, 7). Briefly, these cells were expanded on mitotically inactive mouse embryonic fibroblasts, cultured with knockout Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) supplemented with nonessential amino acids, 2-mercaptoethanol, penicillin-streptomycin solution (Gibco, Carlsbad, CA), 15% ES cell-tested fetal calf serum (Wisent, St. Bruno, Canada), and 1,000 U/mL of leukemia inhibitory factor (Merck Millipore, Billerica, MA) to maintain them pluripotent. HBG3 cells were subsequently plated on gelatin-coated cell culture dishes and grown to 80% confluence whereupon they were trypsinized and seeded in suspension in bacterial plates to form EB. Such EB were cultured in ES cell medium for 2 days, and subsequently treated with 2 μ M RA (Sigma, St. Louis, MO) together with 100 ng/mL recombinant human Shh (R&D Systems, Minneapolis, MN), for four additional days. EB were dissociated using 0.2% papain/1 mM L-cysteine solution, and the resulting cell suspension was reseeded on matrigel-coated plates with differentiation medium consisting of DMEM:F12 and neurobasal medium (Gibco) supplemented with 2-mercaptoethanol, penicillin-streptomycin solution (Gibco), and 10% knockout serum replacement (Gibco) to quantify the number of GFP-positive cells under the different experimental conditions. All media contained phenol red, since we have previously demonstrated that the effects of progesterone and estradiol on ES cell-derived neural precursors were the same in the presence or absence of this dye (13, 15).

Pharmacological Treatments

To establish the effects of 17 β -estradiol or progesterone on MN differentiation of mouse ES cells, we treated EB daily, starting on the day of EB formation and therefore before addition of RA + Shh, with several concentrations (1, 10, or 100 nM) of water-soluble forms of 17 β -estradiol or progesterone (cyclodextrin-encapsulated; Sigma). Controls for these experiments were treated with 30 nM cyclodextrin, the concentration used to achieve 100 nM concentration of each hormone. To establish if the effects of progesterone or 17 β -estradiol were mediated through their intracellular receptors, we performed coin incubations of progesterone with the PR antagonist 11 β -(4-Dimethylamino)phenyl-17 β -hydroxy-17-(1-propynyl)estra-4,9-dien-3-one (RU 486) (Sigma) at 10 μ M and we also employed general ER antagonist 7 α ,17 β -[9-[(4,4,5,5,5-Pentafluoropentyl)sulfinyl]nonyl]estra-1,3,5(10)-triene-3,17-diol (ICI 182,780) at 2 μ M (Tocris, Ellisville, MO). In these conditions, controls were incubated with 0.01% ethanol and 30 nM cyclodextrin. In addition, we used

selective antagonists for ER- α 1,3-Bis(4-hydroxyphenyl)-4-methyl-5-[4-(2-piperidinylethoxy)phenol]-1H-pyrazole (MPP) dihydrochloride at 10 nM (Tocris) or for ER- β 4-[2-Phenyl-5,7-bis(trifluoromethyl)pyrazolo[1,5-a]pyrimidin-3-yl]phenol (PHTPP) at 1 μ M (Tocris, Ellisville, MO). Antagonists were dissolved in DMSO at a final concentration of 0.1%. Controls for the experiments where antagonists were added, included cyclodextrin and DMSO treatment.

Immunocytochemical Analysis

We performed immunocytochemistry on differentiated cultures as previously described (13, 16, 17). Cells were washed with phosphate-buffered saline (PBS) three times and fixed with 4% paraformaldehyde for 20 min at room temperature. Cultures were washed three times with PBS and blocked by incubation with 10% normal goat serum/0.03% Triton X-100 in PBS for 45 min. The following primary antibodies were applied at the indicated dilutions in 10% normal serum/PBS: rabbit anti-GFP antibody 1:500 (Molecular Probes, Carlsbad, CA), mouse anti- β Tubulin III antibody 1:1,000 (Covance, Princeton, NJ) and the corresponding secondary antibodies goat anti-rabbit Alexa 488 and goat anti-mouse Alexa 568 (Molecular Probes) at 1:500 each. To analyze proliferation and apoptotic cell death, we carried out immunodetection of phospho-histone H3 and cleaved caspase 3, respectively, on EB after 4 days of differentiation. Control and treated EB were fixed and cryoprotected in 30% sucrose to obtain sections of 25 μ m that were incubated with antibodies made in rabbit (Cell Signaling, Danvers, MA) against these proteins at 1:100 dilution. Although at this differentiation stage only a few GFP cells are present in the EB, we mixed the rabbit antibodies with anti-GFP monoclonal antibody (Qbiogene, Solon, OH) and used secondary antibodies as described. To label the nuclei, 5 μ M of Hoechst 32258 was used. All experiments included cultures where the primary antibodies were not added; unspecific stained was not observed in such negative controls.

Cell Counting

Quantifications of GFP-positive and β Tubulin III-positive cells were performed from pictures taken with a Nikon DMX1200F digital camera and Nikon ACT-1 imaging software (Nikon, Tokyo, Japan). Analysis of cultures were made in control and experimental conditions from 10 fields performed in duplicate by counting the number of GFP-positive neurons (i.e., the % of GFP+ cells in relation to the total number of β Tubulin III-positive neurons). To quantify the percentage of neurons, we counted the number of β Tubulin III-positive cells relative to the total number of nuclei labeled with Hoechst. Results are presented from at least three independent experiments.

Enumeration of GFP-Positive Motor Neurons by Flow Cytometry

The number of differentiated GFP⁺ MN in control and experimental conditions were determined by cytometric analysis.

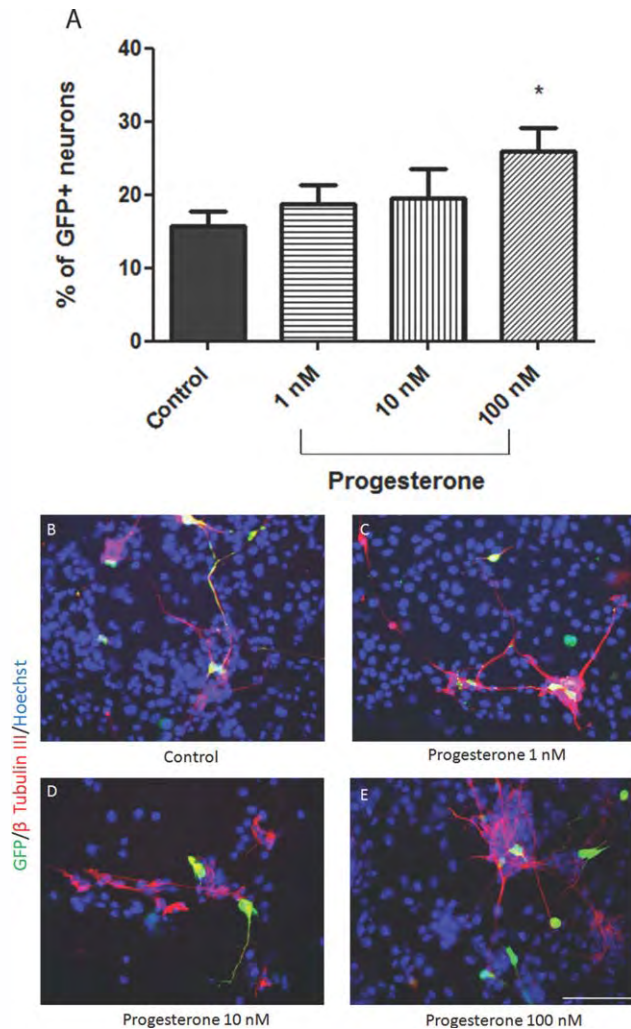


Figure 1. Progesterone induces an increase in the number of MN differentiated from ES cells. A significant increase in the proportion of GFP+ cells was found when EB were treated during the differentiation protocol with 100 nM progesterone (A). Representative immunofluorescence photographs of each condition are shown: Control (cyclodextrin, B), 1 nM (C), 10 nM (D), or 100 nM (E) progesterone. GFP labeling (green) colocalizes with β -Tubulin III (red), indicating MN differentiation. Nuclei were labeled with Hoechst 32258 and are shown in blue. Images are representative of three independent experiments. * $P < 0.05$ relative to control condition. Scale bar = 100 μ m.

EB were dissociated as described above and passed through a mesh to obtain a single cell suspension for each condition. We analyzed 10,000 events for each experimental condition, using a BD FACSARIA cytometer. Controls for these experiments included determination of GFP fluorescence in B5 ES cells, which constitutively express GFP, elimination of dead cells from the analysis after propidium iodine staining of differenti-

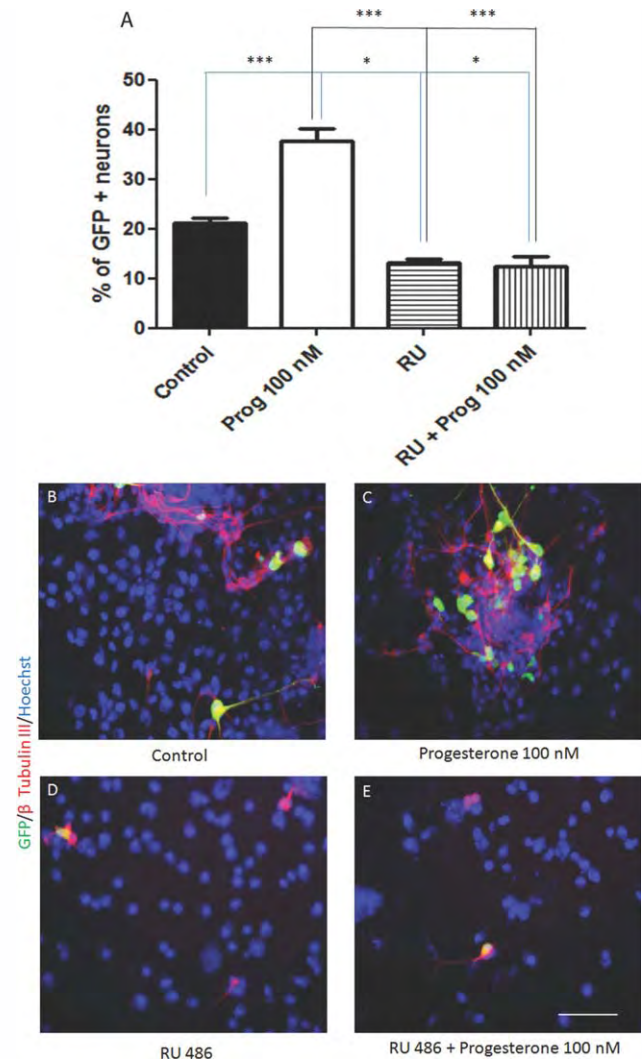


Figure 2. The progesterone receptor antagonist RU 486 reduces the increase in the MN number produced by progesterone. Treatment of EB with 100 nM progesterone during the differentiation protocol caused a significant increase in the percentage of GFP-positive MN. Incubation with 10 μ M RU 486, regardless of the presence of progesterone, decreased MN differentiation to a value below the control condition (A). Representative immunofluorescence photographs of each condition are shown: Control (ethanol + cyclodextrin, B), 100 nM progesterone (C), 10 μ M RU 486 (D), 10 μ M RU 486 + 100 nM progesterone (E). GFP labeling (green) colocalizes with β -Tubulin III (red), indicating MN differentiation. Nuclei were labeled with Hoechst 32258 and are shown in blue. Images are representative of three independent experiments. Significant differences are indicated with * $P < 0.05$ or *** $P < 0.001$. Scale bar = 100 μ m.

ated HBG3 cells, and the assurance that the measured fluorescence was due to GFP by a FL1/FL2 uncompensated analysis. The data were analyzed with Flowjo 7.5 software.

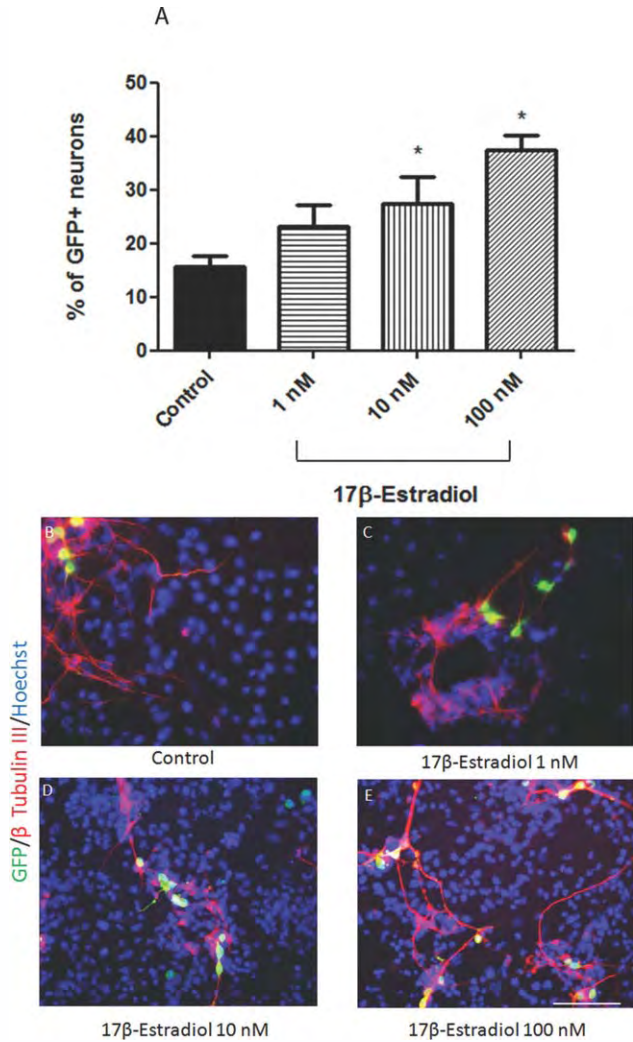


Figure 3. 17β -estradiol induces an increase in the number of MN derived from mouse ES cells. Significant increases in the proportion of GFP+ cells were found when EB were treated during the differentiation protocol with 10 or 100 nM 17β -estradiol (A). Representative immunofluorescence photographs of each condition are shown: Control (cyclodextrin, B), 1 nM (C), 10 nM (D), or 100 nM (E) 17β -estradiol. GFP labeling (green) co-localizes with β -Tubulin III (red), indicating MN differentiation. Nuclei were labeled with Hoechst 32258 and are shown in blue. Images are representative of three independent experiments. * $P < 0.05$ relative to control condition. Scale bar = 100 μ m.

Quantification of Motor Neuron Markers by Real-Time RT-PCR

Real-time RT-PCR was performed to quantify mRNA expression of β Tubulin III, Islet-1 and Choline acetyl transferase (ChAT). Total RNA was isolated from EB at day 4 (Islet-1) or at day 6 (β Tubulin III and ChAT) using Trizol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA) and after treatment with DNase I

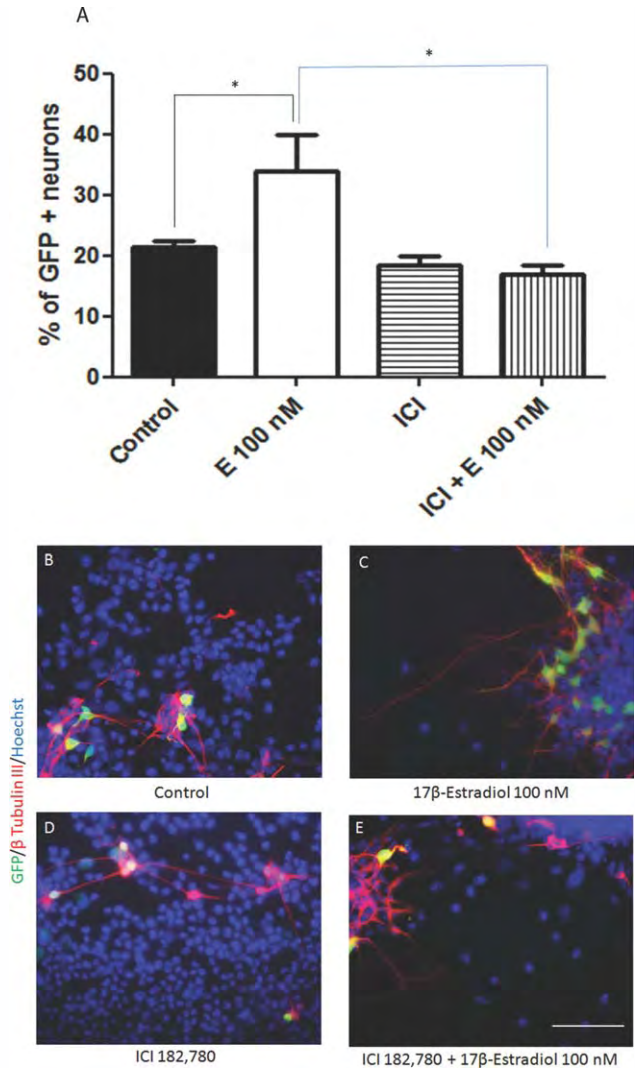


Figure 4. The ER antagonist ICI 182,780 abolishes the inductive effect of 17β -estradiol (E) on MN differentiation. The significant increase in MN number produced by the addition of 100 nM 17β -estradiol was reverted to values indistinguishable from the control condition by coincubation of 2 μ M ICI 182,780 with 100 nM 17β -estradiol, whereas ICI 182,780 alone did not modify control values (A). Representative immunofluorescence photographs of each condition are shown: Control (ethanol + cyclodextrin, B), 100 nM 17β -estradiol (C), 2 μ M ICI 182,780 (D) or ICI 182,780 + 100 nM 17β -estradiol (E). GFP labeling (green) co-localizes with β -Tubulin III (red), indicating MN differentiation. Nuclei were labeled with Hoechst 32258 and are shown in blue. Images are representative of three independent experiments. Significant differences are indicated with * $P < 0.05$. Scale bar = 100 μ m.

(Invitrogen), mRNA retrotranscription was performed using 1 μ g of total RNA with 100 U of murine Moloney Leukemia Virus retrotranscriptase (MMLV-RT, Invitrogen), 10 U of RNase

inhibitor (RNaseout, Invitrogen), 0.25 μg of random primers (Invitrogen), according to manufacturer's instructions in the recommended buffer (75 mM KCl, 3 mM MgCl_2 , 10 mM dithiothreitol, 50 mM Tris-HCl, and pH 8.3). Retrotranscription was performed for 10 min at 80 $^\circ\text{C}$, 60 min at 50 $^\circ\text{C}$, and 15 min at 75 $^\circ\text{C}$. The synthesized cDNA was used as substrate for real-time PCR with specific oligonucleotides for β Tubulin III, Islet-1 and ChAT. PCR reactions were made using 2.5 U of recombinant Taq Polymerase (Invitrogen), 0.4 mM of each oligonucleotide and dNTPs, 1.5 mM MgCl_2 , in the buffer recommended by the manufacturer (50 mM KCl, 20 mM Tris-HCl, and pH 8.4) and 5 μM

Syto 9 (Invitrogen). Quantitative analysis of cDNA amplification was performed using the rotor gene 6000 system (Corbett Life Science, San Francisco, CA). Melting curves were performed in every reaction to make sure that only one product was present. Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) amplification was used as loading control for all reactions, and therefore, every transcript value was related to GAPDH expression. The reported value was then normalized to the control condition. The sequence of the primers is as follows: GAPDH (5'-gatgggtggaacacagaga-3' and 5'-agtgatggcatggactgtgg-3'), Islet-1 (5'-accaattgtccaaccacat-3' and 5'-tcccatccctaacaagcac-3'), β Tubulin III (5'-tgaggcctctctcacaagt-3' and 5'-cgcacgacatctagga ctga-3'), and ChAT (5'-agcctgaggccatcaccttc-3' and 5'-ttggcttg ttggcctct-3').

Statistical Analysis

All data were described as mean \pm SEM. We performed ANOVA analysis followed by Newman-Keuls test to establish significant differences within groups using GraphPad Prism version 5.00 for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA). Values of $P < 0.05$ were considered significant.

RESULTS

Progesterone Induces an Increase in the Percentage of MN Derived from Mouse ES Cells Through Activation of PR

We and others have demonstrated that GFP-positive cells differentiated from HBG3 cells express molecular (β Tubulin III, Islet-1, ChAT) and functional characteristics of spinal MN (4, 7, 18). To determine the effects of progesterone on the differentiation of MN derived from ES cells, we carried out experiments in which we treated EB for 6 days with different concentrations of this hormone (1, 10, and 100 nM). We found a concentration-dependent increase in the proportion of MN, reaching significance at 100 nM (Fig. 1) relative to control conditions. The proportion of neurons (β Tubulin III-positive cells,

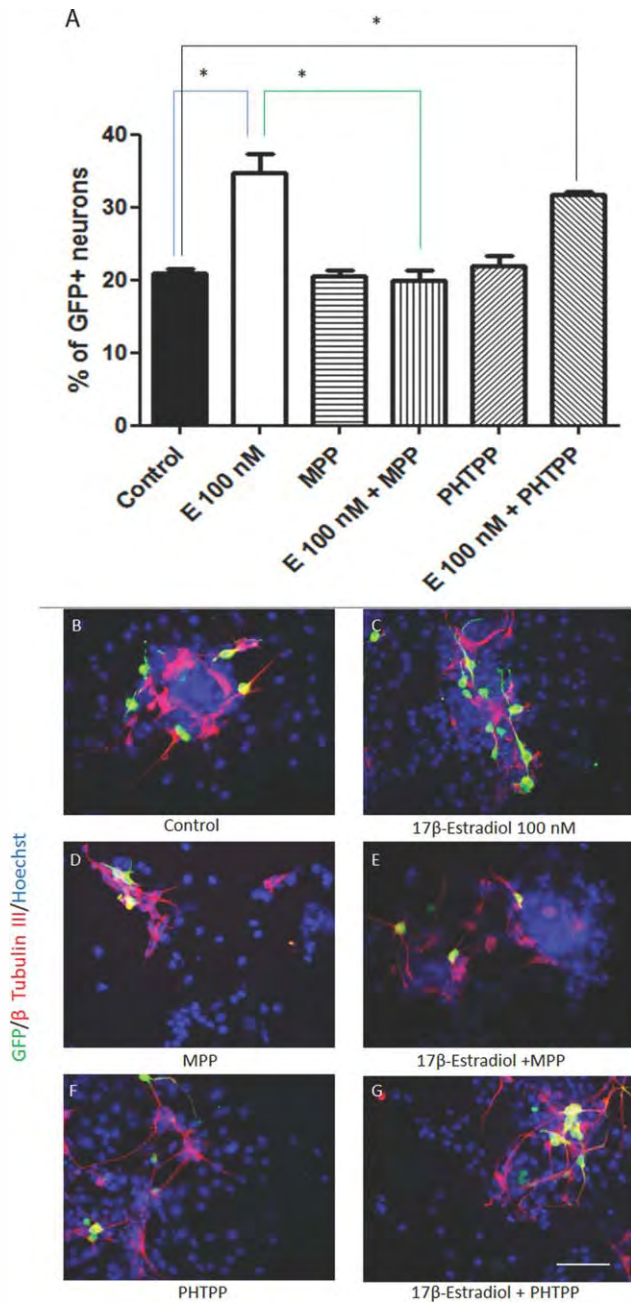


Figure 5. The ER- α antagonist MPP abolished the inductive effect of 17 β -estradiol (E) on MN differentiation. The significant increase in MN number produced by the addition of 100 nM 17 β -estradiol was reverted to values indistinguishable from the control condition by the ER- α antagonist MPP, but not by the ER- β antagonist PHTPP. The addition of each antagonists alone did not affect MN differentiation (A). Representative immunofluorescence photographs of each condition are shown: Control (DMSO + cyclodextrin, B), 100 nM 17 β -estradiol (C), 10 nM MPP (D), MPP + 100 nM 17 β -estradiol (E), 1 μM PHTPP (F), PHTPP + 100 nM 17 β -estradiol (G). GFP labeling (green) co-localizes with β -Tubulin III (red), indicating MN differentiation. Nuclei were labeled with Hoechst 32258 and are shown in blue. Images are representative of three independent experiments. Significant differences are indicated with $*P < 0.05$. Scale bar = 100 μm .

related to total number of cells) did not change after treatment with the tested concentrations of progesterone (data not shown).

To determine if this increased MN differentiation was due to activation of PR, we carried out experiments with the PR antagonist RU 486 at 10 μ M, with or without 100 nM of progesterone. We observed a significant decrease in the number of MN when we added RU 486 alone as compared with control treatment. This antagonist blocked progesterone effects, and in fact, diminished the number of MN when compared with control condition (Fig. 2).

Neuronal differentiation of control cultures was $19.7 \pm 2.0\%$ of β Tubulin III-positive cells/total nuclei number, and 100 nM progesterone did not modified this value ($22.4 \pm 2.8\%$). Inter-

estingly, RU 486 treatment induced a significant decrease in the percentage of neurons, when added either alone ($3.6 \pm 0.7\%$) or in combination with progesterone ($3.4 \pm 0.6\%$) (Fig. 2).

17 β -Estradiol Stimulates MN Differentiation of Mouse ES Cells Through Activation of ER- α

We found increases in the percentage of GFP-positive MN when HBG3 cells were differentiated in the presence of 1-100 nM 17 β -estradiol, reaching statistically significant differences with 10 and 100 nM, compared to the control condition (Fig. 3). When we treated EB with 2 μ M of the ER antagonist ICI 182,780 during the process of MN differentiation, a complete reversion of estradiol inductive effect was observed. ICI did not reduce MN differentiation when added alone (Fig. 4).

ICI is a general antagonist for ER, precluding identification of which ER subtype is mediating enhanced MN differentiation of pluripotent stem cells. For this reason, we made coinubation experiments of estradiol with the specific ER- α or ER- β antagonists MPP and PHTPP, respectively. We observed a significant decrease in the proportion of MN when 100 nM 17 β -estradiol and MPP were present, reaching a percentage similar to the control condition; in contrast, treatment with estradiol and PHTPP had no effect on the induction of MN differentiation of ES cells (Fig. 5). These results strongly suggest that the effect produced by 17 β -estradiol is mediated by ER- α .

The proportion of neurons (β Tubulin III-positive cells, related to total number of cells) did not significantly change after treatment with estradiol, alone or in combination with the antagonists used in this study (data not shown).

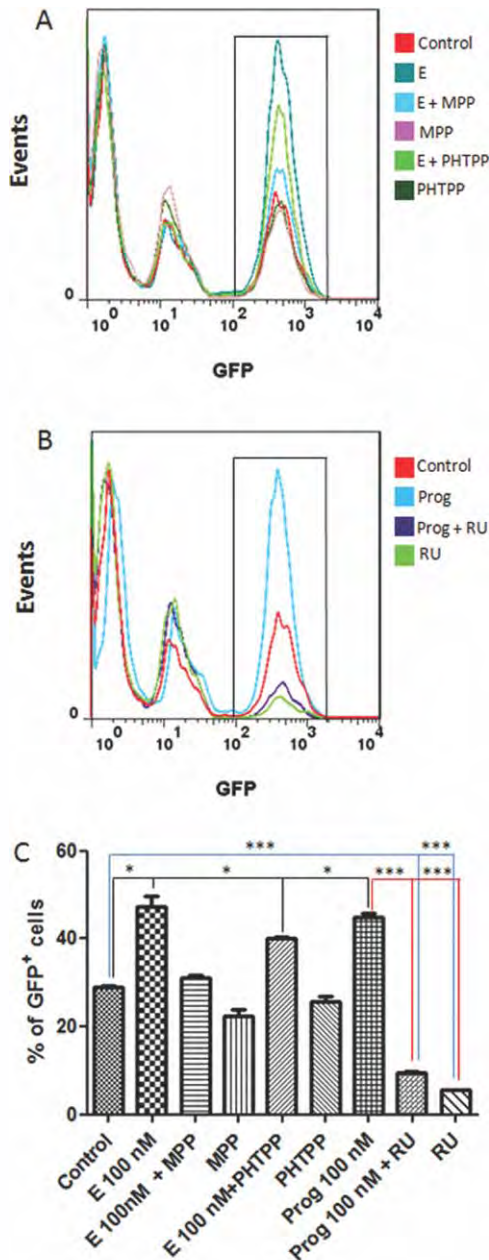
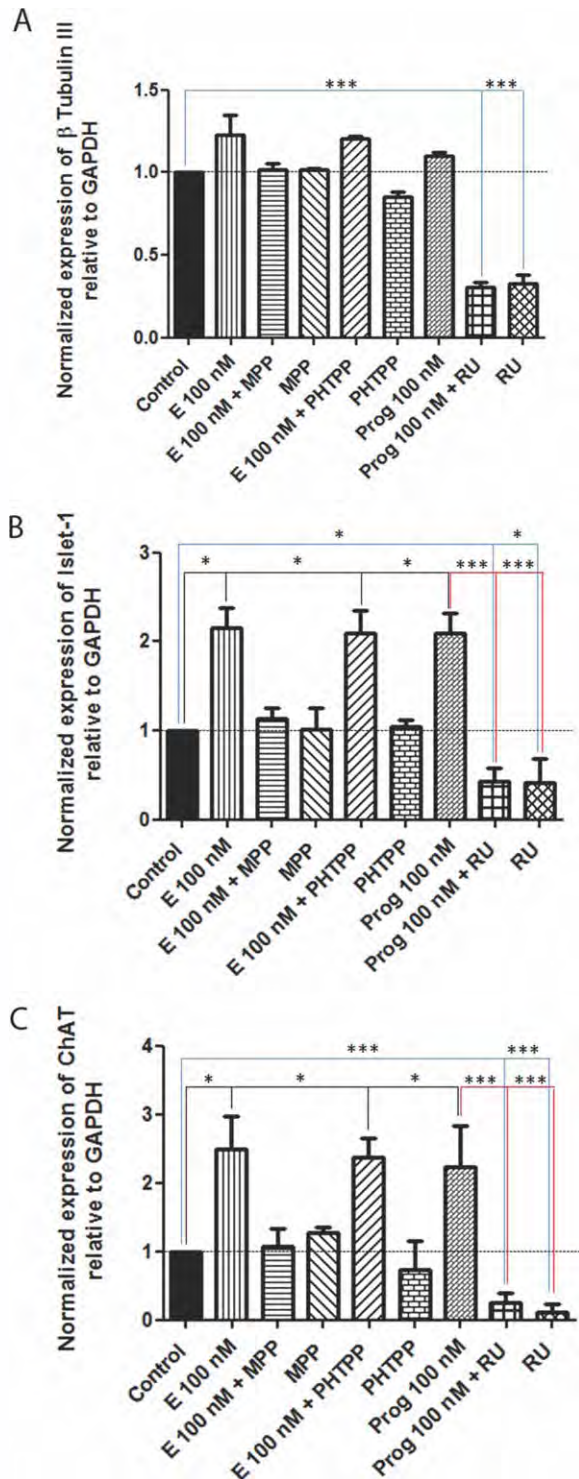


Figure 6. Enumeration of GFP-positive cells by flow cytometry show significant increments in MN differentiation after 17 β -estradiol or progesterone treatment. The antagonist MPP, but no PHTPP, significantly prevents estrogen-inducing effect and RU 486 blocked progesterone action. (A) Representative experiment showing the three different populations present in all samples. Only cells that were within the box (i.e. fluorescence value > 10²) were used for the analysis, because this population was shown to contain live cells (excluding propidium iodide) that were GFP-positive after FL1/FL2 uncompensated analysis. Estradiol (E) treatment increased the events when compared to control cells, and this effect was antagonized by addition of MPP. (B) Representative experiment to illustrate the increase in GFP-positive cells after progesterone treatment and its reversion by RU 486. Note that RU 486, either alone or added with progesterone caused a clear decrease in GFP-expressing cells relative to control. The histograms in A and B were normalized for comparison of the different conditions. (C) Frequencies of GFP-positive cells in the different conditions from four independent experiments. Although the percentages differ from the immunocytochemical determinations, the same reported effects are observed in these cytometric experiments. Significant differences are indicated with **P* < 0.05 or ****P* < 0.001.

Enumeration of GFP-Positive Cells by Flow Cytometry

The expression of GFP by differentiated MN allows the quantification of GFP-positive cells by cytometric analysis. We performed control experiments to ensure that our measurements were specific for GFP expression (see Methods). Estradiol significantly

increased the number of live GFP⁺ cells and this effect was sensitive to the addition of MPP; the ER- β antagonist PHTPP had no effect (Figs. 6A and 6C). Progesterone also enhanced MN differentiation and RU 486 prevented such increase. RU 486, in the absence of progesterone, also significantly decreased GFP numbers relative to controls (Figs. 6B and 6C).



Enhanced Expression of MN Markers after Treatment with 17 β -Estradiol or with Progesterone Assessed by Real-Time RT-PCR

To further validate the differentiation effects of both hormones, we quantified transcripts expressed by MN using real-time PCR. The levels of β Tubulin III were unchanged in most tested conditions, with exception of RU 486 addition, regardless of progesterone presence (Fig. 7A). Estradiol enhanced the expression of the MN markers Islet-1 (Fig. 7B) and ChAT (Fig. 7C). The ER- α blocker MPP completely prevented this increase, whereas PHTPP was ineffective. Progesterone significantly increased the levels of Islet-1 (Fig. 7B) and ChAT (Fig. 7C); RU 486, alone or in combination with progesterone, decreased the expression below control values.

Progesterone Induces Proliferation in Differentiating EB

As increased proportions of a particular cell type could result from either enhanced proliferation, or decreased apoptotic death of progenitors, we analyzed the presence of phosphorylated Histone H3 (pHH3) in EB after 4 days of differentiation. The pres-

Figure 7. Enhancing effect of 17 β -estradiol or progesterone on MN marker expression assessed by real-time RT-PCR. The ER- α antagonist MPP, but not the ER- β blocker PHTPP, significantly prevents estrogen-inducing effect, and RU 486 blocked progesterone action. Total RNA was isolated from differentiating EB, retrotranscribed and amplified with specific primers in the presence of Syto 9. The represented values are relative to GAPDH expression in each experiment and were normalized to the expression level in the control condition. (A) The expression level of β Tubulin III did not change after 17 β -estradiol (E) or progesterone treatment. However, RU 486 either alone or in the presence of progesterone, significantly decreased expression of this pan-neuronal marker. (B) Significant increases in the expression of Islet-1 were found after 17 β -estradiol or progesterone addition and these enhancing effects were blocked by MPP and RU 486, respectively. Note that RU486 alone significantly decreased Islet-1 levels. (C) ChAT expression was significantly increased by 17 β -estradiol and such effect was insensitive to the addition of PHTPP, but significantly antagonized by MPP. Progesterone significantly increased ChAT transcripts; RU 486 produced values below control levels, either alone or coincubated with progesterone. Results were averaged from three independent experiments. Significant differences are indicated with * $P < 0.05$ or *** $P < 0.001$.

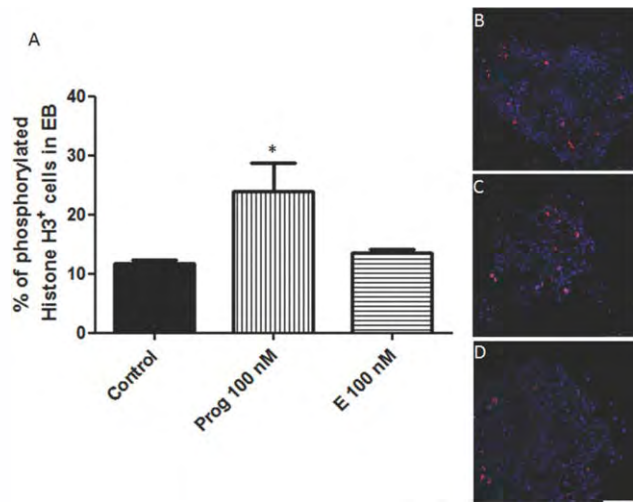


Figure 8. Progesterone increases the number of proliferating cells expressing the phosphorylated form of Histone H3 (pHH3). EB were differentiated 4 days, fixed and cryosectioned for immunostaining with anti-pHH3 (red) and anti-GFP (green). (A) Progesterone significantly increased the proportion of proliferating cells and 17β -estradiol (E) had no effect when compared to controls. (B) Control (cyclodextrin). (C) 100 nM progesterone. (D) 100 nM 17β -estradiol. At this stage, differentiated MN are not frequently observed; no GFP cells were present in these samples. Nuclei were labeled with Hoechst 32258 and are shown in blue. Images are representative of three independent experiments. Significant difference is indicated with $*P < 0.05$. Scale bar = 100 μ m.

ence of pHH3 indicates that cells are in mitosis. Progesterone, but not 17β -estradiol treatment, significantly increased the proportion of proliferating cells (Fig. 8).

Steroid Hormones did not Modify Apoptosis in Differentiating EB

Apoptotic cell death is executed by cleaved caspase 3. When we analyzed the percentage of apoptotic cells in 4-day differentiated EB, no differences were found after addition of either progesterone or 17β -estradiol (Fig. 9).

DISCUSSION

The results presented here show that the addition of nanomolar concentrations of progesterone and 17β -estradiol lead to an increase in the percentage of MN differentiated from mouse ES cells, assessed by cell counting, flow cytometry, and quantitative RT-PCR. There is evidence associated to the effects of sex steroid hormones on neuroprotection (19, 20), neurogenesis (21), neural stem cell proliferation (22, 23), and differentiation (24, 25). Regarding to the effects of progesterone on MN, it has been established that treatment with this hormone increases MN survival after axotomy and injury in rats (26). Progesterone also

protects cultured spinal neurons against glutamate toxicity (27) and has neuroprotective effects on mouse models of MN degeneration (28).

In addition, the reported effects of progesterone on ES cells include the increase in proliferation and viability of mouse ES cells (14) and the absolute requirement of progesterone in human ES cells for proper neural differentiation (29). In line with the data described above, in this study we found an increase in the number of proliferating cells in EB sections and enhanced MN differentiation when we administered 100 nM of progesterone during the MN differentiation process; these findings are in agreement with other reports that found an increase in differentiation of dopamine neurons from ES cells treated with progesterone during the proliferation of neural precursors (15), and also with the fact that addition of progesterone to human ES cells induces neurulation and an increase in the expression of the neural precursor marker nestin (29). The increase in the percentage of MN, as well as the upregulation of the MN markers Islet-1 and ChAT after progesterone treatment was reverted with the PR antagonist RU 486 to a percentage below the control condition, indicating that the observed effect is mediated by intracellular PR, and suggesting that progesterone could be needed for neural differentiation *in vitro*.

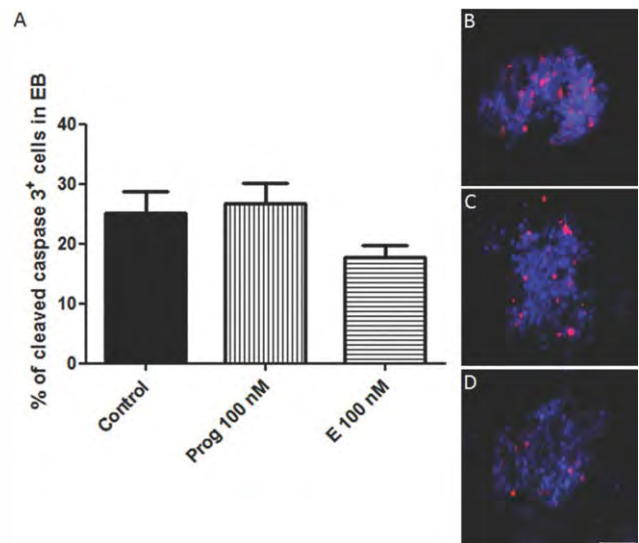


Figure 9. Neither progesterone nor 17β -estradiol modifies apoptotic death in differentiating ES cells. EB were differentiated 4 days, fixed and cryosectioned for immunostaining with anti-cleaved caspase 3 (red) and anti-GFP (green). (A) Addition of progesterone or 17β -estradiol (E) had no effect when compared to controls. (B) Control (cyclodextrin). (C) 100 nM progesterone. (D) 100 nM 17β -estradiol. At this stage, differentiated MN are not frequently observed; no GFP cells were present in these samples. Nuclei were labeled with Hoechst 32258 and are shown in blue. Images are representative of three independent experiments. Scale bar = 100 μ m.

We also found a significant decrease in the number of neurons positive to β Tubulin III after RU 486 treatment, as well as a significant reduction of β Tubulin III transcripts by quantitative PCR. These data are in agreement with results showing that treatment with this PR antagonist prevents normal columnar neuroectodermal rosette formation and also precludes nestin expression in human ES cells (29). These results, however, contrast with the fact that progesterone effects on neural precursors generated from mouse ES cells, using a five-stage differentiation protocol, were independent of PR activation (15).

Additionally, we evaluated the effect of 17β -estradiol on the differentiation of MN, because estrogens have the capacity to modulate many processes on neurons and neural stem cells. ER agonists prevents apoptosis following exposure to TNF- α in a MN cell line resulting from the fusion of rat ventral spinal cord cells with mouse neuroblastoma (30). Estrogens have the ability to stimulate proliferation and differentiation of neural stem/progenitor cells via nuclear ER (31). In this study, we found an increase on the percentage of MN derived from ES cells when we added 10 or 100 nM of 17β -estradiol during the differentiation process. This inductive effect is independent of cell proliferation and apoptotic death during differentiation of EB, because no differences were observed in estrogen-treated cells relative to control conditions, suggesting directed differentiation as the mechanism by which 17β -estradiol is enhancing MN number. Our results are in agreement with other findings that demonstrate that estrogens induce neuronal differentiation of mouse ES cells (32) and with our previous observations on dopamine neuron differentiation (13). Estradiol also enhanced proliferation of fetal neural stem cells, increasing the ratio of neurons to glial cells (33). Previous reports have shown the expression of ER- α and ER- β in mouse ES cells (11, 12). When we used the general ER antagonist ICI 182,780 together with 17β -estradiol, we found a decrease in the number of MN, reaching values similar to the control condition, indicating that the observed effect is dependent on ER activation. To establish if the observed outcome was mediated by ER- α or by ER- β , we used ER subtype-specific antagonists. Interestingly, when we made cocultures of 17β -estradiol with the ER- α antagonist MPP, during the differentiation process, we observed a significant decrease in the number of MN, assessed by immunocytochemistry and cytometry, relative to estradiol-only treated cultures. In contrast, cotreatment of estradiol with the ER- β antagonist PHTPP had no effect on MN inductive effect produced by 17β -estradiol. Thus, in this study, we were able to define that ER- α activation is responsible for the increase in MN number.

Regarding the contribution of estradiol to the expression of MN molecular markers, our results show significant increases for Islet-1 and ChAT mRNAs. In agreement, there is evidence that 17β -estradiol, through activation of ER, mediates a dose-dependent up-regulation of *choline acetyl transferase* transcription in the hybrid (mouse neuroblastoma X rat glioma) NG 108-15 cholinergic cell line stimulated to differentiate with RA; such transcriptional activation was antagonized by ICI (34). Our

findings show that in nontransformed cells, estradiol can also enhance spinal MN differentiation. Islet-1 is a LIM homeodomain transcription factor identified as one of the earliest markers for MN differentiation; however, Islet-1 is expressed in other regions of the central nervous system, and there is experimental evidence showing coexpression of ER and Islet-1 in the hypothalamic arcuate nucleus. Further, a direct interaction of Islet-1 with ER was demonstrated and Islet-1 precluded specifically interaction of activated ER with estrogen responsive elements. Such interactions indicate that Islet-1 and ER can cross-talk and could differentially regulate the expression of ER and Islet-1 target genes (35). Nevertheless, the upregulation of Islet-1 transcripts observed in EB after 4 days of differentiation does not seem to interfere with terminal differentiation of MN in our system and might reflect enhanced directed specification. Taken together the presented data show the positive influence of progesterone and 17β -estradiol on MN differentiation of mouse ES cells; such hormones can therefore be used to stimulate MN production of pluripotent stem cells aimed to cell replacement therapy studies.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grants from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Conacyt 14285 and 50715) and from Dirección General de Asuntos del Personal Académico, Universidad Nacional Autónoma de México (Papiit IN224210). R. L.-G. received a graduate fellowship from Conacyt. The technical assistance of N. Emmanuel Díaz-Martínez, Alejandro PARRALES, Martha Díaz-Hernández, Jesús Chimal-Monroy, Carlos Castellañón, Rosana Pelayo, Eduardo Vadillo, Vianney Ortiz, and the molecular biology unit of Instituto de Fisiología Celular is appreciated.

REFERENCES

1. Evans, M. J. and Kaufman, M. H. (1981) Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* **292**, 154–156.
2. Barberi, T., Klivenyi, P., Calingasan, N. Y., Lee, H., Kawamata, H., et al. (2003) Neural subtype specification of fertilization and nuclear transfer embryonic stem cells and application in parkinsonian mice. *Nat. Biotechnol.* **21**, 1200–1207.
3. Kim, J. H., Auerbach, J. M., Rodriguez-Gomez, J. A., Velasco, I., Gavin, D., et al. (2002) Dopamine neurons derived from embryonic stem cells function in an animal model of Parkinson's disease. *Nature* **418**, 50–56.
4. Wichterle, H., Lieberam, I., Porter, J. A., and Jessell, T. M. (2002) Directed differentiation of embryonic stem cells into motor neurons. *Cell* **110**, 385–397.
5. Chiba, S., Iwasaki, Y., Sekino, H., and Suzuki, N. (2003) Transplantation of motoneuron-enriched neural cells derived from mouse embryonic stem cells improves motor function of hemiplegic mice. *Cell Transplant.* **12**, 457–468.
6. Deshpande, D. M., Kim, Y. S., Martinez, T., Carmen, J., Dike, S., et al. (2006) Recovery from paralysis in adult rats using embryonic stem cells. *Ann. Neurol.* **60**, 32–44.
7. Lopez-Gonzalez, R., Kunckles, P., and Velasco, I. (2009) Transient recovery in a rat model of familial amyotrophic lateral sclerosis after

- transplantation of motor neurons derived from mouse embryonic stem cells. *Cell Transplant.* **18**, 1171–1181.
8. Callier, S., Morissette, M., Grandbois, M., Pelaprat, D., and Di Paolo, T. (2001) Neuroprotective properties of 17beta-estradiol, progesterone, and raloxifene in MPTP C57Bl/6 mice. *Synapse* **41**, 131–138.
 9. Charalampopoulos, I., Remboutsika, E., Margioris, A. N., and Gravanis, A. (2008) Neurosteroids as modulators of neurogenesis and neuronal survival. *Trends Endocrinol. Metab.* **19**, 300–307.
 10. Velasco, I. (2011) Stem cells with neurogenic potential and steroid hormones. *Curr. Top Med. Chem.* **11**, 1684–1693.
 11. Diaz, N. F., Guerra-Arraiza, C., Diaz-Martinez, N. E., Salazar, P., Molina-Hernandez, A., et al. (2007) Changes in the content of estrogen alpha and progesterone receptors during differentiation of mouse embryonic stem cells to dopamine neurons. *Brain Res. Bull.* **73**, 75–80.
 12. Han, H. J., Heo, J. S., and Lee, Y. J. (2006) Estradiol-17beta stimulates proliferation of mouse embryonic stem cells: involvement of MAPKs and CDKs as well as protooncogenes. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* **290**, C1067 – C1075.
 13. Diaz, N. F., Diaz-Martinez, N. E., Camacho-Arroyo, I., and Velasco, I. (2009) Estradiol promotes proliferation of dopaminergic precursors resulting in a higher proportion of dopamine neurons derived from mouse embryonic stem cells. *Int. J. Dev. Neurosci.* **27**, 493–500.
 14. Shen, S. W. and Song, H. Y. (2009) Progesterone promotes propagation and viability of mouse embryonic stem cells. *Sheng Li Xue Bao* **61**, 431–438.
 15. Diaz, N. F., Diaz-Martinez, N. E., Velasco, I., and Camacho-Arroyo, I. (2009) Progesterone increases dopamine neuron number in differentiating mouse embryonic stem cells. *J. Neuroendocrinol.* **21**, 730–736.
 16. Molina-Hernandez, A. and Velasco, I. (2008) Histamine induces neural stem cell proliferation and neuronal differentiation by activation of distinct histamine receptors. *J. Neurochem.* **106**, 706–717.
 17. Velasco, I., Velasco-Velazquez, M. A., Salazar, P., Lajud, N., and Tapia, R. (2003) Influence of serum-free medium on the expression of glutamate transporters and the susceptibility to glutamate toxicity in cultured cortical neurons. *J. Neurosci. Res.* **71**, 811–818.
 18. Miles, G. B., Yohn, D. C., Wichterle, H., Jessell, T. M., Rafuse, V. F., et al. (2004) Functional properties of motoneurons derived from mouse embryonic stem cells. *J. Neurosci.* **24**, 7848–7858.
 19. Meyer, M., Gonzalez Deniselle, M. C., Garay, L. I., Monachelli, G. G., Lima, A., et al. (2010) Stage dependent effects of progesterone on motoneurons and glial cells of wobbler mouse spinal cord degeneration. *Cell. Mol. Neurobiol.* **30**, 123–135.
 20. Vongher, J. M. and Frye, C. A. (1999) Progesterone in conjunction with estradiol has neuroprotective effects in an animal model of neurodegeneration. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **64**, 777–785.
 21. Azizi, H., Mehrjardi, N. Z., Shahbazi, E., Hemmesi, K., Bahmani, M. K., et al. (2010) Dehydroepiandrosterone stimulates neurogenesis in mouse embryonal carcinoma cell- and human embryonic stem cell-derived neural progenitors and induces dopaminergic neurons. *Stem Cells Dev.* **19**, 809–818.
 22. Wang, J. M., Liu, L., and Brinton, R. D. (2008) Estradiol-17beta-induced human neural progenitor cell proliferation is mediated by an estrogen receptor beta-phosphorylated extracellularly regulated kinase pathway. *Endocrinology* **149**, 208–218.
 23. Liu, L., Wang, J., Zhao, L., Nilsen, J., McClure, K., et al. (2009) Progesterone increases rat neural progenitor cell cycle gene expression and proliferation via extracellularly regulated kinase and progesterone receptor membrane components 1 and 2. *Endocrinology* **150**, 3186–3196.
 24. Bukovsky, A., Caudle, M. R., and Svetlikova, M. (2008) Steroid-mediated differentiation of neural/neuronal cells from epithelial ovarian precursors in vitro. *Cell Cycle* **7**, 3577–3583.
 25. Kishi, Y., Takahashi, J., Koyanagi, M., Morizane, A., Okamoto, Y., et al. (2005) Estrogen promotes differentiation and survival of dopaminergic neurons derived from human neural stem cells. *J. Neurosci. Res.* **79**, 279–286.
 26. Labombarda, F., Gonzalez, S. L., Gonzalez, D. M., Guennoun, R., Schumacher, M., et al. (2002) Cellular basis for progesterone neuroprotection in the injured spinal cord. *J. Neurotrauma* **19**, 343–355.
 27. Ogata, T., Nakamura, Y., Tsuji, K., Shibata, T., and Kataoka, K. (1993) Steroid hormones protect spinal cord neurons from glutamate toxicity. *Neuroscience* **55**, 445–449.
 28. Gonzalez Deniselle, M. C., Lopez-Costa, J. J., Saavedra, J. P., Pietrana, L., Gonzalez, S. L., et al. (2002) Progesterone neuroprotection in the Wobbler mouse, a genetic model of spinal cord motor neuron disease. *Neurobiol. Dis.* **11**, 457–468.
 29. Gallego, M. J., Porayette, P., Kaltcheva, M. M., Bowen, R. L., Vadakkadath Meethal, S., et al. (2010) The pregnancy hormones human chorionic gonadotropin and progesterone induce human embryonic stem cell proliferation and differentiation into neuroectodermal rosettes. *Stem Cell Res. Ther.* **1**, 28.
 30. Das, A., Smith, J. A., Gibson, C., Varma, A. K., Ray, S. K., et al. (2011) Estrogen receptor agonists and estrogen attenuate TNF-alpha-induced apoptosis in VSC4.1 motoneurons. *J. Endocrinol.* **208**, 171–182.
 31. Okada, M., Makino, A., Nakajima, M., Okuyama, S., Furukawa, S., et al. (2010) Estrogen stimulates proliferation and differentiation of neural stem/progenitor cells through different signal transduction pathways. *Int. J. Mol. Sci.* **11**, 4114–4123.
 32. Murashov, A. K., Pak, E. S., Hendricks, W. A., and Tatko, L. M. (2004) 17beta-Estradiol enhances neuronal differentiation of mouse embryonic stem cells. *FEBS Lett.* **569**, 165–168.
 33. Brannvall, K., Korhonen, L., and Lindholm, D. (2002) Estrogen-receptor-dependent regulation of neural stem cell proliferation and differentiation. *Mol. Cell. Neurosci.* **21**, 512–520.
 34. Yamamuro, Y. and Aizawa, S. (2010) Asymmetric regulation by estrogen at the cholinergic gene locus in differentiated NG108-15 neuronal cells. *Life Sci.* **86**, 839–843.
 35. Gay, F., Anglade, I., Gong, Z., and Salbert, G. (2000) The LIM/homeodomain protein Islet-1 modulates estrogen receptor functions. *Mol. Endocrinol.* **14**, 1627–1648.



ELSEVIER

Archives of Medical Research ■ (2012) ■

**Archives
of Medical
Research**

REVIEW ARTICLE

Therapeutic Potential of Motor Neurons Differentiated from Embryonic Stem Cells and Induced Pluripotent Stem Cells

Rodrigo López-González and Iván Velasco

Instituto de Fisiología Celular—Neurociencias, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F., Mexico

Received for publication October 17, 2011; accepted January 11, 2012 (ARCMED-D-11-00517).

Degeneration of motor neurons (MN) caused by disease or injury leads to paralysis and is fatal in some conditions. To date, there are no effective treatments for MN disorders; therefore, cell therapy is a promising strategy to replace lost MN. Embryonic stem (ES) cells isolated from the inner cell mass of mammalian blastocysts self-renew and are pluripotent because they differentiate into cell types of the three germinal layers. Reprogramming of adult cells to a state similar to ES cells, termed induced pluripotent stem (iPS) cells has been recently reported. It is well established that pluripotent cell types can give rise to specialized phenotypes, including neurons. Mouse, monkey and human MN can be differentiated from ES and iPS cells using procedures generally involving embryoid bodies formation and stimulation with retinoic acid and sonic hedgehog. Differentiated MN express characteristic molecular markers such as Islet1, HB9 and choline acetyltransferase, exhibit electrophysiological maturity and are able to form synaptic contacts similar to neuromuscular junctions *in vitro*. Furthermore, transplanted MNs promote functional recovery in animal models of neurodegenerative diseases and MN injury. The potential clinical applications of stem cell-derived MNs was enhanced after iPS cell derivation, which makes possible the generation of patient-specific pluripotent cells for autologous cell replacement therapies and may be used for drug development and disease modeling. This review summarizes MN differentiation protocols from ES and iPS cells in regard to neuronal differentiation efficiency, expression of MN markers and functional properties *in vitro*, as well as their therapeutic effects after grafting. © 2012 IMSS. Published by Elsevier Inc.

Key Words: Embryoid bodies, Motor neuron differentiation, Neuromuscular junction, Retinoic acid, Sonic hedgehog, Transplantation.

Introduction

Motor neurons (MN) are disseminated in brain and spinal cord (SC) and participate in motor control of movements by innervating musculature, allowing organisms to breathe and to perform voluntary actions. As the world population moves towards older ages, the prevalence of neurodegenerative disorders has increased. There are degenerative conditions that specifically affect MN such as amyotrophic lateral sclerosis (ALS), spinal muscular atrophy (SMA) and progressive muscular atrophy (PMA). To date, there is no

effective treatment for these diseases. In addition, traumatic MN injury is one of the main causes of permanent disability, mostly in young people. Because in these conditions there is loss of MN, cell replacement therapy is a possible treatment for MN degeneration and spinal cord injury.

Pluripotent stem cells can differentiate into all lineages present in the adult organism and comprise a hypothetical unlimited source in cell therapy to replace specific cell types, lost due to disease or injury. The best-studied pluripotent cells, embryonic stem (ES) cells, are isolated from the inner cell mass of mammalian embryos at blastocyst stage. These cells possess two defining features: unlimited self-renewal capacity and pluripotency because they can differentiate into cells of the three embryonic germ layers. ES cells were first derived from mouse blastocysts at 3.5 days of development by two independent research groups (1,2).

Address reprint requests to: Iván Velasco, Instituto de Fisiología Celular — Neurociencias, Universidad Nacional Autónoma de México, AP 70-253, México D.F., Mexico 04510, México; Phone: (+52) 55-5622-5649; FAX: (+52) 55-5622-5607; E-mail: ivelasco@ifc.unam.mx

Mouse ES cells have been differentiated into several neuronal phenotypes including dopaminergic neurons and spinal cord MN. Such neurons express specific molecular markers. They are electrophysiologically active and can promote behavioral recovery in animal models of neurodegenerative disorders or central nervous system (CNS) injury (3–8). Since the first report of successful isolation and propagation of human ES cells performed in 1998 by Thomson et al. (9), the therapeutic potential of human ES cells has raised high expectations. Several methodologies employed to differentiate mouse ES cells to neural phenotypes have been translated to human ES cells, and the resulting progeny has been used for drug screening and to develop experimental assays for the treatment of several illnesses. However, there are some ethical concerns about the use of human ES cells because current methods involve the destruction of frozen human embryos for their derivation. For that reason, the necessity for finding additional sources of pluripotent cells to use in regenerative medicine led to attempts to reprogram somatic cells to primitive stages. Reprogramming of nuclei to an embryonic state has been studied for several decades in works that demonstrate that somatic nuclear transfer into an enucleated oocyte can generate an adult organism in amphibians and fish (10,11). The first report of mammalian cloning was achieved by transferring a differentiated nucleus into an enucleated oocyte of a sheep (12). Some studies have shown that nuclear transfer is very inefficient in mammals and, consequently, researchers have pursued the goal of reprogramming adult cells to a pluripotent state through other methodologies. Recently, it was demonstrated that this was possible by expression of four transcription factors (initially Oct4, Sox2, c-Myc and Klf4) that can return somatic cells from mouse and human (13,14) into a pluripotent state to produce the so-called inducible pluripotent stem (iPS) cells that self-renew and differentiate into derivatives of the three germ layers similar to ES cells. These findings open new possibilities in regenerative medicine to create patient-specific pluripotent stem cells.

Both ES and iPS cells are potential sources of differentiated cells with defined characteristics that could be used for cell therapy, pharmacology screening and disease modeling because they have the capacity to differentiate into any cell of the organism including many neuronal classes such as MN. The aim of this review is to compare differentiation efficiency, molecular marker profiles and functional properties of MN derived from ES cells and iPS cells as well as to describe the results of graft them in experimental animal models of MN disease. Table 1 summarizes all these findings.

Motor Neuron Differentiation from Mouse ES Cells

The first report of MN differentiation from mouse ES cells was performed by treating embryoid bodies (EB) with 2 μ M

retinoic acid (RA) for 7 days. Neuronal differentiation was low under these conditions because only 10% of neurofilament (NFM)- and MAP2-positive neurons were generated. Only half of the differentiated neurons were positive for the MN marker Islet1 and a small proportion of Islet1+ neurons co-expressed the other widely used transcription factor that identifies MN, HB9. Gene expression analysis during EB differentiation showed an upregulation of neurotrophin receptors *TrkC* and *TrkB* as well as increases in three different neurotransmitter-synthesizing enzymes, namely, glutamic acid decarboxylase, characteristic of GABAergic neurons, tyrosine hydroxylase expressed by dopaminergic and adrenergic/noradrenergic neurons, and choline acetyltransferase (*ChAT*) of cholinergic neurons (15). Although this pioneer report of MN induction was an important finding, the low differentiation efficiency of such protocol prompted investigators to design alternative methods that produce higher MN differentiation percentages. In 2002, Wichterle et al. (16) differentiated mouse ES cells by EB formation but added RA and sonic hedgehog (SHH), two morphogens that participate during *in vivo* MN development. This resulted in improved differentiation of mouse ES cells to spinal cord MN. The authors found that RA treatment induce an upregulation of caudal CNS markers such as *Hoxc6*, *Hoxc7* and *Hoxc8*. On the other hand, co-treatment with SHH generated many cells that express homeodomain and basic helix-loop-helix (bHLH) transcription factors (*Nkx6.1* and *Olig2*, respectively) characteristic of MN. At the end of this differentiation protocol, approximately 20–30% of cells inside EB were HB9-positive neurons and co-expressed neuronal specific proteins like NeuN and Tubulin β III (identified by the TUJ1 antibody). Over 70% of HB9+ cells co-expressed Islet1, confirming MN induction. Additionally, a mouse ES cell line called HBG3 from a transgenic mouse in which the green fluorescent protein (GFP) complementary DNA was under the control of *hb9* regulatory elements was generated. The GFP+ neurons were transplanted into prospective chick spinal cord and these MN extended axons into axial musculature and arguably form synapses because they express markers of synaptic specialization, namely, synaptobrevin, synaptotagmin and the vesicular acetylcholine transporter (VACHT). This was the first demonstration of efficient differentiation, molecular characterization and functional integration of transplanted MN derived from mouse ES cells (16).

To further characterize the electrophysiological properties of MN, Miles et al. (17) investigated if the expression of markers in ES cell-derived MN is accompanied by distinctive MN electrophysiological properties. They showed that GFP-positive MN derived from HBG3 cells treated with RA and SHH *in vitro* develop similar functional properties to embryo-derived MN. Differentiated MN express functional receptors for excitatory and inhibitory transmitters that normally provide inputs to MN

develop properties necessary to produce appropriate patterns of action potential firing and form functional cholinergic synapses when co-cultured with C2C12 muscle cells differentiated to form myotubes. Interestingly, some reports have analyzed the identity of MN derived from ES cells differentiated with RA and SHH agonist Hh Ag1.3 and established that 96% of GFP+/HB9+ neurons express Lhx3, indicating that this treatment generates mainly medial motor column (MMC) identity (18). Similar results were found differentiating MN with RA and SHH producing cells (19). Transplantation of differentiated EB in the chick neural tube caused migration of MN to the MMC and not to the lateral motor column. Grafted cells projected axons dorsally and correctly innervated target muscles, expressing axon guidance molecules appropriate for MMC phenotype as well as proteins required for synaptic formation. Therefore, transplanted MN responded to chemotropic signals from surrounding muscle. Additionally, the derived MN developed electrophysiological properties resembling MMC neurons (18).

In vitro neuronal differentiation of ES cells has been used as a cellular model to study degenerative diseases where MN are affected, in particular SMA. The majority of SMA cases are related to recessive mutations of the survival motor neuron (*smn*) 1 gene, whereas the *smn2* loss-of-function does not cause SMA, although both genes encode the same SMN protein (20–22). SMN protein has been shown to play a crucial role in the assembly of small nuclear ribonucleoprotein (snRNP) complexes (23,24). Reduced levels of SMN in SMA patients and animal models result in selective death of MN, indicating that SMN plays a critical role in this neuronal type. In mice, there is only one copy of *Smn*, and its knockout causes early embryonic lethality; however, the transgenic expression of two copies of the human SMN2 gene (*SMN2^{+/+}Smn^{-/-}*) avoids embryonic lethality and results in a murine model that closely mimics human type I SMA (25). The pups with this genotype appear normal at birth, but at postnatal day 2 develop SMA-like symptoms including reduced suckling, decreased movement, and labored breathing and eventually die at 6–7 days of age. The short lifespan in this SMA model prohibits its use for mechanistic studies or drug development for SMA treatment. ES cells generated from (*SMN2^{+/+}Smn^{-/-}*) mice do not differ morphologically from control ES cells. Furthermore, *in vitro* MN differentiation of SMA-ES cells treated with 1 μ M RA and 1 μ M SAG (a chlorobenzothiophene-containing hedgehog agonist that binds and activates the membrane protein smoothed, allowing the activation of SHH pathway) produced 25% of differentiated MN with similar protein levels of neurofilament, ChAT and HB9 to normal ES cells. However, SMA-ES cells present a marked reduction of SMN protein and an increase in lactate dehydrogenase in both undifferentiated and differentiated cells, indicating increased metabolic activity in SMN-deficient cells. A proteomic study

indicates that the reduction in levels of SMN result in increased expression of stress-response pathways, which might be deleterious to MN and explain its degeneration in this animal SMA model (26).

Modulators of MN Differentiation from Pluripotent Mouse Cells

One important issue in differentiation of pluripotent cells is directed differentiation to the desired phenotype. In order to achieve higher MN differentiation percentages, several strategies have been tested: MN induction can be enhanced with the addition of conditioned medium from cultures of 8-day-old chick embryo dorsal root ganglion (DRG) neurons; the population of MN was composed of 40–60% of HB9+ and Lim3+ neurons, suggesting that DGR-conditioned media secretes signaling molecules that facilitates MN differentiation (27). Similar results were obtained with MN differentiation of mouse iPS cells due to the fact that DRG-conditioned media induce the differentiation of Lim3+ MN and sensory neurons positive for Brn3 (28). Differentiation of MN from mouse ES cells was improved in the presence of the phenylflavonoid icaritin: EB treated with icaritin and RA produced a high MN proportion of neurons (52%) compared to control conditions (12%). Such enhanced proportion correlated well with expression of tubulin β III and ChAT as compared to RA-only treated EB after immunoblot analysis (29). Other signaling pathways can be modified to enhance MN differentiation of mouse ES cells. It has been demonstrated that HBG3 and SMA-ES cells pre-treated with Noggin (a bone morphogenic protein antagonist) and fibroblast growth factors 2 and 8, before RA and SAG addition, induces an increase from 25–51% of differentiated MN, assessed by the expression MN-specific markers such as Islet, HB9 and ChAT (26).

On the other hand, it has been established that steroid hormones exert several effects on neural cells including progenitor proliferation, neuronal differentiation and neuroprotection. We recently analyzed the effect of progesterone and 17 β -estradiol on MN differentiation of mouse HBG3 ES cells. Progesterone treatment during MN differentiation at EB stage, combined with RA and SHH, induces higher proportions of MN compared to RA/SHH alone. Interestingly, co-incubation of EB with the progesterone receptor antagonist RU-486 caused a significant decrease in the number of both differentiated neurons and in MN percentages to values even lower than controls, regardless of the presence of progesterone. 17 β -Estradiol treatment also significantly induced MN differentiation. This effect was completely antagonized by co-incubation with the estrogen receptor (ER) α antagonist MPP. In contrast, co-incubation of 17 β -estradiol with the ER β antagonist PHTPP had no effect on MN differentiation. These inductive effects on the proportion of GFP+ MN number were confirmed by GFP enumeration by flow cytometry and also by significant

Table 1. Functional and phenotypic characteristics of MN derived from ES and iPS cells

Reference	Initial source for MN derivation	Method to induce MN differentiation	Expression of neural and neuronal markers	Expression of MN markers	Neuronal differentiation efficiency	MN differentiation efficiency	Functional properties of differentiated MN
Renoncourt et al., 1998 (15)	Mouse ES cells, CCE line	EB treated with RA	Nestin, MAP2, NFM, GAD, TH and Pax6	Islet1, HB9, ChAT and VACHT	10% of NFM +neurons in EB	40–60% of islet1+ neurons;12% of Islet1+ were HB9+	ND
Wichterle et al., 2002 (16)	Mouse ES cells, HBG3 line	EB treated with RA and SHH agonist	Sox2, Pax6, tubulin β III, MAP2, NeuN, NFM, synaptobrevin, synaptotagmin	Hoxc6, Hoxc7, Hoxc8, Nkx6.1, Olig2, Lhx3, Lim1, Islet1, VACHT, ChAT	70% of total cells were NeuN+ and Tubulin β III+	20–30% of neurons were HB9+; 70% of HB9+ neurons co-expressed Islet1	Grafted MN integrate in chick neural tube and extended axons towards muscle
Miles et al., 2004 (17)	Mouse ES cells, HBG3 line	EB treated with RA and SHH agonist	MAP2	VACHT, ChAT	ND	95% of GFP+ neurons expressChAT	Express receptors for excitatory and inhibitory neurotransmitters, produce action potentials, and form synapses with muscle cells in culture
Soundararajan et al., 2006 (18)	Mouse ES cells, HBG3 line	EB treated with RA and SHH agonist	Tubulin β III	Lhx3	ND	96% of GFP+ neurons express Lhx3	Grafted MN establish MMC identity and send axons to MMC in chick embryos
Deshpande et al., 2006 (8)	Mouse ES cells, HBG3 line	EB treated with RA and SHH agonist	NFM	Lhx3, HB9	50–60% of tubulin β III+ after transplantation	35–40% of ChAT+ after transplantation	Transplanted MN induce recovery in paralyzed rats after MN depletion
López-González et al., 2009 (35)	Mouse ES cells, HBG3 line	EB treated with RA and recombinant SHH	Tubulin β III	Islet1, ChAT	ND	15–20 % of neurons were GFP+MN	Grafted MN promote transient motor recovery in a rat model of familial ALS
Chiba et al., 2003 (31)	Mouse ES cells, E14.1line	EB treated with RA	Nestin, Mash1, NeuroD, NCAM, NFM, tubulin β III	Islet1, HB9	50% from total were tubulin β III neurons	Some neurons co-express Islet1	MN integrate into mouse motor cortex migrate and caused motor improvement
Ikeda et al., 2005 (37)	Cynomolgus monkey ES cells, line CMK 6.4-6	EB treated with RA	MAP2, NFM,NCAM	Islet1	64% NFM + neurons from total cells	50% of neurons were Islet1+	MN integrate in mouse motor cortex, migrate and caused motor improvement
Hamada et al., 2006 (32)	Mouse ES cells, E14.1 line transfected with MASH 1	EB treated with RA	Nestin, tubulin β III, NCAM	Islet1, Lim 1/2, HB9	62% tubulin β III+ neurons from total cells	50% of MASH1 transfected cells were Islet1+ neurons	Mice with SCI showed improved motor function and structural regeneration of neuronal pathways after MN transplantation
Singh Roy et al., 2005 (38)	Human ES cells, H1 line	EB treated with RA and SHH	Tubulin β III	Islet1, HB9, ChAT	35% of cells were tubulin β III+	37% of tubulin β III cells were HB9+	MN presented action potentials and established synapses with co-cultured skeletal myoblasts
Erceg et al., 2010 (39)	Human ES cells, H9-GFP line	Neural rosettes derived from EB treated with RA, SHH and cAMP	Tubulin β III	Hoxc5, Hoxc8, Nkx2.2, Nkx6.1, Irx3, Olig2, Islet1	20% of total were tubulin β III+	30% of tubulin β III neurons were HB9+	Transplanted MN showed electrophysiological activity <i>in vivo</i> and improved locomotor function in rats with complete spinal transection

400
401
402
403
404
405
406
407
408
409
410
411
412
413
414
415
416
417
418
419
420
421
422
423
424
425
426
427
428
429
430
431
432
433
434
435
436
437
438
439
440
441
442
443
444
445
446
447
448
449
450
451
452
453
454345
346
347
348
349
350
351
352
353
354
355
356
357
358
359
360
361
362
363
364
365
366
367
368
369
370
371
372
373
374
375
376
377
378
379
380
381
382
383
384
385
386
387
388
389
390
391
392
393
394
395
396
397
398
399

455								
456								
457								
458								
459								
460								
461								
462								
463								
464								
465								
466								
467								
468								
469								
470								
471								
472								
473								
474								
475								
476								
477								
478								
479								
480								
481								
482								
483								
484								
485								
486								
487								
488								
489								
490								
491								
492								
493								
494								
495								
496								
497								
498								
499								
500								
501								
502								
503								
504								
505								
506								
507								
508								
509								
	Wu et al., 2011 (26)	Mouse ES cells from a SMA animal model	EB treated with Noggin, RA and SHH agonist	NFM	Islet 1, HB9 and ChAT	ND	40–50% of MN	ND
	Dimos et al., 2008 (45)	Human iPS cells from ALSpatient	EB treated with RA and SHH	Pax6, tubulin β III	Olig2, Islet1, HB9, ChAT	ND	20% of tubulin β III+ neurons were HB9+; 90% of HB9+ neurons were Islet1/2+	ND
	Ebert et al., 2009 (47)	Human iPS cells from SMA patients (clones 3.6 and 4.2)	Floating iPS cell spheres were dissociated and treated with RA, SHH,GDNF and BDNF	Nestin, tubulin β III, synapsin	Hoxb4, Olig2, Islet1, HB9, ChAT, SMI32	ND	12% of tubulin β III+/ChAT+ cells from total	ND
	Karumbayaran et al., 2009 (41)	Human iPS cells, line hiPS2	EB treated with RA and SHH agonist; neural rosettes from adherent cultures treated with RA, SHH, GDNF, BDNF and CNTF	Nestin, Brn2, Sox3, Pax6, Tubulin β III	Nkx6.1, Olig2, Islet1, Hoxa5, ChAT	ND	Sox3-positive cells that express Olig 2 were 57%; 33% of Islet1+ cells	MN were electro- physiologically active as assessed by repetitive firing of actions potentials in response to current injection
	Zeng et al., 2010 (42)	Human ES cells, H9 line, human iPS cells, TZ1 line (from lentiviral vectors) and YZ1 line (from retroviral vectors)	Neural rosettes treated with RA and SHH, in medium supplemented with N2 and B27, together with BDNF, GDNF and IGF	Tubulin β III, Synapsin	Hoxb4, HB9	ND	20% of HB9+ cells in H9, TZ1 and YZ1lines	Differentiated MN were electrophysio-logically active assessed by expression of ion channels and action potentials
	Cai et al., 2010 (43)	Human iPSC from placental amniotic membrane and umbilical cord matrix cells	EB-derived neural rosettes. Treated with RA and SHH	Nestin, Tubulin β III	ChAT, HB9	ND	ND	Differentiated MN produced action potentials

ALS, amyotrophic lateral sclerosis; ChAT, choline acetyl transferase; EB, embryoid bodies; ES, embryonic stem; iPS, inducible pluripotent stem; MMC, medial motor column; MN, motor neurons; NCAM, neural cell adhesion molecule; NFM, neurofilament; ND, not determined; RA, retinoic acid; SCI, spinal cord injury; SHH, sonic hedgehog; SMA, spinal muscular atrophy; VAcChT, vesicular acetyl choline transporter.

510
511
512
513
514
515
516
517
518
519
520
521
522
523
524
525
526
527
528
529
530
531
532
533
534
535
536
537
538
539
540
541
542
543
544
545
546
547
548
549
550
551
552
553
554
555
556
557
558
559
560
561
562
563
564

565 increases in the expression of the MN markers Islet1 and
566 ChAT, assessed by real-time RT-PCR (30). Our findings
567 indicate that progesterone and 17 β -estradiol induce a higher
568 proportion of MN derived from mouse ES cells and there-
569 fore these hormones can be used to potentiate MN differen-
570 tiation *in vitro*.

571 572 *Transplantation of MN Differentiated from Mouse ES* 573 *Cells in Rodents* 574

575 Once MN derived from mouse ES cells were characterized,
576 some reports showed that such MN have the capacity to
577 induce recovery in animal models of neuron injury. Differ-
578 entiated MN resulting from 1 μ M RA treatment of EB
579 promote functional recovery when transplanted in the motor
580 cortex of mice damaged by cryogenic injury. Grafted MN
581 migrated in the cortex and extended their axons. Differen-
582 tated cells comprise characteristics of cranial MN because
583 tubulin β III neurons co-express Islet1, but not Lim tran-
584 scription factors (31). Transfection of the *mash1* gene into
585 mouse ES cells induces a higher proportion of tubulin
586 β III neurons that express HB9, Islet1 and Lim 1/2, indi-
587 cating MN differentiation. Transplantation of these neurons
588 into a spinal cord injury (SCI) model in mice demonstrated
589 significant improvements of the electrophysiological and
590 motor assessments in addition to a structural regeneration
591 of neuronal pathways. Transplanted cells showed extensive
592 outgrowth of axons evidenced by neurofilament middle
593 chain staining and synaptophysin presence (32).

594 Neurospheres derived from mouse ES cells treated with
595 low concentrations of RA and 300 ng/ml SHH produce
596 neural precursor cells with ventral spinal cord character-
597 istics expressing mainly Nkx6.1. After differentiation, these
598 cells express HB9 and Islet1/2 transcription factors.
599 Neurosphere-derived neurons exhibit action potentials
600 *in vivo* and form synaptic contacts with host neurons when
601 they are transplanted in wild-type (WT) rats (33). Trans-
602 planted MN derived from ES cells formed functional
603 synapses with denervated host muscle, which resulted in
604 the ability to produce motor units between MN and muscle.
605 After receiving MN, muscle atrophy associated with denner-
606 vation of sciatic nerve was significantly reduced in recipient
607 animals. These results demonstrate the capacity for ES cell-
608 derived MN not only to incorporate into the adult host CNS,
609 but also to exert changes on peripheral tissue. Differentiated
610 MN give rise to functional motor units, which resembles the
611 formation of endogenous MN during development (34).

612 Perhaps the best example of functional recovery exerted
613 by transplanted MN derived from mouse ES cells was
614 described by Desphande et al. (8): they transplanted MN
615 differentiated from ES cells into the spinal cord of animals
616 paralyzed after MN depletion caused by Sindbis virus infec-
617 tion. Using a combination of MN graft with dibutyril cyclic
618 AMP and rolipram administration (to inhibit myelin-
619 mediated repulsion of axon outgrowth) together with

620 transplantation of neural progenitors cells that secrete
621 GDNF into the sciatic nerve to promote axonal growth
622 towards muscle, they observed that MN axons extended
623 outside the spinal cord to innervate muscles, inducing
624 a long-lasting recovery in motor function 6 months after
625 grafting.

626 The therapeutic potential of MN derived from ES cells
627 was examined by our group in a rat model of familial
628 ALS. We grafted MN into the lumbar spinal cord of rats
629 that overexpress a mutated form of human superoxide dis-
630 mutase (hSOD1^{G93A}) at a pre-symptomatic stage. Grafted
631 cells with MN phenotype assessed by tubulin β III, Islet1
632 and ChAT expression caused improvement in rotarod
633 competence when compared to sham SOD1^{G93A} transgenic
634 rats. However, in the following weeks, transplanted
635 SOD1^{G93A} rats showed motor deterioration and eventually
636 developed paralysis. At the end stage of transgenic animals,
637 we found only a few endogenous MN in sham or grafted
638 SOD1^{G93A} rats. No transplanted MN were present in
639 grafted transgenic subjects at this time point. In contrast,
640 WT rats analyzed at the same age possessed grafted GFP-
641 positive MN in their spinal cords, suggesting that the trans-
642 genic SOD1^{G93A} environment is detrimental to grafted MN
643 in the long term (35). These results, although encouraging,
644 make evident the necessity to use complementary strategies
645 to treat neurodegenerative disorders.

646 647 *Differentiation and Grafting of Motor Neurons Produced* 648 *by Monkey and Human ES Cells* 649

650 MN differentiation protocols for mouse ES cells were adapt-
651 ed to induce MN commitment of nonhuman primates and
652 human ES cells. Mizuseki et al. (36) differentiated MN by
653 culturing cynomolgus monkey (CM) ES cells on PA6
654 stromal cells in addition to SHH stimulation. They found
655 that 26% of tubulin β III-positive neurons and a high propor-
656 tion of such neurons co-expressed Islet1/2, indicative of MN
657 commitment. MN differentiation was also achieved by treat-
658 ing EB of the monkey ES cell line CMK 6.4–6 with RA.
659 The resulting population was composed mostly of neural
660 cells that express nestin or tubulin β III, and after terminal
661 differentiation expressed MAP2 and neurofilament. Interest-
662 ingly, 50% of neurons were Islet1-positive. Differentiated
663 neurons were grafted into mouse-injured motor cortex.
664 Some of the transplanted cells expressed markers character-
665 istic of mature MN, such as Islet1 and synaptophysin, 28
666 days after transplantation. Grafted mice gradually recovered
667 motor function, whereas control animals remained hemi-
668 plegic; therefore, neural cells derived from nonhuman
669 primate ES cells have the ability to restore motor function
670 in an animal model of brain injury (37).

671 MN differentiation from human ES cells has been
672 successfully carried out. Singh Roy et al. (38) differentiated
673 the H1 human ES cell line to MN through EB formation. To
674 identify differentiated MN, they transfected this ES cells

with a plasmid encoding GFP placed under the regulatory region of the transcription factor *hb9*. Because MN were induced under the influence of SHH and RA, Hb9-driven GFP expression was detected. Immunocytochemical analysis revealed tubulin β III-positive neurons that co-express Islet1, HB9, and ChAT. Generated MN reached functional maturation *in vitro*, as evidenced by their fast sodium currents and action potentials on whole cell patch-clamp analysis, together with the identification of clustered acetylcholine receptors by α -bungarotoxin binding on co-cultures with skeletal myoblasts. MN derived from human ES cells that constitutively express GFP (H9-GFP) can also be produced. H9-GFP EB treated with 0.1 μ M RA, 200 ng/ml SHH and 1 μ M cAMP generate Hoxc5-, Hoxc8-, Nkx2.2-, Nkx6.1-, Irx3-, Pax7- and Olig2-expressing neural progenitors that resulted in TUJ1-positive neurons that co-express Islet1 and HB9 after differentiation. When differentiated MN were transplanted into rats with complete spinal cord transection, they survived for at least 4 months, migrated away from the lesion and showed electrophysiological activity *in vivo* without forming teratomas and improving motor function (39).

A comparative analysis of differentiated MN from human ES cells and CM ES cells showed that neural precursor derived from these ES cells form neural rosettes positive for the neural precursor markers Nestin and Sox1. Neural precursors derived from human ES cells and monkey ES cells induced to MN differentiation with 1 μ M RA and 500 ng/ml SHH treatment, produced large numbers of tubulin β III+, HB9+, Islet1+, ChAT+ neurons, together with a transcriptional upregulation of MN markers such as *hb9*, *islet* and *olig2*. Terminally differentiated neurons were synapsin-positive and electrophysiological active, assessed by repetitive firing of actions potentials after electrical stimulation. MN were capable of forming neuromuscular junction by culturing them with C2C12 myotubule cells (40). These results indicate that monkey and human ES cells can differentiate into MN that express specific molecular markers and have functional properties similar to MN derived from mouse ES cells.

Motor Neuron Differentiation of iPS Cells

Two established protocols for MN differentiation can produce functional mature MN from human iPS cells and human ES cells with similar efficiency and electrophysiological properties. EB generated from iPS and ES cells were treated for 1 week with 1 μ M RA. The proportion of cells expressing the neural progenitor markers Brn2, Sox3 and Pax6 was similar between EB derived from ES and iPS cells. EB treated for another week with RA and SHH agonist purmorphamine expressed Sox3 and the MN progenitor markers Nkx6.1 and Olig2 in both cases. In both lines, differentiated EB were positive for Islet1 and tubulin β III. On the other hand, a differentiation method that

utilizes adherent cultures by forming neural rosettes that were treated with RA, SHH and supplemented with GDNF, BDNF and CNTF produced similar percentages of Islet-positive cells from human ES cells and iPS cells. Differentiated MN under such conditions were electrophysiological active because they presented repetitive firing of action potentials in response to current injection (41).

MN differentiation potential of human iPS cell lines developed with distinct viral vectors has also been compared. Human iPS cell line TZ1, generated with lentiviral vectors, YZ1 cell line generated using retroviral vectors and the ES cell line H9 were differentiated by treating neural tube-like rosettes with RA and SHH in medium supplemented with N2, B27, BDNF, GDNF and IGF. Neural cells from the three cell lines showed increased expression of Sox1, Pax6 and Hoxb4. Interestingly, heterogeneity in the expression and the initial time of expression of neural markers between these tested became evident. The differentiation protocol produces an average of 20% of HB9+ cells in H9, TZ1 and YZ1 lines after 6–8 weeks of culture. Electrophysiological properties of neurons were similar between MN derived from iPS cells and ES cells in terms of their capacity to fire action potentials in response to depolarizing current pulses (42).

One of the key advantages of reprogramming adult cells to a pluripotent state is histocompatibility, especially in humans. In addition to skin fibroblasts, other cellular sources could be useful to generate iPS cells with low immunogenicity and earlier developmental origin. Mesenchymal cells from umbilical cord matrix and from placental amniotic membrane have been reprogrammed with retroviruses encoding *oct4*, *sox2*, *nanog*, *c-myc*, after valproic acid treatment to increase the efficiency of reprogramming. Derived iPS cell colonies express endogenous Oct4, Sox2 and Nanog at high levels. They have the capacity to form EB that contains progeny from the three germ layers and can differentiate to MN when EB that contain Nestin-positive neural rosettes were primed with RA and SHH. All the described MN markers were present in differentiated cells and these MN displays electrophysiological active properties (43). However, a note of caution is noteworthy because it has been normally assumed that iPS cells should be immune-tolerated if grafted into a histocompatible recipient, but iPS cell immunogenicity has not been completely examined. Zhao et al. (44) demonstrated that ES cells derived from inbred C57BL/6 (B6) mice can efficiently form teratomas in B6 mice without any evident immune rejection, whereas allogenic ES cells did not form teratomas in B6 mice due to rapid rejection by the noncompatible recipients. When B6 mouse embryonic fibroblasts were reprogrammed to iPS cells, surprisingly, pluripotent cells were immune-rejected by B6 recipients precluding teratomas; T-cell infiltration, tissue damage and regression were observed in the small fraction of formed teratomas. These experiments indicate that human iPS cells must be

carefully evaluated in animal models before clinic applications are devised.

The first report on iPS cell generation from somatic cells of a patient was achieved after isolation of skin fibroblasts collected from an 82-year-old patient diagnosed with a familial form of ALS. This patient showed difficulty in swallowing and weakness of the arms and legs and was heterozygous for a dominant mutation of the *sod1* gene that is linked with a slowly progressing form of ALS. Reprogramming to pluripotency occurred after transgenic transduction with the genes *klf4*, *sox2*, *oct4* and *c-myc* by means of a pseudotyped Moloney-based retrovirus. Colonies with ES cell morphology appeared within 2 weeks, and the selected colonies gave rise to stable iPS cell lines that exhibited a strong alkaline phosphatase activity, endogenous Nanog expression as well as the ES cell-associated antigens SSEA3, SSEA4, TRA1-60 and TRA1-81. These iPS cells differentiated into derivatives of the three germ layers as expected. MN induction was observed after EB treatment with RA and a SHH agonist. After differentiation, a high proportion of cells were positive for the neuronal marker tubulin β III, and some of these neurons expressed HB9, Islet1 and ChAT, indicating MN maturation (45). However, differentiation studies are needed to establish differences between MN derived from patients with ALS and WT iPS cells because the percentages and properties of ALS-MN vs. WT-MN were not directly compared. Such information could be of importance in future studies to detect if MN differentiated from iPS-ALS cells survive in the long term in this cellular model. Also, it would be interesting to differentiate iPS-ALS to astrocytes and test *in vitro* if the interaction of these glial cells is deleterious for normal MN because it has been reported that astrocytes that contain mutated hSOD1 produce an oxidant environment that decreases survival of human ES cell-derived MN (46).

iPS cells generated from primary fibroblast of a SMA type I patient and his unaffected mother have also been differentiated to MN. Somatic cells from this SMA patient were reprogrammed with the use of lentiviral constructs encoding *oct4*, *sox2*, *nanog* and *lin28*. Researchers generated two iPS-SMA clones and one iPS-WT clone that propagated robustly when maintained on mouse embryonic fibroblasts. As expected, SMA cells have reduced levels of *smn* transcripts and SMN protein. Normal and patient-derived iPS cells grew at similar rates, formed teratomas and have a normal karyotype. After a neural differentiation protocol that implies the passage of iPS cells in suspension to form floating spheres and plating onto laminin-coated coverslips, Nestin-positive cells can be obtained. Further differentiation with RA plus SHH produced MN that express the transcription factors Hoxb4, Islet1 and Olig2. Terminally differentiated cells were tubulin β III+ or GFAP+, suggesting that SMA-iPS cells are capable of producing neural cells including MN. However, prolonged culture time induces a decrease in MN number and also neurons of smaller size

in iPS-SMA differentiated MN as compared to WT counterparts. Together these data show that iPS-SMA cells can produce similar numbers of neurons and MN initially, but cells coming from SMA patients present a selective reduction in MN at later time points. Interestingly, this was the first report to observe disease-specific effects on human MN survival, indicating that iPS-SMA model can recapitulate some features of the disease (47). Another interesting possibility for using iPS cells generated from patients is to design strategies aimed to correct identified defects such as the reduced levels of SMN protein responsible for MN degeneration in SMA. iPS-SMA cells were differentiated to MN and several compounds were tested for inducing SMN accumulation in the nucleus; addition of valproic acid or tobramycin to iPS-SMA differentiated neurons resulted in partial rescue of SMN expression. Therefore, this cellular model represents a promising tool to study disease mechanisms and to discover new drugs that could prevent or delay the specific degeneration of MN (47).

It is essential to establish if iPS-SMA and iPS-ALS cells differentiated to MN can produce neurons that present crucial features such as electrophysiological activity and the capacity to integrate and positively impact behavior in animal models of MN disease before their use in future clinical applications. On the other hand, there are particular conditions in which MN damage is associated with a known genetic defect like mutations found in familial ALS and SMA. Such mutations could be corrected in reprogrammed cells by gene therapy, providing the possibility that modified cells could be further differentiated to MN and transplanted. Even if gene therapy is not applied, it is important to state that production of iPS cells from patients with advanced age suffering severely disabling diseases is encouraging because somatic cells can be successfully reprogrammed into pluripotent cells which, in turn, can be differentiated later on for grafting without immune rejection.

Clinical Application of Human Cells in Spinal Cord Pathologies

To date, there is no available information on MN grafting in nonhuman primate models of SCI or MN diseases. To our knowledge, no clinical protocols involving grafting of MN derived from pluripotent cells have been set up. Even though the clinical application of human MN derived from ES cells or iPS cells is not yet possible, there are some related clinical trials that are in preliminary phases. In an ongoing phase I trial started in 2010 by Geron Corporation, human ES cell-derived glial restricted oligodendrocyte progenitor (GRNOPC1) cells are being evaluated for their safety, regarding the frequency and severity of adverse effects within 1 year. The approved intervention entails the injection of 2 million GRNOPC1 cells in the spinal cord 7–14 days after complete traumatic SCI. The secondary endpoint of the trial is to evaluate neurological function as measured by sensory scores and lower extremity

motor scores on international standards for neurological classification of SCI examinations. Remyelination allows electrical signals to be passed along nerves, and oligodendrocyte progenitors could contribute to repair myelin sheaths and, therefore, might improve sensory and motor scores in patients. This clinical trial will be finished in October 2012 (<http://www.geron.com>). In addition, Neuralstem, Inc. is carrying out a FDA-approved phase I trial to assess the safety of grafting 100,000 human spinal cord neural stem cells into the spinal cord of ALS patients. Transplantation started in January 2010 and the company has already reported that there are no serious adverse effects related to surgery or implantation of stem cells. So far, six paraplegic and six ambulatory patients received grafts in the lumbar region of the spinal cord. Because the trial was designed to enroll up to 18 patients, the remaining six patients will be treated in the cervical region of the spinal cord with the aim to preserve or even enhance their breathing capacity. Recently, it was announced that the first patient received neural stem cells into the gray matter of the cervical region (<http://www.neuralstem.com>).

In conclusion, differentiation of mouse MN from ES cells established the first steps toward controlling MN differentiation *in vitro* and helped to establish pathways and modulators of the ability of pluripotent cells to generate bona fide MN. These differentiated MN develop several aspects of synaptic and electrophysiological maturation, similar to MN produced *in vivo*. Most significantly, MN differentiated from ES cells have the capacity to integrate and promote recovery in animal models of MN injury and some neurodegenerative conditions. These crucial characteristics encouraged investigators to generate MN from human ES cells and human iPS cells because they represent a great promise for clinical cell replacement therapy due to the fact that MN derived from these human pluripotent cells induce recovery after transplantation in animal models of neuronal injury. Nevertheless, the use of human ES cells is hindered by ethical concerns. On the other hand, iPS cells can be derived from tissues of the same patient, enabling the possibility of autologous transplantation after *in vitro* differentiation. Additionally, iPS cell derivation from MN disease patients allows the generation of cellular models that would improve our knowledge about MN degeneration mechanisms and design new preventive strategies to avoid MN death. There have been some relevant advances towards cell therapy involving MN produced from pluripotent cells, but it appears necessary to continue developing strategies that in the long term may be effective for treating different forms of MN damage *in vivo*.

Acknowledgments

The authors thank Dr. Philip Knuckles for comments. The experimental work in the group of I.V. is supported by grants from UNAM (Papiit IN224010) and Conacyt (14825 and 50715).

References

- Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 1981;292:154–156.
- Martin GR. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981;78:7634–7638.
- Kim JH, Auerbach JM, Rodriguez-Gomez JA, et al. Dopamine neurons derived from embryonic stem cells function in an animal model of Parkinson's disease. *Nature* 2002;418:50–56.
- Barberi T, Klivenyi P, Calingasan NY, et al. Neural subtype specification of fertilization and nuclear transfer embryonic stem cells and application in parkinsonian mice. *Nat Biotechnol* 2003;21:1200–1207.
- Diaz NF, Diaz-Martinez NE, Camacho-Arroyo I, et al. Estradiol promotes proliferation of dopaminergic precursors resulting in a higher proportion of dopamine neurons derived from mouse embryonic stem cells. *Int J Dev Neurosci* 2009;27:493–500.
- Diaz NF, Diaz-Martinez NE, Velasco I, et al. Progesterone increases dopamine neuron number in differentiating mouse embryonic stem cells. *J Neuroendocrinol* 2009;21:730–736.
- Harper JM, Krishnan C, Darman JS, et al. Axonal growth of embryonic stem cell-derived motoneurons in vitro and in motoneuron-injured adult rats. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:7123–7128.
- Deshpande DM, Kim YS, Martinez T, et al. Recovery from paralysis in adult rats using embryonic stem cells. *Ann Neurol* 2006;60:32–44.
- Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998;282:1145–1147.
- Gurdon JB. Adult frogs derived from the nuclei of single somatic cells. *Dev Biol* 1962;4:256–273.
- Gasaryan KG, Hung NM, Neyfakh AA, et al. Nuclear transplantation in teleost *Misgurnus fossilis* L. *Nature* 1979;280:585–587.
- Wilmot I, Schnieke AE, McWhir J, et al. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 1997;385:810–813.
- Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006;126:663–676.
- Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 2007;131:861–872.
- Renoucourt Y, Carroll P, Filippi P, et al. Neurons derived in vitro from ES cells express homeoproteins characteristic of motoneurons and interneurons. *Mech Dev* 1998;79:185–197.
- Wichterle H, Lieberam I, Porter JA, et al. Directed differentiation of embryonic stem cells into motor neurons. *Cell* 2002;110:385–397.
- Miles GB, Yohn DC, Wichterle H, et al. Functional properties of motoneurons derived from mouse embryonic stem cells. *J Neurosci* 2004;24:7848–7858.
- Soundararajan P, Miles GB, Rubin LL, et al. Motoneurons derived from embryonic stem cells express transcription factors and develop phenotypes characteristic of medial motor column neurons. *J Neurosci* 2006;26:3256–3268.
- Soundararajan P, Lindsey BW, Leopold C, et al. Easy and rapid differentiation of embryonic stem cells into functional motoneurons using sonic hedgehog-producing cells. *Stem Cells* 2007;25:1697–1706.
- Lefebvre S, Burglen L, Reboullet S, et al. Identification and characterization of a spinal muscular atrophy-determining gene. *Cell* 1995;80:155–165.
- Lorson CL, Hahnen E, Androphy EJ, et al. A single nucleotide in the SMN gene regulates splicing and is responsible for spinal muscular atrophy. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:6307–6311.
- Monani UR, Lorson CL, Parsons DW, et al. A single nucleotide difference that alters splicing patterns distinguishes the SMA gene SMN1 from the copy gene SMN2. *Hum Mol Genet* 1999;8:1177–1183.
- Burghes AH, Beattie CE. Spinal muscular atrophy: why do low levels of survival motor neuron protein make motor neurons sick? *Nat Rev Neurosci* 2009;10:597–609.

- 1005 24. Paushkin S, Gubitzi AK, Massenet S, et al. The SMN complex, an assembly of ribonucleoproteins. *Curr Opin Cell Biol* 2002;14:305–312. 1044
- 1006 25. Monani UR, Sendtner M, Covert DD, et al. The human centromeric survival motor neuron gene (SMN2) rescues embryonic lethality in *Snn(-/-)* mice and results in a mouse with spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet* 2000;9:333–339. 1045
- 1007 26. Wu CY, Whye D, Glazewski L, et al. Proteomic assessment of a cell model of spinal muscular atrophy. *BMC Neurosci* 2011;12:25. 1046
- 1008 27. Kitazawa A, Shimizu N. Characterization of neurons differentiated from mouse embryonic stem cells using conditioned medium of dorsal root ganglia. *J Biosci Bioeng* 2007;104:257–262. 1047
- 1009 28. Kitazawa A, Shimizu N. Differentiation of mouse induced pluripotent stem cells into neurons using conditioned medium of dorsal root ganglia. *Nat Biotechnol* 2011;28:326–333. 1048
- 1010 29. Wang Z, Wang H, Wu J, et al. Enhanced co-expression of beta-tubulin III and choline acetyltransferase in neurons from mouse embryonic stem cells promoted by icaritin in an estrogen receptor-independent manner. *Chem Biol Interact* 2009;179:375–385. 1049
- 1011 30. Lopez-Gonzalez R, Camacho-Arroyo I, Velasco I. Progesterone and 17beta-estradiol increase differentiation of mouse embryonic stem cells to motor neurons. *IUBMB Life* 2011;63:930–939. 1050
- 1012 31. Chiba S, Iwasaki Y, Sekino H, et al. Transplantation of motoneuron-enriched neural cells derived from mouse embryonic stem cells improves motor function of hemiplegic mice. *Cell Transplant* 2003;12:457–468. 1051
- 1013 32. Hamada M, Yoshikawa H, Ueda Y, et al. Introduction of the MASH1 gene into mouse embryonic stem cells leads to differentiation of motoneuron precursors lacking Nogo receptor expression that can be applicable for transplantation to spinal cord injury. *Neurobiol Dis* 2006;22:509–522. 1052
- 1014 33. Okada Y, Matsumoto A, Shimazaki T, et al. Spatiotemporal recapitulation of central nervous system development by murine embryonic stem cell-derived neural stem/progenitor cells. *Stem Cells* 2008;26:3086–3098. 1053
- 1015 EQ1 34. Yohn DC, Miles GB, Rafuse VF, et al. Transplanted mouse embryonic stem-cell-derived motoneurons form functional motor units and reduce muscle atrophy. *J Neurosci* 2008;28:12409–1218. 1054
- 1016 35. Lopez-Gonzalez R, Kunckles P, Velasco I. Transient recovery in a rat model of familial amyotrophic lateral sclerosis after transplantation of motor neurons derived from mouse embryonic stem cells. *Cell Transplant* 2009;18:1171–1181. 1055
- 1017 36. Mizuseki K, Sakamoto T, Watanabe K, et al. Generation of neural crest-derived peripheral neurons and floor plate cells from mouse and primate embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:5828–5833. 1056
- 1018 37. Ikeda R, Kurokawa MS, Chiba S, et al. Transplantation of neural cells derived from retinoic acid-treated cynomolgus monkey embryonic stem cells successfully improved motor function of hemiplegic mice with experimental brain injury. *Neurobiol Dis* 2005;20:38–48. 1057
- 1019 38. Singh Roy N, Nakano T, Xuing L, et al. Enhancer-specified GFP-based FACS purification of human spinal motor neurons from embryonic stem cells. *Exp Neurol* 2005;196:224–234. 1058
- 1020 39. Erceg S, Ronaghi M, Oria M, et al. Transplanted oligodendrocytes and motoneuron progenitors generated from human embryonic stem cells promote locomotor recovery after spinal cord transection. *Stem Cells* 2010;28:1541–1549. 1059
- 1021 40. Wada T, Honda M, Minami I, et al. Highly efficient differentiation and enrichment of spinal motor neurons derived from human and monkey embryonic stem cells. *PLoS One* 2009;4:e6722. 1060
- 1022 41. Karumbayaram S, Novitch BG, Patterson M, et al. Directed differentiation of human-induced pluripotent stem cells generates active motor neurons. *Stem Cells* 2009;27:806–811. 1061
- 1023 42. Zeng H, Guo M, Martins-Taylor K, et al. Specification of region-specific neurons including forebrain glutamatergic neurons from human induced pluripotent stem cells. *PLoS One* 2010;5:e11853. 1062
- 1024 43. Cai J, Li W, Su H, et al. Generation of human induced pluripotent stem cells from umbilical cord matrix and amniotic membrane mesenchymal cells. *J Biol Chem* 2010;285:11227–11234. 1063
- 1025 44. Zhao T, Zhang ZN, Rong Z, et al. Immunogenicity of induced pluripotent stem cells. *Nature* 2011;474:212–215. 1064
- 1026 45. Dimos JT, Rodolfa KT, Niakan KK, et al. Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons. *Science* 2008;321:1218–1221. 1065
- 1027 46. Marchetto MC, Muotri AR, Mu Y, et al. Non-cell-autonomous effect of human SOD1 G37R astrocytes on motor neurons derived from human embryonic stem cells. *Cell Stem Cell* 2008;3:649–657. 1066
- 1028 47. Ebert AD, Yu J, Rose FF Jr, et al. Induced pluripotent stem cells from a spinal muscular atrophy patient. *Nature* 2009;457:277–280. 1067
- 1029 1068
- 1030 1069
- 1031 1070
- 1032 1071
- 1033 1072
- 1034 1073
- 1035 1074
- 1036 1075
- 1037 1076
- 1038 1077
- 1039 1078
- 1040 1079
- 1041 1080
- 1042 1081
- 1043 1082