



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

Regeneración de la vía nigro – estriatal en ratas parkinsonicas mediante el
trasplante de células troncales embrionarias diferenciadas a neuronas
dopaminérgicas

TESIS QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE: DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA: N. EMMANUEL DIAZ MARTINEZ

DIRECTOR DE TESIS: DR. IVAN VELASCO VELAZQUEZ INSTITUTO DE
FISIOLOGIA CELULAR

COMITÉ TUTOR: DRA. CLORINDA ARIAS ALVAREZ INSTITUTO DE
INVESTIGACIONES BIOMEDICAS

DR. JUAN FERNANDEZ RUIZ FACULTAD DE MEDICINA

MÉXICO, D. F. JUNIO 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México



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

1 Antecedentes	9
1.1 Enfermedad de Parkinson	9
1.1.1 Fisiopatología	12
1.1.2 Manifestaciones clínicas.....	15
1.1.3 Terapias	18
1.2 Células troncales embrionarias	21
1.3 Proteoglicanos de condroitin sulfato	25
1.4 Matriz extracelular y proteoglicanos de condrotin sulfato	25
1.5 Inhibición del crecimiento axonal por PGCS	27
1.6 Quimioatrayentes en el Sistema Nervioso Central	28
1.6.1 Efrinas	29
1.6.2 WNTS	29
1.6.3 Semaforinas	29
1.6.4 Papel de las semaforinas en el Sistema Nervioso	31
2 Planteamiento del problema	35
3 Hipotesis	35
4 Objetivos	36
4.1 Objetivo general	36
4.2 Objetivos particulares	36
5 Relevancia e impacto	37
6 Estrategias y métodos	38
6.1 Cultivo Celular	38
6.1.1 Diferenciación in vitro de CTE a neuronas dopaminérgicas	38
6.1.2 Proliferación celular de CTE	38
6.1.3 Diferenciación neuronal. Protocolo de 5 etapas	38
6.2 Técnica de inmunocitoquímica	40
6.3 Adquisición de imágenes bajo microscopía confocal	42
6.4 Estudios <i>in vivo</i>	42
6.5 Lesión con 6-OHDA, trasplante y pruebas conductuales	44
6.6 Lesión con 6-OHDA	44

6.7 Trasplante estriatal de ratas lesionadas con 6-OHDA	45
6.7.1 Preparación de suspensión de células a trasplantar	45
6.7.2 Procedimiento quirúrgico	45
6.7.3 Reconstrucción de la vía nigro-estriatal	46
6.7.4 Inyección en ángulo	46
6.7.5 Digestión enzimática cadenas de PGCS. Modificación del microambiente	47
6.7.6 Co-trasplante NDA y células HEK sobre-expresando semaforina 3A y semaforina 3C	48
6.8 Trasplante dopaminérgico	48
6.9 Reto farmacológico con apomorfina (prueba de rotaciones)	49
6.10 Pruebas conductuales no farmacológicas	49
6.10.1 Prueba de ajuste de pasos (steeping)	49
6.10.2 Prueba de apoyo de miembro torácico	49
6.10.3 Prueba de exploración libre en cilindro	49
6.11 Microdiálisis y cuantificación de dopamina	51
6.12 Cuantificación de Semaforinas Clase 3	52
6.12.1 Electroforesis y Western Blot	52
6.12.2 Cuantificación mediante ensayo de ELISA.....	53
6.12.2.1 Preparación de reactivos	53
6.12.2.2 Procedimiento del ensayo	54
6.13 Conteo celular	55
6.14 Marcaje retrógrado	55
6.15 Análisis estadístico	55
7 Resultados	57
7.1 Estudios in vitro	57
7.1.1 Inmunocitoquímica al final de la etapa de proliferación y diferenciación	57
7.2 Animales lesionados con 6-OHDA	58
7.3 Trasplante de neuronas dopaminérgicas derivadas de cTE de ratón en el estriado de ratas hemiparkinsonianas	58
7.4 Prueba de rotaciones	59
7.4.1 Prueba de ajuste de pasos	60
7.4.2 Prueba de apoyo de miembros torácicos	60

7.4.3 Prueba de exploración libre en cilindro	60
7.5 Analisis Histológico	62
7.6 Reconstrucción de la vía nigro-estriatal	63
7.6.1 Degradación parcial de PGCS	63
7.6.2 Las células HEK293 secretan la proteína Sema 3C cuando es trasplantada en el cerebro de ratas adultas	68
7.7 Cuantificación de la liberación de Semaforinas en el medio de cultivo ...	70
7.8 El co-trasplante de células HEK293 trasfectadas con semaforinas y NDA en la substantia nigra provoca una recuperación funcional en el modelo murino parkinsoniano	73
7.9 El co-trasplante de células expresando Sema3 con NDA causa liberación de DA en el estriado dorsal	75
7.10 Establecimiento de nuevas comunicaciones sinápticas dopaminérgicas evaluadas mediante el marcaje retrogrado en animales que recibieron el trasplante con NDA + Sema3C	76
7.11 Establecimiento de nuevas conexiones sinápticas dopaminérgicas	79
7.12 El trasplante intranigral contiene neuronas dopaminérgicas del cerebro medio y el margen de supervivencia es similar a lo encontrado en injertos estriatales	82
8 Discusión	84
9 Conclusiones	90
10 Referencias	92
11 Anexos	100

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1. Etiología de la Enfermedad de Parkinson (EP) y su posible relación con la integridad mitocondrial.
- Figura 2. Derivación de líneas celulares pluripotentes.
- Figura 3. Esquema de algunos de los proteoglicanos de condroitin sulfato.
- Figura 4. Organización estructural de las semaforinas en vertebrados.
- Figura 5. Representación esquemática de la inyección en angulo.
- Figura 6. Procedimiento para la dilución del estándar.
- Figura 7. Protocolo de diferenciación de 5 etapas.
- Figura 8. Prueba de rotaciones inducida por apomorfina 45 días posteriores al trasplante.
- Figura 9. Prueba de ajuste de pasos.
- Figura 10. Prueba de apoyo de miembros torácicos.
- Figura 12. Trasplante intraestriatal.
- Figura 13. Inyección en angulo con rojo fenol.
- Figura 14. Largo de diferentes inyectores.
- Figura 15. La degradación parcial de CSPG a través de la trayectoria nigro-estriatal.
- Figura 16. Degradación parcial de los PGCS.
- Figura 17. Marcadores de cerebro medio.
- Figura 18. Ensayos *in vitro* células HEK293.
- Figura 19. Ausencia de expresión de Sema 3 en el cerebro adulto.
- Figura 20. Liberación de Sema3 al medio de cultivo.
- Figura 21. Cuantificación de Semaforina 3 liberada *in vitro*.
- Figura 22. La expresión de Semaforinas de clase 3 en el cerebro lesionado.
- Figura 23. Recuperación funcional utilizando Semaforinas de clase 3.
- Figura 24. Trasplante de células HEK293 trasfectadas con Sema3 en ausencia de NDA.
- Figura 25. Liberación estriatal de Dopamina.
- Figura 26. Formación de una vía dopaminérgica entre la SN y el estriado.
- Figura 27. Expresión relativa de TH en el estriado.

Figura 28. Establecimiento de nuevos contactos sinápticos entre la SN y el estriado.

Figura 29. Cuantificación de células positivas a TH/FG en la SN.

Figura 30. Expresión de marcadores dopaminérgicos antes y después del trasplante intranigral.

Figura 31. Cuantificación de los injertos estriatales e intranigrales.

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Patrones de herencia mendelianos que conducen al Parkinsonismo y sus características histopatológicas.

Tabla 2. Papel de las semaforinas en el sistema nervioso.

Tabla 3. Resumen de la generación de neuronas dopaminérgicas.

Tabla 4. Resumen de los grupos de experimentación.

ABREVIATURAS

Células troncales (CT)
Condroitinasa ABC (ChABC)
Cuerpos embrionarios (EB's)
Dopamina (DA)
Enfermedad de Parkinson (EP)
Engrailed (En)
Factor de Crecimiento Fibroblástico 8 (FGF8)
Factor inhibidor de leucemia (LIF)
Fibroblastos de ratón embrionario (MEF)
Fluorogold (FG)
Glicoproteínas asociadas a mielina (MAG)
Glicosaminoglicanos (GAG)
Intraperitoneal (IP)
Human Embryo Kidney (HEK, por sus siglas en inglés)
L-dihidroxifenilalanina (L-dopa)
Matriz extracelular (MEC)
Neuronas dopaminérgicas (NDA)
Proteína verde fluorescente (GFP)
Proteína ácida glial fibrilar (GFAP)
Proteoglicanos de condroitin sulfato (PGCS)
Semaforinas (Sema)
Sistema nervioso central (SNC)
Solución amortiguadora fosfatada (PBS)
Sonic Hedgehog (Shh)
Sustancia nigra (SN)
Tirosina hidroxilasa (TH)
Transportador de dopamina (Dat)
Transportador vesicular de monoaminas (Vmat2)
6-hidroxidopamina (6-OHDA)

ANEXOS

1. Inhibición del crecimiento axonal por proteoglicanos de condroitin sulfato en el sistema nervioso central. Artículo de revisión. Diaz-Martinez NE, Velasco I.
2. Axon Responses of Embryonic Stem Cell-Derived Dopaminergic Neurons to Semaphorins 3A and 3C. Artículo original. Tamariz E, Diaz-Martinez NE, Diaz N, Garcia-Peña C, Velasco I, Varela-Echavarria A.
3. Recovery From Experimental Parkinsonism by Semaphorin-guided Axonal Growth of Grafted Dopamine Neurons. Artículo original. Diaz-Martinez NE, Tamariz E, Diaz N, Garcia-Peña C, Varela-Echavarria A, Velasco I.

RESUMEN

Estudios han demostrado que la terapia de reemplazo celular en la enfermedad de Parkinson promueve una recuperación funcional posterior al trasplante cuando neuronas dopaminérgicas son injertadas en el sitio diana del neurotransmisor. Sin embargo, cuando estas células son trasplantadas en la *sustancia nigra*, sitio ontogénico de las neuronas dopaminérgicas, no se presenta recuperación conductual debido principalmente a que en el cerebro adulto y en el cerebro con una lesión preexistente no existen los suficientes mecanismos intrínsecos para promover el crecimiento de axones y neuritas. Entre las principales moléculas que destacan como inhibidores del crecimiento axonal están los proteoglicanos de condroitin sulfato, proteínas de matriz extracelular que incrementan su expresión en el cerebro en respuesta a un daño o detrimento en la integridad del tejido. Recientemente se ha estudiado el papel de la enzima condroitinasa como inhibidor de estas moléculas destacando su función en la promoción del crecimiento axonal en áreas de daño neuronal. Por otra parte, el reciente conocimiento obtenido respecto a las semaforinas de clase 3 ha permitido clasificarlas como moléculas implicadas en el direccionamiento axonal. Se ha demostrado que la semaforina 3A y la semaforina 3C promueven el crecimiento de axones de neuronas dopaminérgicas obtenidas a partir de células troncales *in vitro*. Estas dos aseveraciones sugieren la posibilidad de realizar un trasplante en la *sustancia nigra* combinado con la digestión enzimática de proteoglicanos o un co-trasplante con células que expresan semaforina 3A o semaforina 3C, esto con la finalidad de promover el crecimiento axonal de los implantes hacia su sitio diana y de esta forma restablecer los circuitos endógenos de la vía nigro-estriatal. Para comprobar esta hipótesis, se desarrolló un modelo de ratas hemiparkinsonianas lesionadas en el cerebro medio con la toxina 6-hidroxidopamina, las cuales fueron evaluadas mediante pruebas conductuales y retos farmacológicos posterior al trasplante de células dopaminérgicas derivadas de células troncales embrionarias paralelo al tratamiento con enzima condroitinasa, o el co-trasplante de neuronas dopaminérgicas y células HEK293 expresando semaforinas. Nosotros no observamos una recuperación funcional en nuestro modelo de ratas hemiparkinsonianas que recibieron el

trasplante de células dopaminérgicas y el tratamiento con la enzima condroitinasa. En contraste, en el grupo que recibió ambos tipos celulares se observó que la semaforina clase 3 puede dirigir y promover el crecimiento axonal de neuronas dopaminérgicas estableciendo una recuperación funcional en un modelo de la enfermedad de Parkinson. Estos resultados demuestran que es posible restablecer la vía nigro-estriatal en un cerebro adulto lesionado.

Palabras clave: Enfermedad de Parkinson; Células troncales embrionarias; Crecimiento Axonal; Trasplante de Neuronas Dopaminérgicas.

Antecedentes.

Enfermedad de Parkinson.

La enfermedad de Parkinson (EP) fue descrita por primera vez en el siglo XVII por el médico inglés James Parkinson en su ensayo denominado la parálisis trepidante (*An Essay on the Shaking palsy*), en el que el autor clínicamente describe una serie de signos y síntomas relacionados por primera vez con este trastorno. Sin embargo, no fue hasta años después donde se clasifica como un padecimiento neurodegenerativo con déficits locomotores y cognoscitivos bien establecidos.^{1,2} La EP se presenta generalmente hacia mediados o finales de la vida en una población demográficamente activa que cada día crece rápidamente, aumento asociado a un incremento en la expectativa de vida. Esta enfermedad produce una incapacidad crónica degenerativa que representa el 1% en personas mayores de 65 años y el 0.1% de la población mundial.³ En México se han reportado más de 50 000 casos de pacientes con este padecimiento, cifra considerada una subestimación debido a aquellas personas que no son diagnosticadas o que no tienen acceso a centros de salud.

Fisiopatología.

La fisiopatología de la EP es causada por la pérdida selectiva de neuronas dopaminérgicas (NDA) localizadas en la *sustancia nigra* (SN) *pars compacta* del mesencéfalo, reflejado en la depleción de dopamina hacia el estriado y la denervación de los circuitos neuronales en las regiones destino de los ganglios basales de estas neuronas. Otro hallazgo patológico de interés, es la presencia de la proteína alfa sinucleína o corpúsculos de inclusión de forma intracitoplasmática (cuerpos de Lewy) o en los procesos neuronales (neuritas de Lewy) de las células sobrevivientes.² El papel de los corpúsculos de Lewy en el proceso patogénico es discutible, debido a que el síndrome parkinsoniano puede ocurrir en ausencia de los complejos de Lewy, detectándose algunos casos de Parkinson de tipo familiar o parkinsonismo inducido por drogas en los que no se determinó la presencia de estos agregados.⁴ La etiología de la EP

no se ha establecido de manera concluyente debido a que un 90% de los casos ocurre de forma esporádica y el pequeño porcentaje restante se debe a EP de tipo familiar la cual puede ser causada por mutaciones en los genes de las proteínas alfa sinucleína (park 1), la proteína hidrolasa carboxi-terminal de ubiquitina (UCHL-1, park 5), park 3, LRRK2 (cinasa 2 rica en repeticiones de leucina, park 8), park 10 y 11, asociados a formas autosómicas dominantes, mientras que, parkin (park 2), pink 1 (PTEN cinasa 1 inducida putativamente, park 6) DJ-1 (park 7), y park 9 han sido asociadas con las formas recesivas de la enfermedad ⁴⁻⁶ con una alta variabilidad en fenotipos asociados a estos genes. ³ (Tabla 1) Sin embargo, uno de los factores mas comúnmente asociados con el riesgo de padecer EP es la edad, ya que se ha demostrado un incremento en la presentación de ciertas formas monogénicas, por ejemplo la mutación G2019S en el gen LRRK2 es incompleta pero incrementa de un estimado del 28% a los 59 años de edad a un 74% a los 79 años de edad. ^{2,7} Por otra parte, el sexo también juega un papel en la presentación de la enfermedad ya que las probabilidades para desarrollar la EP en hombres comparados con mujeres es consistentemente mayor de 1.5 a 2.0 veces; probablemente esta diferencia de géneros con respecto al riesgo de padecer la EP se asocie biológicamente a causas hormonales o sociológicamente a causas ocupacionales o una interacción de ambas. ⁷ También destacan otros factores medioambientales como son la dieta y el estilo de vida; existen numerosos estudios que demuestran una fuerte asociación entre el consumo de tabaco, la cafeína, el te y la disminución de presentar la EP, ^{1,7} por el contrario condiciones médicas tales como la obesidad, la diabetes mellitus tipo 2, niveles bajos de actividad física, niveles altos de colesterol y toxinas incrementan la posibilidad de desarrollar la EP. Entre las principales toxinas destacan el mptp, los plaguicidas y algunos herbicidas siendo los más comunes el paraquat (1,1'-dimetil-4,4 bipyridinio) y el diquat (9,10- dihidro-8a,10a-diazoniafenantreno dibromuro), ambos compuestos dañan extensamente las membranas celulares; de igual forma se ha demostrado que los organoclorados como el dieldrin (3, 4, 5, 6, 9, 9-Hexacloro-1a, 2, 2a, 3, 6, 6a, 7 7a-octahidro-2,7:3,6-dimetanonafte[2,3-bioxirena) está fuertemente asociado a trastornos motores en roedores y cuando se realiza el cultivo de células nerviosas *in vitro* el dieldrin muestra una neurotoxicidad selectiva

medida por la formación de radicales libres de oxígeno, por lipoperoxidación y también por la formación de fibrillas de α -synucleína.^{8,9} En el caso, de los ditiocarbamatos como el maneb (Etilenbis (ditiocarbamato) de manganeso) su neurotoxicidad esta relacionada con la inhibición de la actividad enzimática del complejo 3 mitocondrial y con la oxidación de las catecolaminas. Se sabe que la administración sistémica del paraquat y del maneb inducen una disminución sinérgica del contenido de DA en el estriado. La administración sistémica continua de rotenona reproduce los aspectos clave de la EP que incluyen la degeneración selectiva del sistema dopaminérgico nigroestriatal, la formación de corpúsculos de inclusión semejantes a los cuerpos de Lewy y alteraciones en el movimiento. Este efecto es mediado por la inhibición de la actividad enzimática del complejo I mitocondrial, fuente principal del radical O₂.¹⁰ Existe un incremento en la evidencia de que ambas variantes esporádica y familiar puedan compartir vías en común que podrían converger en la mitocondria.¹¹ ya que ambas formas son esencialmente indistinguibles, implicando la existencia de algunos mecanismos intrínsecos en común. (Figura 1)

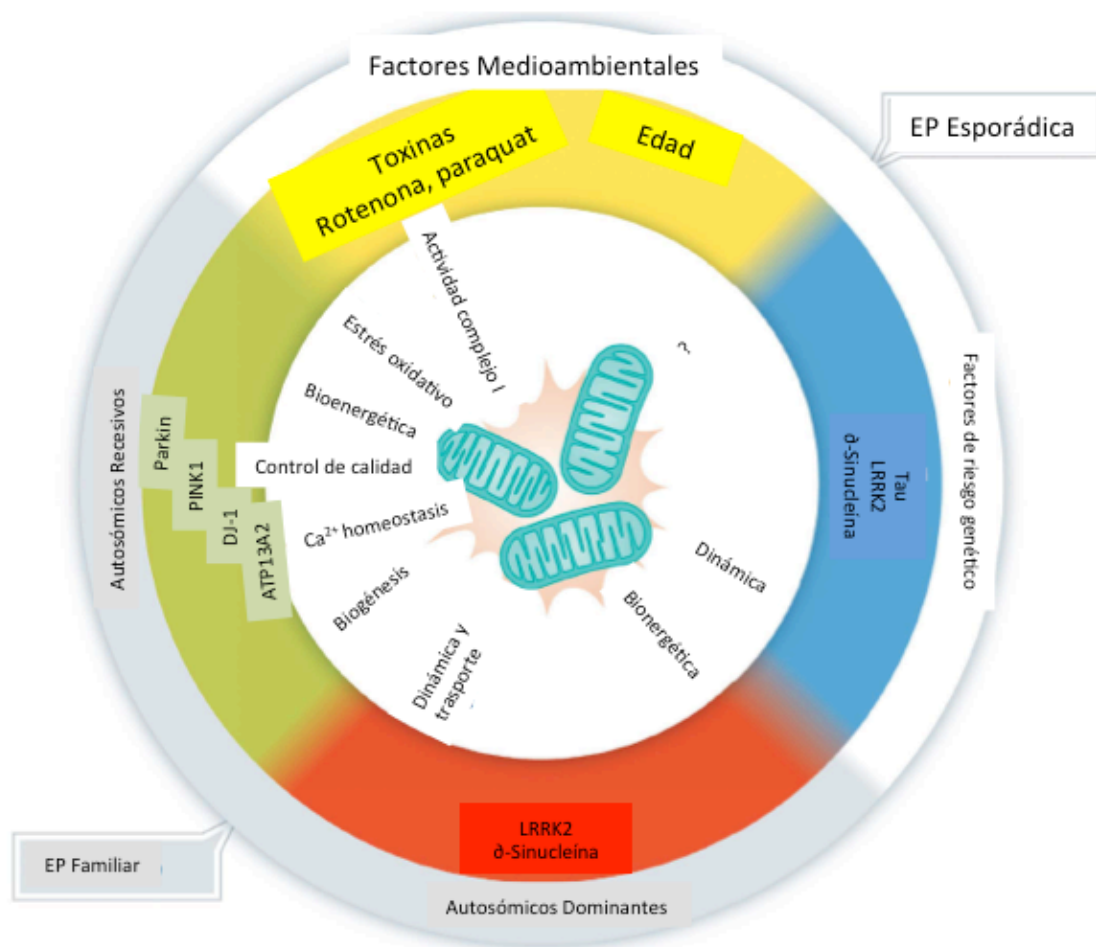


Figura 1. Etiología de la Enfermedad de Parkinson (EP) y su posible relación con la integridad mitocondrial. La EP de tipo familiar es causada por mutaciones en los genes identificados mediante análisis en formas recesivas y dominantes. La EP de tipo esporádica es considerada una enfermedad neurodegenerativa compleja con susceptibilidad genética y factores medioambientales que contribuyen a la etiología. Recientes estudios han identificado sitios de susceptibilidad, los cuales en ambos casos (β -sinucleína y LRRK2) coinciden con los clásicos genes de la EP, uniendo el parkinsonismo familiar con el esporádico. Ambos factores genéticos y medioambientales tienen influencia mitocondrial, como es la bioenergética, la dinámica, el transporte y el control de calidad. Modificado de Exner N, et al., 2012 ²

Manifestaciones clínicas.

La EP es diagnosticada por sus síntomas cardinales incluyendo la bradicinesia, la hipocinesia, la rigidez, el temblor en reposo y la inestabilidad postural, los cuales resumen el síndrome parkinsoniano. ² Algunas de las características no motoras incluyen alteraciones en el sueño, depresión y

demencia.^{12 13} Aunque las alteraciones del movimiento y marcha son los signos más evidentes y limitantes en la enfermedad, este padecimiento involucra una mayor disfunción y degeneración. Ya que los procesos patológicos inician años o décadas antes de que el primer síntoma motor sea observado. La EP puede presentar además de todos estos signos clínicos una manifestación atípica como la atrofia múltiple, la disautonomía y/o los signos cerebelares, parálisis supranuclear progresiva, implicando movimientos no controlados de los ojos con prominente inestabilidad postural o sin ella y degeneración corticobasal (apraxia).⁴

Aunque se desconozca la etiología de manera concluyente en el inicio de la enfermedad, el mecanismo por el cual mueren las NDA dentro de la SN *pars compacta*, (núcleo regulatorio clave en el circuito de los ganglios basales) permanece a ser elucidado, debido a que actualmente se conoce que muchos otros tipos neuronales en el cerebro medio degeneran y mueren también, incluyendo varios núcleos autonómicos y del locus coeruleus, así como neuronas glutamatérgicas en la corteza cerebral dejando claro que la susceptibilidad no sólo es específica de las NDA en la SN.¹⁴ La mayoría de los casos de la EP son idiopáticos, atribuidos a factores medioambientales como previamente se describió, sin embargo dentro de los factores genéticos destaca la mutación de genes que codifican para la proteína α -sinucleína cuya función estructural dentro del citoesqueleto no es precisa, ya que al mutar forma agrupamientos proteicos¹⁵ asociados a la liberación de radicales libres que incrementa la toxicidad en la célula neuronal conduciendo a un mecanismo de muerte celular programado dependiente de caspasas.¹⁶

Por otra parte, se ha descrito que la mutación en el gen autosómico recesivo DJ-1 también produce una forma familiar de la EP. Se han reportado más de 10 isoformas de DJ-1 que son responsables de la oxidación de cisteínas y metilación de algunas proteínas, lo que conduce a la acumulación de agregados proteicos en el citoesqueleto.¹⁷ Esta proteína está involucrada en oncogénesis e infertilidad en ratas, asimismo se le ha atribuido un papel de sensor en el estrés oxidativo.¹⁸

Otra de las mutaciones asociadas a la EP de tipo familiar es el gen UCHL1 (ubiquitin carboxy terminal hydrolase L1), que participa en el sistema ubiquitina-proteosoma, siendo la más común la ubiquitinización de la proteína E3 ligasa denominada Parkin alterando su localización y agregándose en un solo sitio, siendo responsable del parkinsonismo de tipo juvenil.¹⁹ De igual forma, la proteína cinasa PINK1 (PTEN-induced cinasa), la cual es una proteína mitocondrial, al mutar presenta alteraciones en el sitio de unión para ADP en la actividad cinasa, y recientemente ha sido relacionada con la protección ante el estrés oxidativo mediante su función fosforilada.²⁰ Estudios en moscas deficientes de PINK1 demuestran que esta mutación genera organismos viables pero con signos de déficit motor, infiriendo que la EP puede estar asociada a una o más mutaciones en los genes antes descritos sin embargo, uno de los factores que complican la etiología es que las NDA localizadas en la SN del cerebro medio presentan una mayor susceptibilidad al daño mitocondrial siendo ocasionada por alteraciones en la cadena de transporte de electrones en los complejos I y III por la enzima tetrahidrobiopterina (BH4), la cual funciona como un co-factor de la enzima TH para la síntesis de monoaminas incrementando la producción de radicales libres generando quininas a partir de la dopamina lo que resulta en el adelgazamiento de la membrana mitocondrial conduciendo a una muerte celular.^{17,21}

Tabla 1. Patrones de herencia mendelianos que conducen al Parkinsonismo y sus características histopatológicas. Modificado de Hardy J., 2010.³

Locus	Genes	Características clínicas	Características histopatológicas
Dominante			
PARK 1/4	β -sinucleína	Típicas características de la EP, pero algunas veces acompaña demencia	Cuerpos de Lewy
PARK 8	LRRK2	Típicas características de la EP	Usualmente cuerpos de Lewy
FTDP-17	MAPT	La mayoría de las mutaciones presenta demencia, con algunas características típicas de la EP	Tau/depósitos
SCA3	Ataxin3	Usualmente ataxia en europeos y parkinsonismo en africanos	Probables inclusiones de poliglutamina sin cuerpos de Lewy
SCA2	Ataxin2	Usualmente ataxia en Europeos y parkinsonismo en Asiáticos	Probables inclusiones de Poliglutamina sin cuerpos de lewy
Recesivo			
PARK2	Parkin	Muy lenta presentación de la aparición de la enfermedad	Sin cuerpos de Lewy
PARK6	PINK1	Usualmente muy lenta presentación de la aparición de la enfermedad	Un caso con cuerpos de Lewy
PARK7	DJ-1	Pocos datos pero similar a Parkin	Desconocido
PARK9	ATP13A2	Parkinsonismo agresivo y complejo con muchas características adicionales	Desconocido
PARK14	PLA2G6	Parkinsonismo agresivo y complejo con muchas características adicionales	Cuerpos de Lewy
SPG11	Espatacsina	Usualmente paraplejía espástica pero algunas ocasiones parkinsonismo agresivo y complejo con muchas características adicionales	Desconocido
Locus de alto riesgo			
Locus Gaucher	GBA	Típico parkinsonismo	Cuerpos de Lewy
Loci de bajo riesgo			

	SNCA	Típico parkinsonismo	Cuerpos de Lewy
	MAPT		Cuerpos de Lewy
	LRRK2	Típico parkinsonismo	Cuerpos de Lewy
	HLA	Típico parkinsonismo	Cuerpos de Lewy

Terapias

La EP es uno de los pocos padecimientos neurodegenerativos para el cual existen terapias efectivas sintomáticamente desde hace décadas. Aunque la L-3,4 dihidroxifenilalanina (L-dopa) precursor metabólico de la dopamina es considerada el fármaco más utilizado, su uso prolongado está asociado con complicaciones motoras incluyendo discinesias con periodos on-off. Existen varios estudios a largo plazo que sugieren que la mejoría asociada a déficits motores no es progresiva ni lineal ya que en algunos pacientes que mejoran algunos síntomas relacionados a la disfunción locomotora, la incapacidad asociada a características no motoras incrementa; de hecho la demencia es considerada la mayor discapacidad a largo plazo en personas con la EP y es tan común que puede encontrarse en un 30 – 80 % de individuos con este padecimiento. ¹ Evidencia de estudios preclínicos sugieren que estas complicaciones están relacionadas a la estimulación pulsátil de los receptores estriatales de dopamina seguido de una administración oral prolongada de L-dopa, en contraste los agonistas de la dopamina proveen niveles más estables en plasma y por lo tanto una estimulación más controlada; sin embargo no consiguen la eficacia de la levodopa. Asimismo se ha investigado el papel de diversos fármacos que pueden atenuar algunas de las alteraciones motoras en la EP, estudios experimentales muestran un efecto neuroprotector de la nicotina, la inosina, la hidroquinona y la creatinina ¹⁸ en contra de varias toxinas y en ratones transgénicos de esclerosis lateral amiotrófica y la enfermedad de Huntington actuando a nivel mitocondrial, además en particular se ha demostrado que la nicotina inhibe la agregación de la proteína alfa sinucleína corroborando así su papel en contra del daño nigro-estriatal ¹⁴ debido a que la nicotina o el ligando del receptor nicotínico puede en algunos casos de manera

experimental atenuar la severidad de las alteraciones motoras y disminuir las discinesias inducidas por L-dopa.¹³

Para tratar de revertir los problemas asociados a este déficit de dopamina hacia el estriado, se han establecido muchos protocolos terapéuticos entre los que destacan la administración de L-dopa, la cuál es convertida a dopamina en el cerebro por la descarboxilasa de aminoácidos aromáticos. Esta droga es comúnmente administrada en combinación con benzerazida, reduciendo de esta forma las náuseas y el vómito ocasionados por la administración oral de L-dopa de forma sistémica²². Otras estrategias incluyen la remoción quirúrgica y la estimulación eléctrica profunda del globo pálido interno y el núcleo subtalámico. Estos procedimientos, por su invasividad y un alto costo, son utilizados como última opción. Por otra parte, se ha investigado la administración exógena de sustancias con efecto neuroprotector *in situ*, enfocados a detener o disminuir la muerte neuronal y la progresión de la enfermedad¹². Sin embargo, en la mayoría de los casos los resultados son transitorios y presentan el inconveniente de provocar efectos colaterales. De hecho, existe un acuerdo general de que la nueva terapia enfocada al tratamiento de la EP sea modificar el proceso de la enfermedad en lugar de aliviar los síntomas del proceso neurodegenerativo, reduciendo la prevalencia de las disfunciones motoras a corto plazo y no motoras a largo plazo.¹ Asimismo, otro tratamiento que se ha utilizado de forma clínica es el trasplante estriatal de varias fuentes incluyendo tejido fetal, neuronas de la SN obtenida de porcinos, células del cuerpo carotídeo y células inmaduras provenientes de la retina entre otras fuentes. Aunque existe evidencia de un efecto benéfico en el caso de NDA provenientes de fetos abortados, estos implantes produjeron una recuperación en la función motora sólo en algunos casos, ya que en gran medida dependen del número total de células trasplantadas y la edad del paciente que recibe este injerto^{23,24}. Recientemente hallazgos clínicos en personas que recibieron este tratamiento han sido evaluados 9 a 16 años después de recibir el injerto, mostrando algunas de las siguientes características: presencia de neuronas serotoninérgicas, bajos niveles plasmáticos del transportador de dopamina y la presencia de cuerpos de Lewy en algunas células provenientes del trasplante. En cualquier caso el mejor

resultado obtenido por cualquiera de estos estudios no sobrepasa los beneficios clínicos de la estimulación cerebral profunda del núcleo subtalamico o inclusive de la liberación de levodopa u apomorfina de manera parenteral.

^{1,23,24,25} De aquí, surge la importancia de contar con modelos animales en donde se puedan evaluar los factores que influyen en el éxito del reemplazo de NDA.

En los últimos años, se ha propuesto la utilización de células troncales diferenciadas en cultivo, como una potencial fuente alterna al tejido fetal para la obtención de NDA ya que éstas neuronas tiene la capacidad de sobrevivir en el sitio donde son trasplantadas, inervar regiones del cerebro y disminuir los déficits locomotores en roedores y primates no humanos como modelo de la EP.

Células troncales embrionarias.

Las células troncales (CT) son capaces de renovarse ilimitadamente y diferenciarse a varios tipos celulares tanto *in vitro* como *in vivo*. En particular, las CT embrionarias se obtienen de la masa celular interna de blastocistos pre-implantación y poseen el rango más amplio de diferenciación celular, siendo capaces de dar origen a cualquier tipo celular presente en un organismo adulto ^{26,27}. Asimismo, debido a su alta capacidad proliferativa, pueden ser utilizadas para producir un gran número de células diferenciadas, las cuales podrían emplearse en terapias de reemplazo celular en un futuro.

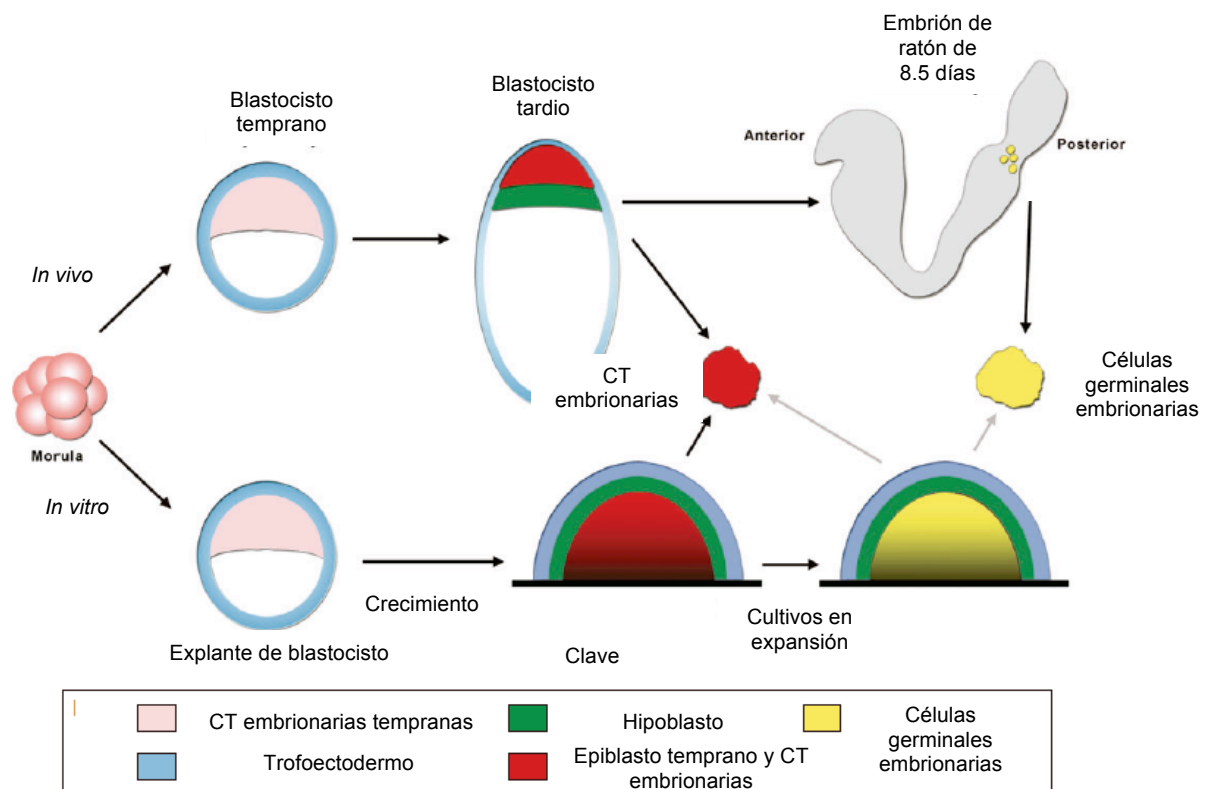


Figura 2. Derivación de líneas celulares pluripotentes. El aislamiento de células troncales (CT) embrionarias, germinales y primordiales de ratón bajo condiciones de cultivo convencionales. (A) La progresión del desarrollo en vivo, los precursores de las líneas celulares pluripotentes aparecen en el epiblasto temprano (rojo) en el blastocisto tardío y como células germinales primordiales (amarillo) en el embrión al día 8.5. (B) Las dos rutas propuestas para la producción de líneas celulares pluripotentes a partir de blastocistos in vitro. El crecimiento muestra un cuerpo rojo representando la ruta temprana de la derivación de CT, el crecimiento con un cuerpo amarillo representa un periodo largo durante el cual las células germinales primordiales pueden ser especificadas. Flechas verdes representan la vía alternativa desde CT a células germinales. Modificado de Nichols J., et al. 2011.²⁶

La generación de NDA a partir de CT embrionarias ha sido descrita por varios grupos de trabajo²⁸⁻³², los cuales retoman el desarrollo normal de un órgano o tejido, tomando en cuenta la cascada secuencial de factores de crecimiento e inducción a lo largo del eje antero-posterior y el eje dorso-ventral. Durante el desarrollo normal del cerebro medio, el eje antero-posterior induce la génesis de dominios morfogenéticos (cerebro anterior, cerebro medio, istmo y cerebro posterior) mientras que el dominio dorso-ventral resulta en la subdivisión en el cerebro a través del neuro-eje (placa de piso, basal, alar y techo). La regionalización del sistema nervioso central (SNC) es necesaria para el

correcto posicionamiento de las NDA en el desarrollo. La zona del istmo se caracteriza por la expresión del Factor de Crecimiento Fibroblástico 8 (FGF8) y la placa del piso por la expresión de Sonic Hedgehog (Shh). La intersección de estos factores provee la información posicional que determina el nicho de NDA. Mientras que FGF8 actúa como un morfógeno antero-posterior, el eje dorsoventral es determinado por la expresión de Shh y la secreción dorsal de las proteínas morfogenéticas óseas (BMP) por el techo de la placa del piso. El istmo se establece por la oposición de dominios de expresión de dos represores transcripcionales: Gbx2 en el cerebro posterior y Otx2 en el cerebro medio y anterior. Aunque Otx2 y Gbx2 no son necesarios para la inducción de genes del fascículo cerebro medio – cerebro posterior (como FGF8), estos son esenciales para el correcto posicionamiento de sus dominios de expresión.³³ Otros factores involucrados en la inducción y mantenimiento de los progenitores de NDA en el cerebro medio son Wnt, Engrailed (En)1 y En2, Pax2/5, Lmx1a, Msx1, Lmx1b y Foxa2.^{33,34} La interacción de estos factores en el cerebro medio forma gradientes en los cuales los progenitores siguen diferentes destinos dependiendo de su posición; posteriormente los precursores neuronales eventualmente formaran células dopaminérgicas completamente diferenciadas las cuales expresan genes esenciales como (Nurr1, Pitx3) para la señalización y mantenimiento de la enzima tirosina hidroxilasa (TH) y la descarboxilasa de aminoácidos aromáticos, la cual cataliza la conversión de L-tirosina a L-DOPA y L-DOPA a dopamina, respectivamente; asimismo se requiere la maduración celular y el correcto funcionamiento del transportador vesicular de monoaminas (Vmat2) para el almacenamiento vesicular y liberación de DA; y el transportador de DA (Dat), involucrado en la recaptura de DA en la vesícula sináptica, todas estas proteínas esenciales en la manufactura de DA. Tomando ventaja del conocimiento previo referente al crecimiento y desarrollo normal de las NDA, el uso de las CT cada vez toma mayor importancia, ya que estas asemejan el desarrollo normal del tipo celular de estudio. Ya que cuando estas células son cultivadas y diferenciadas *in vitro*, los métodos de diferenciación en específico neuronal dopaminérgica involucran los mismos factores y proteínas que son expresadas en el desarrollo normal de éstas células.^{30,28,35,28,36,37,34,38} En la mayoría de trabajos utilizando CT se ha reportado la sobrevivencia y expresión de neuronas del cerebro medio con

identidad dopaminérgica,³⁴ así como la recuperación funcional motora hasta por 32 semanas de la asimetría conductual en un modelo de Parkinson experimental causado por la microinyección con la neurotoxina 6-hidroxidopamina (6-OHDA), restaurando así la liberación de DA en el sitio donde son trasplantadas las CT embrionarias de distintas especies.^{23,24,29,39,40} La principal razón por la cuál se realizan este tipo de trasplantes de forma ectópica es la aparente incapacidad de las células o tejido implantado en la SNpc para extender axones capaces de alcanzar el estriado ipsilateral y de esta forma reconstruir la vía nigro-estriatal ausente; asimismo este tipo de estrategia conduce a una escasa regulación de circuitos neuronales provenientes del cerebro medio, tales como el globo pálido, el núcleo rafe y el estriado.⁴¹⁻⁴³ Comparativamente, otras estrategias de trasplante han reportado una mejoría conductual con respecto a la que se observa en el implante intraestriatal, cuando se realizan trasplantes simultáneos de mesencéfalo ventral fetal murino en el estriado y en el sitio ontogénico la SN o con la adición de GDNF a lo largo de la vía nigro-estriatal. Sin embargo, los implantes simultáneos no logran revertir por completo el déficit neuronal en comparación con animales intactos y la recuperación funcional conductual se ha observado sólo cuando se realiza el trasplante simultáneo en etapas tempranas del desarrollo^{41,44}. Previos estudios de Nikkhah G, *et. al.* han mostrado que cuando se trasplantan células provenientes de mesencéfalo ventral en ratas neonatas después de ser lesionadas con 6-OHDA, estas preservan la inervación nigroestriatal y disminuyen las rotaciones asociadas a la administración de amfetamina.⁴⁵

Teniendo en cuenta estos antecedentes, nosotros pensamos que la condición ideal sería realizar implantes en la SN *pars compacta* y promover el crecimiento axonal hacia el estriado para restituir la inervación dopaminérgica en el cerebro de ratas adultas.

Sin embargo, uno de los principales factores que influyen en el fracaso de los trasplantes de NDA tanto en el estriado como en la SNpc, es que el SNC del adulto tiene poca capacidad para la regeneración axonal después del daño, siendo principalmente relacionado a cambios en la expresión de componentes

estructurales de la matriz extracelular ⁴⁶⁻⁴⁸, principalmente ocasionada por los proteoglicanos de condroitin sulfato (PGCS).

Proteoglicanos de condroitin sulfato.

Los proteoglicanos de condroitin sulfato (PGCS) son un grupo de glicoproteínas localizadas en la superficie celular y en el espacio extracelular de los tejidos animales. En lo que se refiere a los vertebrados y en específico al SNC, se ha descrito que están involucrados en varios eventos celulares como la migración, la diferenciación, la proliferación, el crecimiento axonal y la sinaptogénesis,^{49,50} por lo que desempeñan un papel importante en la morfogénesis, la citoarquitectura y el mantenimiento de este sistema, tanto en etapas tempranas del desarrollo,⁵¹ como en el organismo adulto.

El papel fundamental de los PGCS en el SNC se hace evidente en los procesos iniciales del desarrollo en mamíferos, ya que están involucrados en la formación de conexiones específicas y en el establecimiento de las sinapsis neuronales para la generación de circuitos neuronales.^{49,52} Estos PGCS son sintetizados por las neuronas y por las células gliales en patrones de expresión espacio-temporal precisos y bien delimitados.^{53,54}

Además, los PGCS pueden presentar interacciones con la matriz extracelular (MEC)⁵⁵, teniendo un papel importante durante la histogénesis del SNC. Sin embargo, en el SNC de mamíferos adultos se ha comprobado una escasa capacidad para la regeneración y crecimiento axonal sobre todo en condiciones patológicas. Esta inhibición en el crecimiento está asociada a cambios en la expresión de componentes estructurales de la MEC,^{46,56,57} con un incremento en la expresión de PGCS que delimitan el sitio de lesiones físicas o químicas⁵⁸ en el SNC de los organismos adultos.

Matriz extracelular y Proteoglicanos de Condroitin Sulfato.

En el Sistema Nervioso Central los componentes de la MEC, incluyen varios factores neurotróficos, moléculas de superficie para la adhesión celular,

fibras de colágena, fibronectina, laminina, ácido hialurónico y proteoglicanos (PG), principalmente.^{59,60}

Los PG son macromoléculas de elevado peso molecular que se componen de un cuerpo glicoproteico, constituido por péptidos unidos a cadenas laterales de glicosaminoglicanos (GAG) mediante enlaces de unión tipo covalente. Cada cadena de GAG consiste de múltiples unidades de disacáridos arreglados en forma lineal, las cuales están constituidas por una forma del ácido urónico (ya sea ácido glucurónico o ácido idurónico que son estereoisómeros) y otro carbohidrato que puede ser N-acetilglucosamina ó N-acetilgalactosamina,⁶¹ (Figura 3) llegando a formar secuencias de hasta cientos de unidades de GAG. Por esta razón, existe una gran variabilidad tanto en el tipo de cuerpo proteico como en la composición y el número de las cadenas de GAG que conforman la molécula completa.⁶²

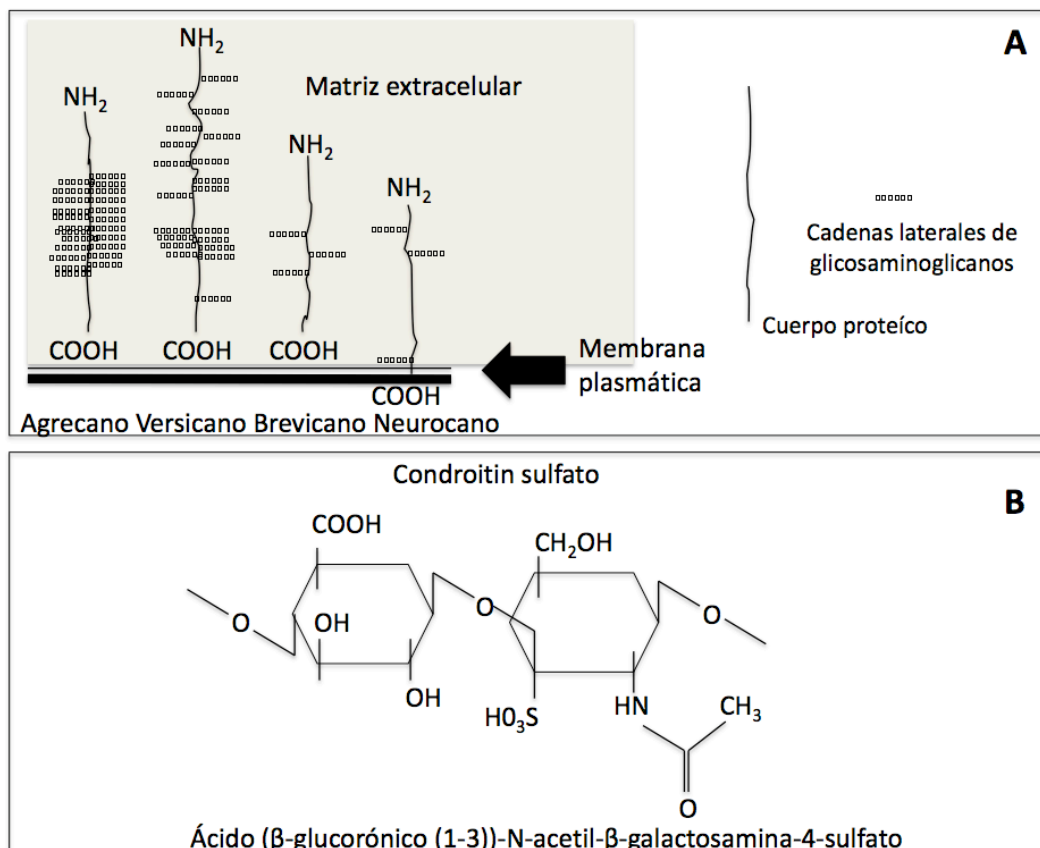


Figura 3. A) Esquema de algunos de los proteoglicanos de condroitin sulfato presentes en el sistema nervioso central de mamíferos, mostrando el extremo carboxilo (COOH) anclado a la membrana celular en el caso del neurocano, mientras que agrecano, brevicano y versicano se

localizan en la matriz extracelular (sombreada en gris). Los extremos amino de los péptidos se marcan con NH₂. El cuerpo proteico se representa con una línea y las cadenas de glicosaminoglicanos son representadas con círculos. B) Composición de los disacáridos que conforman las cadenas de glicosaminoglicanos en su unión con el cuerpo proteico. Modificados de Galtrey y Fawcett (2007)⁶³ y Bandtlow y Zimmermann (2000).⁶⁴

Las cadenas de GAG están conformadas por polímeros de hasta 200 repeticiones de disacáridos unidas al cuerpo proteico en el aminoácido serina por medio de uniones tipo azúcar conformadas por xilosa – galactosa - galactosa - ácido glucorónico. De esta forma, la xilosa se une a la serina del cuerpo proteico y el ácido glucorónico se une al heterodímero específico del GAG.^{64,65} Estas cadenas de GAG se pueden clasificar de acuerdo a la repetición del disacárido que lo constituye; de esta forma se tienen al condroitin sulfato, que es un disacárido de ácido glucorónico y N-acetilgalactosamina, (Fig. 1B) el dermatan sulfato que es un ácido idurónico unido a N-acetilgalactosamina, el heparan sulfato que es conformado por un dímero de ácido glucorónico y N-acetilglucosamina y finalmente el queratan sulfato que es un dímero de galactosa y N-acetilglucosamina.⁶⁴ Otra característica de los PGCS es que son moléculas sumamente aniónicas con tendencia a unirse a moléculas catiónicas formando interacciones químicas que desempeñan un papel muy importante en la formación de grandes agregados moleculares dentro de la misma MEC.⁶⁶ De acuerdo a las propiedades estructurales de los PG, éstos se pueden clasificar en cuatro familias: los hialectanos o lecticanos, los glicicanos, los sindecanos y un grupo IV o misceláneo que por sus características no es incluido dentro de estas tres familias anteriores, por no tener cadenas de GAG unidas al cuerpo proteico.⁶⁴

Inhibición del crecimiento axonal por PGCS.

El mecanismo intrínseco del SNC en respuesta al daño neuronal induce la proliferación y migración de astrocitos hacia el sitio de lesión, formando una cicatriz glial que contiene en gran proporción moléculas de PGCS, las cuales impiden el crecimiento y la regeneración axonal.⁶⁷ Particularmente el neurocano, el versicano y el brevicano son sobre expresados por astrocitos,

células precursoras de oligodendrocitos, y aún por células de las meninges si el daño ocurrió superficialmente. Varios grupos de investigación han demostrado el papel que desempeñan las cadenas sulfatadas de GAG o el cuerpo proteico de los PGCS como inhibidores del crecimiento axonal.

Se ha sugerido que la inhibición sucede en respuesta al daño mediante la activación de proteínas pequeñas GTPasas de tipo Rho que reconocen a los receptores para PGCS, activando el bloqueo de la polimerización de filamentos de actina presentes en el citoesqueleto celular y en las neuritas en crecimiento deteniendo la regeneración del cono de crecimiento. Además, las cadenas de GAG presentan una alta capacidad para unirse con otras moléculas inhibitoras del crecimiento axonal. Entre ellas destacan las glicoproteínas asociadas a mielina (MAG), glicoproteínas de mielina en oligodendrocitos (OMgp), la proteína NOGO y su receptor NOGO-66, la semaforina transmembranal 4D, así como la proteína efrina B3.⁶⁸ Todas estas proteínas se encuentran directamente en sitios de lesión y poseen en común la activación de la vía RhoA – ROCK mediante sus receptores neuronales, para interrumpir el crecimiento axonal, un mecanismo que aparentemente también presentan los PG.^{69,70} Dada la complejidad de las moléculas de PGCS, se cree que existen varias formas en las que pueden actuar inhibiendo el crecimiento de axones y neuritas.

Quimioatrayentes en el Sistema Nervioso Central

Los diversos tipos neuronales que constituyen el SNC de los vertebrados superiores, llevan a cabo conexiones sinápticas complejas y precisas de las cuales depende su adecuado funcionamiento. Sin embargo, cuando existen lesiones o enfermedades que alteran las redes neuronales, se producen deficiencias neurológicas permanentes debido a la capacidad regenerativa limitada del SNC en los mamíferos adultos.^{71,72}

La razón de dicha capacidad regenerativa restringida, es la inexistencia de crecimiento axonal posterior a un daño en los circuitos neuronales.⁷³ Esto se debe a que los oligodendrocitos que conforman el SNC miélinico, son fuertes

inhibidores del crecimiento de las neuritas ya que contienen diversos factores tales como la MAG, reticulón 4a (RTN4a/Nogo-A) y glicoproteína oligodendrocítica mielínica (OMgp),^{46,70,74,75} además de algunas otras moléculas inhibitorias pertenecientes a las canónicas familias de moléculas guías del crecimiento axonal como las semaforinas, efrinas y etrinas, así como proteoglicanos de condroitin sulfato.^{71,76,77}

Por otra parte, las moléculas que promueven el crecimiento y regeneración axonal. Entre éstas se incluyen moléculas de matriz extracelular, moléculas de adhesión celular y factores neurotróficos.⁷¹ A continuación se describen a detalle.

Efrinas

Son proteínas de señalización que se unen a receptores miembros de las familias cinasas de tirosinas EphA y EphB. Su expresión así como la de sus receptores continúa presente de manera robusta en el SNC de los roedores adultos así como, en la de los humanos.^{78,79} Ejemplos de efrinas de interés en el campo de regeneración del sistema nervioso son la efrina B3 que se expresa en el SNC mielínico, la efrina B2 presente en los astrocitos, así como la efrina A5 en el tallo rostral migratorio del SNC.⁸⁰

WNTS

Es otra de las familias de moléculas guía del crecimiento axonal. Son liberados al medio extracelular mediante gradientes en forma decreciente sobre el eje antero-posterior y su principal función es la de modular el crecimiento anterior de los axones pertenecientes a la comisura cerebral, como el crecimiento de los axones descendientes del tracto corticoespinal.⁸¹

Semaforinas

La familia de las proteínas semaforinas (Sema) es un amplio grupo que se caracteriza por su papel en la regulación de la migración celular, así como

por su importancia como moléculas guías del crecimiento axonal. Estas proteínas se encuentran expresadas en insectos, roedores y humanos, y es de llamar la atención su estructura tan preservada entre los diferentes grupos.⁸²

Se han descrito ocho clases de semaforinas. Las clases uno y dos se encuentran únicamente en invertebrados, las clases tres, cuatro, cinco, seis y siete se expresan en vertebrados, mientras que las semaforinas de clase 8 codifican para proteínas de tipo viral. Cabe señalar que los miembros de la clase dos y tres son proteínas secretadas, las semaforinas de clase uno, cuatro, cinco y seis son transmembranales, mientras que la clase siete corresponde a semaforinas unidas a glucosil-fosfatidilinositol. (Figura 4)

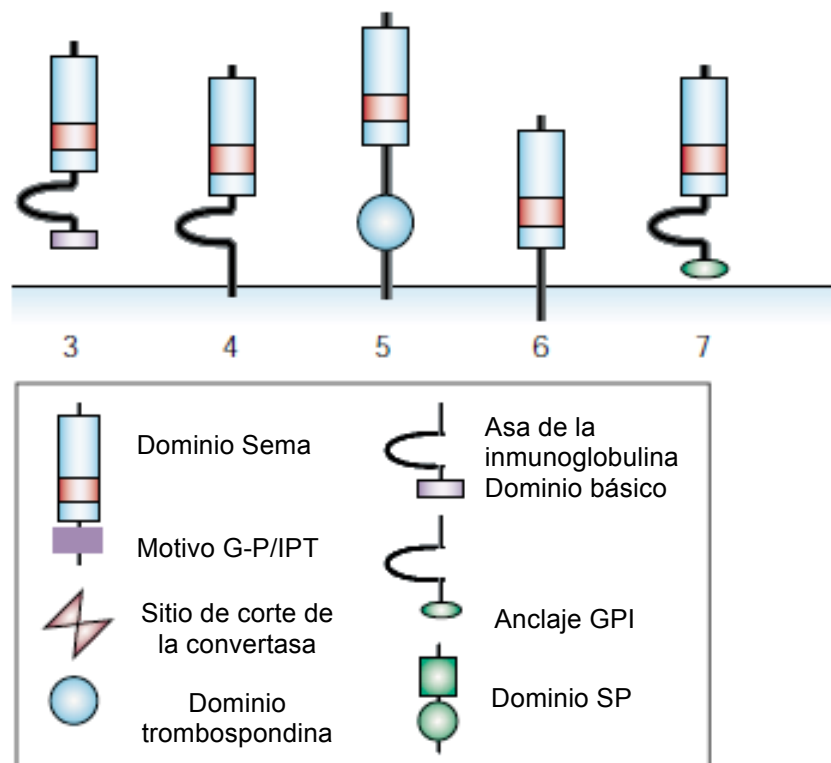


Figura 4. Organización estructural de las semaforinas en vertebrados. La clase 1 y 2 no mostradas aquí, pertenecen a invertebrados. Modificado de Trusolino L., et al., 2002.⁸³

Inicialmente, las semaforinas fueron caracterizadas y estudiadas en el desarrollo embrionario del sistema nervioso, donde actúan como quimiorrepelentes en varias poblaciones neuronales. Sin embargo,

sorprendieron los hallazgos que hacen referencia a Sema3C y Sema3B como quimioatrayentes con un papel importante en el crecimiento de los axones.⁸⁴⁻⁸⁶

La fuente de la diversidad de efectos biológicos de las semaforinas se encuentra en la variedad de receptores a través de los cuales estas proteínas inician diferentes cascadas de señalización. Entre ellos las neuropilinas, miembros de la familia plexina, los receptores uno y dos del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGFR1 y VEGFR2), las moléculas de adhesión L1 y NrCAM, así como receptores tales como Ron, Met y OTK.⁸⁷⁻⁹²

Papel de las semaforinas en el sistema nervioso

Las semaforinas son reguladores clave en el desarrollo del sistema nervioso; participan en la formación de importantes estructuras tales como la corteza cerebral, el hipocampo, el bulbo olfatorio, el sistema visual, el cerebelo, la médula espinal y los nervios periféricos. Asimismo, ejercen diferentes efectos en las etapas postnatales, lo cuales se describen en la Tabla 2 presentada a continuación.⁸² Representan una de las familias más destacadas de proteínas que sirven como guías para el crecimiento axonal, la cual se encuentra muy conservada entre los vertebrados. Se han reportado dos clases de receptores neuronales para estas proteínas las plexinas y las neuropilinas específicamente en el sistema nervioso, confirmando un papel importante en el crecimiento de proyecciones axonales. Por otra parte, en semejanza a como sucede en el periodo embrionario, en las neuronas del ganglio de la raíz dorsal en organismos adultos, muestran un colapso en el crecimiento del cono axonal a consecuencia de la aplicación aguda de semaforina 3A *in vitro*.⁹³ Por el contrario, se ha demostrado en un modelo de axotomía del nervio olfatorio en ratas, que la semaforina 3A acelera la regeneración axonal. Y que tiene un papel estimulante en el crecimiento de los axones de neuronas serotoninérgicas que expresan el receptor neuropilina 1, tras el daño en la médula espinal. En ese mismo modelo se encontró, que bloqueando la señalización de la semaforina, no se llevaba a cabo el crecimiento neuronal.⁹⁴ Por otra parte, la semaforina 4D encontrada en oligodendrocitos, que transitoriamente es sobre expresada cerca de sitios de lesión en la médula

espinal, inhibe el crecimiento postnatal de neuritas cerebelares y sensoriales en un modelo *in vitro*.⁹⁵ La semaforina 7A es expresada por los oligodendrocitos en la materia blanca de la médula espinal⁹⁶ y semaforina 6B está fuertemente sobre expresada cerca de sitios de lesión.⁹⁷ En conclusión, las semaforinas son señales bifuncionales capaces de promover o inhibir el crecimiento axonal.

Tabla 2. Papel de las semaforinas en el sistema nervioso. Modificado de Roth L., et al. 2009. ⁸²

Estructura del Sistema Nervioso	Sema	Función
Nervios periféricos	Sema3A	Repele los axones y contribuye al establecimiento de las conexiones apropiadas en el Sistema Nervioso Periférico. Taniguchi M, et al. 1997; Kawasaki T, et al. 2002
	Sema3A, Sema3F	Pueden contribuir de manera positiva a la regeneración parcial de los nervios periféricos. Scarlato M, et al. 2003
Corteza cerebral	Sema3A, Sema3F	Regulan la migración de las células productoras de GABA durante el desarrollo de la corteza. Tamamaki N, et al. 2003
	Sema3A, Sema3C	Establecen la trayectoria inicial de los axones corticales en crecimiento. Luo Y, et al. 1993; Polleux F, et al. 1998
	Sema3A	Promueve el crecimiento y la ramificación de las dendritas corticales. Polleux F, et al. 2000; Fenstermaker V, et al. 2004
Hipocampo	Sema3A, Sema3C	Regula la correcta orientación de las fibras aferentes y eferentes. Pozas E, et al. 2001; Skutella T, et al. 2001
	Sema3A	Regula la transmisión sináptica en los circuitos neuronales en el hipocampo maduro. Sahay A, et al. 2005; Bouzioukh F, et al. 2006
	Sema6A	Controla la proyección de las fibras musgosas hipocampales hacia la capa adecuada. Suto F, et al. 2007
Cerebelo	Sema6A	Se expresa en las neuronas tangenciales que enfrentan un proceso de migración y controla el inicio de la migración de células radiales. Kerjan G, et al. 2005
	Sema3A	Induce el colapso de las fibras ponto-cerebelares. Rabacchi S, et al. 1999
	Sema3C	Induce la neuritogénesis de las células granulares <i>in vitro</i> . Moreno-Flores M, et al. 2003
	Sema3F	Atrae los axones de las células granulares durante el desarrollo del cerebelo. Ding S, et al. 2007
Sistema olfatorio	Sema3A	Contribuye en la construcción de mapas de olores en el bulbo olfatorio. Taniguchi M, et al 2003
	Sema3B, Sema3F	Repele y atrae los axones del bulbo olfatorio, respectivamente. De Castro F, et al. 1999
Sistema visual	Sema3A	Controla la innervación de la córnea por axones del trigémino e induce colapso en axones de células ganglionares de la retina maduras. Lwigale P, et al. 2007

	Sema3E	Dirige la exclusión de axones de células ganglionares de la retina en capas específicas. Steinbach K, et al. 2002
	Sema3D	Guía los axones ganglionares de la retina hacia el tracto óptico contralateral. Sakai J, et al. 2006
	Sema5A	Puede contribuir a la falta de regeneración del nervio óptico posterior a una axotomía. Goldberg J, et al. 2004

Planteamiento del problema.

Este proyecto tiene como propósito establecer la posibilidad de promover el crecimiento axonal dirigido de la *substantia nigra* hacia el estriado en animales adultos lesionados con la toxina 6-OHDA, implantados intranigralmente con células troncales embrionarias de ratón diferenciadas a neuronas dopaminérgicas.

Hipótesis

Al degradar moléculas de la matriz extracelular que inhiben el crecimiento axonal o al utilizar quimioatrayentes para el correcto direccionamiento de las proyecciones axonales, las neuronas dopaminérgicas trasplantadas intranigralmente podrán dirigir sus axones hacia el estriado en nuestro modelo de comunicación nigro-estriatal en ratas lesionadas con la toxina 6-OHDA.

Objetivo General.

a) Dirigir y promover el crecimiento hacia el estriado de axones provenientes de neuronas dopaminérgicas derivadas de células troncales embrionarias de ratón y trasplantadas en la sustancia nigra en ratas parkinsonianas.

Objetivos Particulares.

a) Diferenciar NDA a partir de CT embrionarias de ratón.

b) Obtener NDA y trasplantarlas en el estriado y la *sustancia nigra* de ratas hemiparkinsonianas, para comparar la recuperación funcional entre ambos grupos.

c) Probar si la degradación de PG que inhiben el crecimiento axonal promueve la regeneración de la vía nigro-estriatal luego del trasplante de NDA en la *sustancia nigra* en animales adultos lesionados.

d) Dirigir y promover el crecimiento de axones mediante el uso de moléculas quimiotróficas.

Relevancia e impacto.

Buscamos condiciones para la restitución anatómica, fisiológica y funcional de la vía nigro-estriatal en un modelo murino de la enfermedad de Parkinson, el primer paso es demostrar si las NDA trasplantadas en su sitio ontogénico pueden recuperar la asimetría conductual y más aún si pueden hacer sinapsis con su estructura diana. De ser el caso, estos experimentos pueden sentar las bases del conocimiento en terapias de sustitución celular y direccionamiento axonal requeridos en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas.

Estrategias y métodos.

Cultivo Celular.

Diferenciación in vitro de CT embrionarias a neuronas dopaminérgicas.

Proliferación celular de CT.

Utilizamos CT embrionarias de la línea celular R1, las cuales preservamos y amplificamos mediante una capa nodriza de fibroblastos de ratón embrionario (MEF por sus siglas en inglés; mouse embryonic fibroblast) de la cepa CF1 los cuales fueron inactivados mitóticamente mediante una fuente de cesio emitiendo radiación gamma con una exposición de 3000 rads (Gammacell 2000, USA), en presencia de 1000 U ml⁻¹ del factor inhibidor de leucemia (LIF; Chemicon, USA) en medio de cultivo celular para CT embrionarias compuesto de knockoutTM DMEM (Dulbecco's modified Eagle medium GIBCO/BRL, USA) suplementado con 15% de suero fetal bovino (Wisent, Canada), 100 µM de aminoácidos no esenciales, 10 µM de 2-mercaptoetanol, 2 mM L-glutamina y penicilina/estreptomicina (todo de GIBCO/BRL, USA).

Diferenciación neuronal. Protocolo de 5 etapas.

Para la diferenciación hacia un linaje específico de neuronas DA utilizamos el protocolo descrito previamente en Kim J. *et. al.* y Diaz N. *et. al.* ^{29,98,99} Este método es utilizado de manera rutinaria en nuestro laboratorio y en otras partes del mundo, el cuál como su nombre lo indica consiste de 5 pasos que a continuación se describen brevemente:

Etapas 1. Las CT embrionarias de ratón son sembradas en platos de cultivo de 10 cm cubiertos con gelatina en presencia de LIF (Chemicon, USA), con medio knockout DMEM (KO-ES, Gibco-Invitrogen, USA) suplementado con 15% de suero fetal bovino (Wissent Bio products, Canada), 100 mM de aminoácidos no esenciales, 10 µM 2-mercaptoethanol, 2 mM L-glutamina y penicilina-

estreptomycin (todo de GIBCO/BRL, USA). Para inducir la formación de cuerpos embrionarios (EB's por sus siglas en inglés; embryonic bodies) **Etapa 2**, las células fueron disociadas con tripsina al 0.05% (Gibco-Invitrogen, USA) y sembradas en platos de cultivo bacterianos a una densidad de $2 \times 10^6/57 \text{ cm}^2$ en presencia de 1000 u/ml de LIF. Los EB's fueron cultivados durante 4 días y sembrados en platos de cultivo en medio celular antes descrito. Después de 24 horas, la selección de células positivas a nestina (**Etapa 3**) inicio reemplazando el medio de cultivo celular KO-ES por medio de cultivo celular ITS (Insulina/Transferrina/Selenito) eliminando la adición de suero fetal bovino, en esta etapa son suficientes de 7 a 12 días en selección para posteriormente disociar las células con tripsina al 0.05% y sembrar nuevamente en cajas de 24 pozos con presencia o ausencia de cubreobjetos previamente cubiertos con poli-L-ornitina a una concentración de 15 mg ml^{-1} , (Sigma, USA) y laminina obtenida de ratón ($1 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$, Becton Dickinson, USA), en esta nueva **Etapa 4** se sembraron las células a una densidad de $1 \times 10^5/\text{cm}^2$ en medio de cultivo celular N2 (Gibco-Invitrogen, USA) el cual consiste de DMEM/F12 (500ml) adicionado con 0.775 g de glucosa, 0.0365 g de glutamina, 0.845 g de bicarbonato de sodio, 0.0125 g de insulina, 0.05 g de transferrina, 50 μl de putrescina (100 μM), 30 μl de selenito de sodio (30 nM) y 100 μl de progesterona (10 nM). En esta etapa del protocolo de diferenciación se suplementa con las siguientes citosinas 10 ng ml^{-1} , FGFb (Prepotech, USA), 100 ng ml^{-1} FGF 8 (Prepotech, USA) y 100 ng ml^{-1} de SHH humano (R&D Systems, USA) durante 4 días para la expansión e instrucción hacia un destino final dopaminérgico. Al final de esta etapa e inicio de la **Etapa 5** en el proceso de diferenciación celular se retiran los factores del medio de cultivo N2 y únicamente es suplementando con 200 μM de ácido ascórbico (Sigma-Aldrich, USA) durante otros 3-4 días en el mismo plato de cultivo celular. (Tabla 3)

Tabla 3. Resumen de la Generación de neuronas dopaminérgicas a partir de células troncales embrionarias (CTE) mediante el protocolo de diferenciación de 5 etapas.

Etapa	Condición de cultivo y tipo celular presente
1	Expansión de CTE indiferenciadas en medio conteniendo suero en presencia de LIF
2	Crecimiento en suspensión de cuerpos embrionarios en medio con suero conteniendo LIF
3	Selección de precursores neuronales positivos a nestina en medio libre de suero
4	Proliferación de células neurales positivas a nestina estimuladas con FGF2, FGF8 y SHH
5	Diferenciación neuronal retirando los factores de crecimiento

LIF, factor inhibidor de leucemia; FGF, factor de crecimiento fibroblástico; SHH, sonic hedgehog.

Técnica de Inmunocitoquímica.

Tanto las células como los cortes de cerebros fueron fijados con paraformaldehído al 4% en solución amortiguadora fosfatada (PBS) de acuerdo a protocolos estandarizados ya establecidos^{29,98,100}. En el caso particular de los cortes de cerebros estos fueron resecados, procurados y preparados mediante gradientes de concentración en solución conteniendo sacarosa al 10%, 20% y 30% todo esto se realizó con 24 horas de separación entre cada pasaje¹⁰¹, transcurrido este tiempo los cerebros fueron criopreservados a -20 grados centígrados para posteriormente ser cortados en rebanadas de tipo longitudinal con ayuda de un criostato (Leica CM 1850, Alemania). El tejido cerebral fue cortado a un espesor de 20 - 30 micrómetros para poder visualizar la vía que comunica la *substantia nigra* con el estriado involucrando el sitio del trasplante. Las células obtenidas *in vitro* y los cortes de cerebro procurados fueron incubados en una solución de bloqueo y permeabilización (10% de

suero normal de cabra; Gibco-Invitrogen, USA, al 0.1% de tritón X-100; Sigma-aldrich, USA en buffer de fosfatos) durante 45 minutos, posteriormente previo retiro de la solución de bloqueo y permeabilización, se procedió a la incubación con los siguientes anticuerpos primarios, ya sea solos o en combinación; anti Oct3-4 hecho en ratón a una concentración de 1:1000 (BD Biosciences Pharmingen, USA); anticuerpo anti-Sox2 hecho en conejo 1:100 (Chemicon, USA); anticuerpo anti- β Tubulina tipo III de ratón 1:1000 (Covance, USA); anticuerpo anti-tirosina hydroxylasa (TH) hecho en conejo a una concentración 1:1000 (Pel-freez, USA); anticuerpo anti-TH de ratón 1:1000 (Sigma, USA); anticuerpo anti-Nestina hecha en conejo 1:100 (una donación del Dr. Ron McKay, NIH); anticuerpo anti-Engrailed1 (En1) hecho en ratón 1:1 (Developmental Hybridoma Studies Bank, USA); anticuerpo anti-condroitin sulfato (CS-56) de ratón, el cual reconoce las formas completas de los PGCS 1:200 (Sigma, USA); anticuerpo anti-2B6 hecho en ratón, que reconoce la forma hidrolizada de los PGCS 1:100 (Heikagaku Corp. Japan); anticuerpo anti-GFAP de conejo 1:1000 (DAKO, Denmark); anticuerpo anti-Girk2 hecho en conejo (Alomone, Israel) 1:80; anticuerpo anti-Sema3A (Abcam, USA) 1:500, y anticuerpo anti-Sema3C 1:500 (Abcam, USA); y anticuerpo anti-Human nuclei (HuNu) clona 235-1 el cual se une al núcleo de todas las células humanas 1:400 (Millipore, USA). Dentro de esta metodología se recuperó el anticuerpo primario y se realizaron 3 lavados de cinco minutos cada uno de ellos con PBS conteniendo 10% de albúmina sérica bovina (Fracción V, grado RIA y ELISA; Calbiochem, USA), finalmente las preparaciones fueron expuestas a sus respectivos anticuerpos secundarios fluorescentes Alexa-568 anti-IgG ratón y Alexa-488 anti-IgG conejo (Molecular Probes, USA), la tinción de núcleos fue hecha con Hoechst 33258 (16 mM) (Invitrogen, USA). Al igual que los cortes las células fueron montados en cubreobjetos con medio de montaje (polyaquamont Polysciences Inc., USA) para su posterior análisis histológico. Todos los controles negativos consistieron en omitir el anticuerpo primario en la respectiva incubación, resultando en ningún marcaje en todos los casos.

Adquisición de imágenes bajo microscopia confocal.

Todas las preparaciones fueron visualizadas utilizando un microscopio confocal FV1000 (Olympus, Japón) para detectar los siguientes fluoróforos Alexa 488 el cual se absorbe en 495 nm y emite en 519 nm, Alexa 568 (absorción 578, emisión 603) y Hoechst 33258 (352/461 nm) de manera secuencial siendo excitados por diferentes láseres. Imágenes digitales de manera individual fueron capturadas para cada fluorocromo utilizando el objetivo Super Apocromático 40x (N.A. 1.3., Olympus, Japón). Asimismo, para establecer la co-expresión de los marcadores imágenes superpuestas dentro del eje de las x fueron realizadas.

Estudios In vivo.

Se utilizaron 80 ratas Wistar hembras de 240 g en promedio, bajo el estricto manejo de acuerdo a las especificaciones técnicas para el cuidado y uso de animales de laboratorio de la Norma Oficial Mexicana (NOM 002-Z00-1999) en vigencia y de la Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, National Institutes of Health. Estas fueron divididas en diez grupos de estudio que a continuación se resumen: Grupo de experimentación **1** ó grupo control con una n=7, este grupo consistió de trasplante en el estriado únicamente con medio de cultivo celular (N2) en ratas previamente lesionadas con la toxina 6-hidroxidopamina (6-OHDA); grupo de experimentación **2** con una n=12, en este grupo se realizó el trasplante de 5×10^5 neuronas dopaminérgicas en el estriado de ratas previamente lesionadas con 6-OHDA; grupo de experimentación **3** con una n=7, el cuál recibió únicamente la enzima condroitinasa ABC (ChABC) en 6 depositos de 0.5 μ l cada uno de ellos, comunicando en línea recta la SN con el estriado; grupo de experimentación **4** con una n=7, estos animales recibieron trasplante de NDA en la SN más la enzima ChABC en una trayectoria lineal hacia el estriado; grupo de experimentación **5** con una n=8, consistió sólo del trasplante de 1.6×10^5 NDA en la SN; grupo de experimentación **6** con una n=8, trasplante en la SN de NDA mas células que se trasfectaron sin el vector a utilizar; grupo de experimentación **7** con una n=4, en este grupo se realizo el trasplante de células HEK (por sus siglas en ingles Human Embryo Kidney) que

sobreexpresaban el péptido de semaforina tipo 3A en la SN hacia el estriado; grupo de experimentación **8** con una n=7, trasplante de células HEK que sobreexpresan la semaforina clase 3C en la SN con dirección hacia el estriado; grupo de experimentación **9** con una n=5, consistió de NDA trasplantadas en la SN en combinación con células HEK sobreexpresando la semaforina 3A en dirección hacia el estriado; grupo de experimentación **10** con una n=15, trasplante de NDA en la SN con células HEK sobreexpresando semaforina 3C hacia el estriado. Los grupos de estudio se resumen en la tabla 4.

Tabla 4. Resumen de los grupos de experimentación.

	Número de rotaciones contralaterales			Número de pasos				Ajuste del miembro torácico contralateral				Uso del miembro torácico en libre exploración			
	n	Pre-injer to	45 días	Lado Lesionado		Lado Intacto		Lado Lesionado		Lado Intacto		Lado Lesionado		Lado Intacto	
				Pre-injer to	45 días	Pre-injer to	45 días	Pre-injer to	45 días	Pre-injer to	45 días	Pre-injer to	45 días	Pre-injer to	45 días
Trasplante estriatal															
Grupo 1 (Sham)	7	573±32	935±47	2.4±0.2	2.5±0.3	12.2±0.4	12.1±0.7	1.9±0.3	2.0±0.3	7.2±0.2	7.3±0.2	3.8±0.6	3.8±0.3	14.6±0.3	14.7±0.3
Grupo 2, NDA	12	568±19	310±13*	2.2±0.2	9.9±0.6*	12.7±0.3	13.0±0.3	1.9±0.2	4.4±0.2*	7.7±0.2	7.3±0.3	3.7±0.4	8.7±0.4*	14.4±0.3	14.5±0.4
Trasplante en la SN más ChABC															
Grupo 3, Sham+Ch ABC	7	483±42	636±32	2.5±0.2	2.6±0.3	12.1±0.3	12.1±0.7	2.2±0.2	1.9±0.3	7.2±0.3	7.4±0.3	3.8±0.2	3.7±0.3	14.1±0.3	13.9±0.3
Grupo 4, NDA+ChA BC	7	502±19	582±63	2.4±0.2	4.7±0.7*	12.6±0.4	12.8±0.5	2.1±0.3	3.0±0.6	7.1±0.3	7.3±0.4	3.4±0.3	4.0±0.4	14.1±0.3	13.7±0.4
Trasplante intranigral más Semaforinas de clase 3															
Grupo 5, NDA	8	497±40	733±50	2.4±0.4	2.2±0.4	11.4±0.3	13.1±0.3	1.9±0.4	1.6±0.3	7.2±0.2	7.1±0.3	3.9±0.7	3.3±0.7	14.2±0.6	13.9±0.6
Grupo 6, NDA+mock	8	460±24	721±22	2.4±0.2	2.3±0.2	10.9±0.4	12.3±0.2	1.7±0.4	1.6±0.4	7.4±0.3	6.8±0.3	3.4±0.8	3.2±0.6	14.5±0.6	13.2±0.6
Grupo 7, Sema3A	4	477±36	768±41	2.3±0.3	2.2±0.4	10.7±0.4	12.1±0.4	1.8±0.4	1.7±0.4	7.1±0.4	7.6±0.2	3.6±0.7	3.0±0.8	14.2±0.7	15.0±0.6
Grupo 8, Sema3C	7	498±25	731±18	2.4±0.2	2.1±0.3	11.0±0.4	12.3±0.2	1.7±0.3	1.7±0.5	7.2±0.4	7.5±0.4	3.4±0.7	3.4±0.9	14.1±0.8	14.7±0.6
Grupo 9, NDA+Sema3A	5	551±68	505±35*	2.5±0.4	4.8±0.4*	11.5±0.4	12.5±0.4	2.7±0.4	2.8±0.5	7.1±0.3	7.4±0.4	5.0±0.8	5.7±1.0	14.3±0.7	14.5±0.7
Grupo 10, NDA+Sema3C	15	535±31	367±20*	2.4±0.2	6.1±0.2*	11.4±0.2	11.7±0.2	1.9±0.3	4.1±0.2*	7.3±0.3	7.1±0.2	3.5±0.5	8.0±0.4*	14.5±0.7	13.7±0.5

Lesión con 6-OHDA, trasplante y pruebas conductuales.

La lesión, el trasplante y la evaluación conductual fue hecha como se describe en Kim JH, *et. al.* ²⁹ Para la correcta identificación y marcaje de cada individuo dentro de los diferentes grupos de experimentación se colocó de manera subcutánea un microchip de identificación (ID TAGS, Allflex USA) en la zona inter-escapular para poder monitorear a la rata durante todo el periodo de estudio correspondiente.

Lesión 6-OHDA.

Las ratas fueron anestesiadas con sevoflorano (Sevorane Abbot, México) a dosis de inducción (3.5%) y 0.5% de mantenimiento en una mezcla de oxígeno y bióxido de carbono (95%-5% respectivamente), previa desinfección y preparación del sitio de incisión con yodo povidona las ratas fueron colocadas en el equipo digital estereotáxico (Dual Digital Lab Standard Stereotaxic, Stoelting USA), y se realizaron microinyecciones de 6-OHDA con un equipo automatizado (Quintessential Stereotaxic Injector, Stoelting USA) (8 µg disueltos en 4 µl de solución salina fisiológica con 0.05% de ácido ascórbico, Sigma-Aldrich USA) en el fascículo medial del cerebro anterior con las siguientes coordenadas estereotáxicas: (en milímetros, de acuerdo al atlas de Paxinos y Watson) antero-posterior (AP); -1 tomando como referencia la sutura Bregma, medio-lateral (ML); +1.5 y para la lectura dorso-ventral (DV) la coordenada se inicio a partir del cráneo – 7.5. Posteriormente se procedió al cierre quirúrgico de la herida y se colocaron grapas (EZ Clips TM, Stoelting USA) para confrontar el sitio de la incisión.

Transplante estriatal de ratas lesionadas con 6-OHDA.

Preparación de suspensión de células a trasplantar.

Utilizando el protocolo de inducción neuronal de 5 etapas antes descrito, las CT embrionarias de ratón R1 una vez diferenciadas se despegaron del plato de cultivo con tripsina-EDTA (0.05 %) y posteriormente se realizó el

conteo celular adicionando a la suspensión celular azul de tripano para poder ser visualizados dentro de un hemocitómetro. (Sigma Aldrich, USA)

Posterior a la disociación y el conteo celular de las neuronas diferenciadas a partir de CT embrionarias de ratón estas fueron resuspendidas en 3 μ l de medio celular conteniendo 5×10^5 células para ser trasplantadas por hospedero. Las células se mantuvieron en hielo y dentro de la campana de flujo laminar hasta ser utilizadas.

Procedimiento quirúrgico.

Un día antes se seleccionaron a los candidatos para recibir trasplante celular y se les administró ciclosporina A (1mg/kg Sandimmun Novartis, Francia) de manera intraperitoneal (IP).

Previo al procedimiento quirúrgico se obtuvo el peso corporal de los animales para ser anestesiados con sevoflorano al 3.5% en dosis de inducción y al 0.5% en dosis de mantenimiento con una mezcla de oxígeno y bióxido de carbono 95%-5% respectivamente, una vez realizado esto la rata se colocó en el equipo estereotáxico.

Se delimitó y preparó el área quirúrgica, posterior a la tricotomía y desinfección con yodo/alcohol en tres ocasiones, la incisión fue realizada en la línea media del cráneo, para exponer la sutura de referencia Bregma. Una vez expuesta se tomaron las siguientes coordenadas AP: + 0.0, ML: + 3.0, la lectura DV - 6.0 se calculó a partir del cráneo con la punta del microinyector fijado a la torre del equipo estereotáxico, conteniendo 3 μ l de la suspensión celular o 3 μ l únicamente de medio celular dependiendo del grupo de estudio, al alcanzar 6 mm de profundidad se realizaron dos depósitos con un volumen de 1.5 μ l por depósito hasta infundir un total de 5×10^5 células por rata (3 μ l totales), retirando muy lentamente el inyector del sitio del trasplante y esperando 5 minutos con la intención de que no se removieran mecánicamente o por capilaridad las células del trasplante antes de sacar por completo el inyector.

Concluida esta operación, se procedió al cierre de la herida quirúrgica afrontando individualmente los planos tisulares con grapas quirúrgicas (9 mm, Reflex corp, USA.) y limpiando la zona con agua oxigenada y clorhexidina al 2%. Todos los animales se mantuvieron en observación y fueron monitoreados estrictamente hasta su completa recuperación. Inmediatamente después de la cirugía a todas las ratas se les administró enrofloxacina (5mg/kg ip, sid. Bayer, México) durante 7 días para evitar posibles infecciones y complicaciones post quirúrgicas, además se continuó con el tratamiento de ciclosporina A (1 mg/kg IP, SID) para evitar cualquier reacción de rechazo inmunológico durante todo el periodo de estudio.

Reconstrucción de la vía nigro-estriatal.

Inyección en ángulo.

Con el propósito de reconstruir la vía nigro-estriatal, en ratas lesionadas con 6-OHDA, realizamos dos estrategias para comunicar a la SNpc con el estriado. (Figura 5)

La primera de ellas consistió en tratar de modificar el microambiente adverso, digiriendo enzimáticamente a las cadenas de condroitin sulfato mediante el uso de la condroitinasa ABC para facilitar el crecimiento axonal de las NDA implantadas en la SNpc hacia el estriado y la segunda estrategia consistió en introducir un co-trasplante con células HEK293 que sobre-expresaran moléculas quimiotrópicas (semaforina 3A y 3C) a lo largo de la trayectoria nigro-estriatal para promover la proyección de axones hacia el estriado.

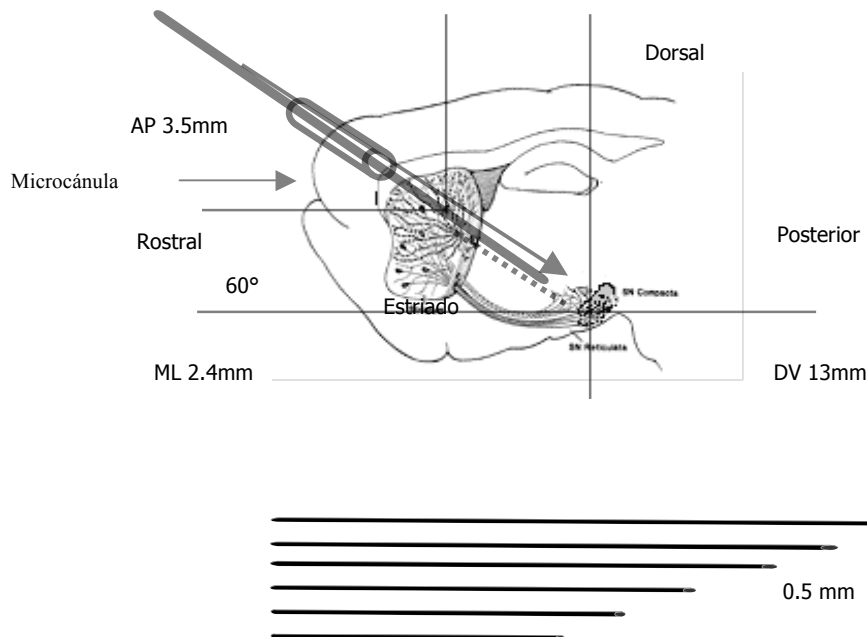


Figura 5. Representación esquemática de la inyección en ángulo. En el esquema A) se observa la cánula intracraneal que sirve como guía para los inyectores, en B) se representa el tamaño de los inyectores que fueron utilizados para realizar diferentes sitios de administración periódica de la enzima.

A) Digestión enzimática cadenas de PGCS. Modificación del microambiente.

Para eliminar la inhibición del crecimiento axonal que es ejercida por la moléculas en la MEC principalmente PGCS y promover la extensión de axones de la SN al estriado, nuestra primera estrategia consistió en implantar una cánula intracraneal en ratas hemiparkinsonianas y secuencialmente administramos infusiones de Condroitinasa ABC (ChABC) en solución para degradar moléculas de PGCS y favorecer la proyección de axones de nuestro injerto celular. Con la finalidad de conseguir esto, implementamos un sistema de cánulas y estiletes con largo disminuido entre si (cada uno de los inyectores es menor 0.5mm del anterior) a los días 0, 3, 6, 9, 12 y 15 después de realizar el trasplante de NDA en la SN. Gracias a esta disposición la enzima ChABC fue administrada muy cerca del estriado dorsal en la última inyección.

Para la cirugía estereotáxica la cabeza de la rata hemiparkinsoniana fue inclinada 60° y cada una de ellas recibió una suspensión de 2µl conteniendo 0.33×10^6 de NDA derivadas de CTE de ratón en la SN del lado lesionado,

utilizando las siguientes coordenadas estereotáxicas a partir de Bregma: AP, 3.5mm; LM, 2.4mm; VD, -13mm. Estas coordenadas atraviesan la corteza, el estriado, la capsula interna, el tálamo, la zona incierta para finalmente alcanzar la SN. En la misma cirugía un catéter fue implantado en el cráneo para permitir las inyecciones de ChABC en los días posteriores del tratamiento. La enzima ChABC fue administrada a 0.01 U/ μ l en un total de 6 depósitos de 0.5 μ l cada uno de ellos, retrayendo el inyector 0.5mm en cada ocasión. Fig. 2a, 2b.

Las pruebas conductuales farmacológicas y no farmacológicas fueron realizadas cada 15 días hasta completar el tiempo de estudio, en el grupo control la enzima ChABC se administró en ausencia de NDA (sham + ChABC), con la misma trayectoria y características que el anterior. Fig. 2

B) Co-trasplante NDA y células HEK sobre-expresando semaforina 3A y semaforina 3C.

Para expresar la proteína Sema3A o la proteína Sema3C, células HEK293 fueron trasfectadas mediante lipofección utilizando el reactivo Fugene (Roche, USA). Fue necesario 1 μ g/ μ l del vector de expresión conteniendo la secuencia codificante de las semaforinas (donación del Dr. Varela A, INB. UNAM) en 25×10^5 células HEK293. Teniendo un 35% de trasfección celular (Figura 18). La cantidad de Semaforina liberada al medio por las células HEK fue cuantificada mediante ELISA. Figura 21

Trasplante Dopaminérgico.

Las neuronas DA fueron dissociadas al día 3 de la etapa 5 de diferenciación y re-suspendidas a 1.67×10^5 células/ μ l. Utilizando el mismo procedimiento de abordaje previamente descrito para la enzima ChABC (aproximación en ángulo con el objetivo de comunicar la SN con el estriado), ambos tipos celulares fueron cargados en la misma cánula, quedando al principio del inyector las NDA y separadas por una pequeña burbuja de aire (1ul) en la misma tubería que las células HEK293, de esta forma se pudo implantar en un solo abordaje quirúrgico ambos tipos celulares.

Una vez cargado el inyector se procedió a implantar en un solo depósito (2µl) un total de 3.3×10^5 de NDA derivadas de CTE de forma intranigral en el hemisferio lesionado de las ratas hemiparkinsonianas, para posteriormente administrar las células que sobre expresaron semaforinas, realizando un total de 6 depósitos de 7×10^3 de células HEK293 (0.5 µl cada uno) iniciando en -12.5mm ventral y retrayendo el inyector 0.5mm en cada ocasión.

Reto farmacológico con apomorfina (prueba de rotaciones).

Posterior a la administración de apomorfina (1 mg/kg, Sigma USA) de manera subcutánea los animales lesionados fueron colocados dentro del equipo de actividad rotacional (rotometría) que físicamente cuenta con un cilindro plástico, un tazón de metal, un arnés para la rata y un dispositivo electrónico que contabiliza el número total de giros por hora (Roto-rat MED-RRS, Med Associates INC, USA). Los animales fueron monitoreados cada 15 días hasta concluir un plazo de seis semanas. La apomorfina, al ser un agonista dopaminérgico se comporta igual que el neurotransmisor, causando una mayor activación de los receptores de dopamina en el estriado lesionado, las ratas al no haber recibido dopamina en mucho tiempo en el estriado lesionado se encuentran hipersensibles en la región en comparación con el lado intacto, ocasionando que este hemisferio lesionado domine al contralateral del sitio de lesión, siendo evidenciado por una conducta giratoria por parte de las ratas, se consideró como candidatos para recibir trasplante sólo aquellos animales que mostraron más 7 giros contralaterales por minuto descartando del proceso de selección a todos aquellos que presentaron valores por debajo de esta cifra.

Pruebas conductuales no-farmacológicas.

Prueba de ajuste de pasos (stepping).

Esta evaluación fue desarrollada como se describe en Olsson M. .⁴³ la prueba consiste en sujetar con una mano por el abdomen a la rata levantando

sus miembros pélvicos y después desplazarla lateralmente 90 cm sobre la superficie de la mesa en un periodo de 5 segundos, sólo se tiene apoyo de una sola extremidad torácica sobre la mesa con la intención de que la rata apoye y restablezca el contacto rápidamente con la superficie de la mesa. Cada miembro torácico anterior fue independientemente evaluado contando el número de ajustes en cada paso en la superficie de la mesa. La prueba fue realizada seis veces durante tres días consecutivos. El valor del miembro lesionado fue normalizado con el número de pasos registrados del miembro intacto en esta prueba, y representado en las graficas como porcentaje del valor no lesionado para cada grupo. En la tabla no. 1 se resume la actividad de esta prueba pre y post-trasplante.

Prueba de apoyo de miembro torácico.

La rata fue sostenida en el aire sobre una mesa, dejando los miembros torácicos libres. El animal fue acercado al borde de la mesa suavemente permitiendo el roce de los bigotes táctiles independientemente de cada lado con la intención de que la rata intente sujetarse ya sea con el miembro torácico derecho o izquierdo con el filo de la mesa. El número de contactos de cada miembro superior con el borde de la mesa fue cuantificado en diez intentos y estos fueron considerados como una respuesta satisfactoria. El porcentaje de éxito contra-lateral (lesionado) usado es representado relativo al lado no lesionado, el cual sirve como actividad basal¹⁰². El valor promedio pre y post-trasplante para ambos miembros es mostrado en la tabla no. 1.

Exploración libre en cilindro.

La actividad exploratoria fue analizada filmando cada animal en un cilindro transparente de acrílico (35 cm de diámetro por 40 cm de alto) durante un periodo de tiempo de 7 a 10 minutos. Contactos de cada miembro anterior con la pared del cilindro fueron grabados, y el porcentaje de cada lado lesionado, relativo al miembro no lesionado fue calculado²⁹. El promedio (+/- SEM) del número de contactos antes y después del trasplante para cada condición es resumido en la tabla no.1.

Microdiálisis y cuantificación de dopamina

Los experimentos con microdiálisis fueron desarrollados a las 7 semanas posterior al trasplante intra estriatal o co-trasplantados con células HEK293 y neuronas DA de manera intranigral para medir la cantidad de DA liberada en la región estriatal³⁹. Después de 1 hora de estabilización de las membranas con solución de Hanks tres muestras basales fueron colectadas y la liberación de DA fue estimulada con solución salina balanceada de Hanks isosmótica conteniendo 56 mM KCl (alto potasio) a través de una membrana de microdiálisis de 4-mm. La cuantificación de DA fue realizada usando un sistema de electroforesis capilar (Beckman Coulter, P/ACE MDQ con fluorescencia inducida por láser; con una lámpara de argón de 488 nm y filtros de interferencia para 590 y 520 nm). La derivación fluorogénica fue hecha con 3-(2-Furoyl)quinoline-2-carboxaldehyde (FQ) de Molecular probes (Eugene, OR, USA). Para almacenamiento, el FQ (10 mM) fue disuelto en methanol y el solvente removido bajo vacío por una hora a temperatura ambiente. El FQ ya deshidratado fue almacenado a -20°C, y utilizado directamente en la reacción de derivatización sin mayor tratamiento. Esta muestra (5 µl) fue inyectada en el equipo y el electroferograma resultante fue analizado para calcular la concentración de DA, acorde a estándares conocidos de concentración como se describe en Guzman-Ramos K, et. al.¹⁰³ Los niveles basales en todos los grupos no tuvieron diferencia estadísticamente significativa entre ellos y por lo tanto todos fueron representados como la línea basal en la grafica.

Mediante técnica inmunocitoquímica la intensidad de la inmunoreactividad de la enzima TH fue cuantificada mediante el programa Image J versión 1.40 (Research Service Branch, National Institute of Mental Health, MD, USA). Los estriados de tres animales intactos fueron utilizados como el valor control de la cantidad de expresión de la enzima. El análisis fue dirigido a aquellos animales que recibieron trasplante intranigral con células trasfectadas o sin trasfectar con el péptido de semaforina 3. Los valores son representados como porcentaje con respecto al control. Figura 27.

Cuantificación de Semaforinas Clase 3

Electroforesis y Western Blot

Los ensayos fueron realizados como se describe en Diaz N, et. al. Se obtuvieron extractos proteicos de medio donde se cultivaron las células HEK293 trasfectadas con Sema3C, los cuales fueron homogenados en buffer de lysis (10mM Tris-HCl, 1mM dithiothreitol, 30% glicerol, 1% Triton X-100, 15mM azida de sodio, 1mM EDTA, 4 mg/ml leupeptina, 2mg/ml aprotinina, 1mM fluoruro de fenil-metil-sulfonil). Las proteínas fueron obtenidas por centrifugación a 15,000 rpm a 4° C durante 15 minutos y el sobrenadante fue cuantificado mediante un ensayo de Bradford (BioRad, Alemania).

El pellet de proteínas se disolvió en solución Tris 60 mM (pH 6,8), glicerol 25% v/v, SDS 2% p/v y 2-mercaptoetanol 2 mM, y se separó mediante geles de poliacrilamida al 8% p/v SDS-PAGE usando los soportes SDS-PAGE Electrophoresis Module (Bio-RAD, NY, USA). Se cargó la misma concentración de proteína por pocillo (30 µg) y se incluyó un marcador de carga (BioRad, USA) para la determinación del tamaño proteico. Posteriormente se introdujo en la cubeta en buffer de corrida (0.1% SDS en Tris/Gly 1X, PH 8.3) y se electrotransfirió durante 15 minutos aproximadamente a 100V, las muestras permanecieron inmersas en el gel separador y el voltaje fue incrementado a 180V durante 30 minutos. Una vez finalizado dicho protocolo, se procedió a la electrotransferencia a membrana de fluoruro de polivilideno (PVDF) (Millipore, USA). Se realizó una corrida durante 2 horas a 100V con buffer de transferencia (20% v/v metanol, 250 mM tris, 1,92M Gly). Tras finalizar, las membranas fueron lavadas tres veces cinco minutos con TBS-T (TBS 0.1% Tween), y bloqueadas con buffer TBS-T (TBS, Tween20 0,1% v/v pH 7,6) y 5% de leche sin grasa p/v durante 1 hora a temperatura ambiente.

Para la incubación se utilizaron los anticuerpos anti-Sema3A (Abcam, USA) y anti-Sema3C (Abcam, USA), todos ellos diluidos en buffer de lavado (TBS-T 0.1% leche en polvo) a una concentración de 1:1000. Se incubó durante toda la noche a 4° C, posteriormente, las membranas fueron lavadas con buffer TBS-T

(tres lavados de cinco minutos cada uno) e incubadas una hora con el anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa de rabano (Santa Cruz Biotechnology; diluído 1:5000). Luego de los correspondientes lavados con TBS-T de modo similar a lo descrito anteriormente, se llevó a cabo la inmunodetección utilizando una reacción de quimioluminiscencia (ECL Western blotting análisis; Millipore, USA). La densidad proteica de las bandas fue cuantificada mediante densitometría utilizando un scanner (Hewlett-Packard, USA) y el software de análisis de imágenes Image J 1.4 (USA).

Cuantificación mediante ensayo de ELISA

Se utilizaron muestras de medio donde se cultivaron las células HEK 293 trasfectadas con Sema3C, las cuales fueron centrifugadas por 20 minutos a 1000 xg y congeladas a -80 °C hasta su uso. El análisis de la concentración de Sema3C se llevó a cabo haciendo uso de un kit de ELISA tipo sándwich de la marca USCN Life Science (Houston, TX, USA), para cuantificación in vitro.

Preparación de reactivos

Previo a su uso, todos los reactivos del kit se atemperaron (18-25°C) durante media hora, posterior a eso se siguieron las instrucciones del proveedor para la preparación de cada reactivo.

- Estándar: se reconstituyó con 1 mL de diluyente del Standard, el cual venía incluido en el kit. La concentración final de la dilución stock es de 20,000pg/mL, solución que se diluyó a una concentración de 5,000pg/mL para posteriormente llevar a cabo series de doble dilución en concordancia con lo mostrado en el siguiente esquema. (Figura 6)

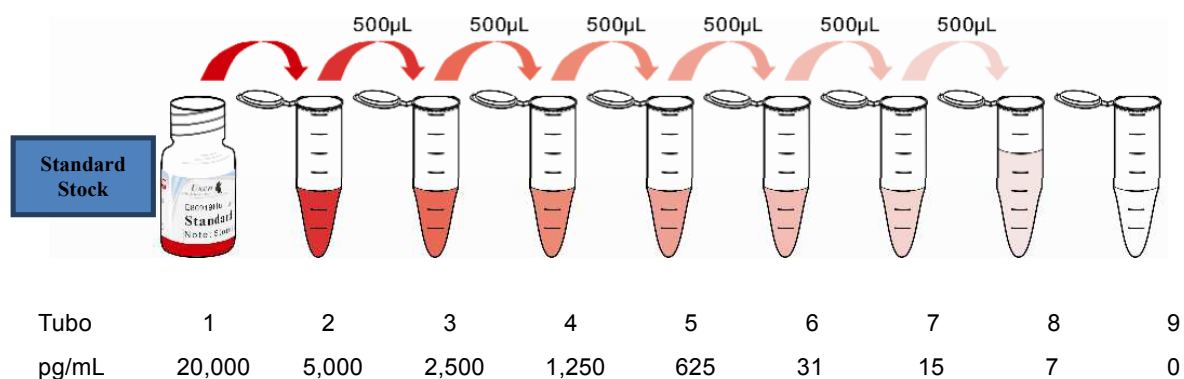


Figura 6. Procedimiento para la dilución del estándar stock.

De este modo se obtienen siete diluciones con las siguientes concentraciones: 5,000pg/mL, 2,500pg/mL, 1,250pg/mL, 625pg/mL, 312pg/mL, 156pg/mL, 78pg/mL. Cabe señalar que como blanco se utilizó el diluyente del standard (0pg/mL).

- Diluyente del Standard: se diluye el concentrado en agua bidestilada.
- Reactivo de detección A y B: se diluyen en la solución proveída en el Kit para estos reactivos.
- Solución de lavado: se diluyen 20mL del concentrado en 580mL de agua bidestilada.

Procedimiento del ensayo

En cada pocillo de la placa incluida en el kit, se colocaron 100 µL de cada una de las diluciones del estándar, así como de las muestras y el blanco. Se dejó incubar durante dos horas a 37 °C y cuando se concluyó dicho tiempo, se retiró con ayuda de una micropipeta multicanal, todo el líquido de cada pozo. Se prosiguió con la adición de 100µL del reactivo de detección A y se incubó una hora a 37 °C. Finalizada la incubación y posterior a retirar todo el líquido contenido en cada pozo, se lavó con 350 µL de la solución proveída en el kit.

Luego de remover el remanente de solución de lavado, se añadieron 100µL del reactivo de detección B y se incubó la placa durante 30 minutos a 37°C. Se repitió el proceso de aspiración-lavado en cinco ocasiones y se añadieron 90µL de la solución denominada “sustrato” incluida en el kit lista para usarse. La placa, protegida de la luz, se incubó durante 15 minutos a 37 °C, posteriormente se añadieron a cada pozo 50µL de la solución de alto y se midió la absorbancia a 450 nm en un lector de placa.

Conteo Celular.

Una vez procurados los cerebros se obtuvieron cortes con un grosor de 40 µm. El número total de NDA se cuantificó en cada quinto corte multiplicando el número de neuronas TH+ por rebanada, por el número de cortes en donde se visualizaba el injerto^{29,39}.

Marcaje retrogrado.

Para identificar los somas que proyectaban axones hacia el estriado, los animales recibieron de manera bilateral en el estriado una inyección del trazador retrogrado fluorescente Fluorogold (FG; Fluorochrome, USA) en dos sitios del estriado dorso-lateral (al 2% en solución salina 0.9%; 0.1 µl/sitio) a un rango de infusión de 0.1 µl/minuto, mediante una cánula conectada a una jeringa Hamilton de 10 µl con un tubo de polietileno a un microinyector Quintessential Stereotaxic Inyector (Stoelting, USA). Las coordenadas fueron AP, 1.3 mm; L, 2.5 mm; V, -5.5 mm para el primer sitio y AP, -0.9 mm; L, 3.5 mm; V, -5.5 para el segundo punto de inyección. Tres días más tarde, las ratas fueron sacrificadas y los cerebros recuperados para inmunocitoquímica de TH y detección de FG.

Análisis estadístico.

Los resultados son expresados como media ± S.E.M. El análisis estadístico fue realizado mediante ANOVA seguido por una prueba de Fisher.

El programa GB-STAT Versión 7.0 fue utilizado (Dynamic Microsystems, USA) para calcular los valores de probabilidad.

Resultados.

Estudios in vitro:

Inmunocitoquímica etapa de proliferación y diferenciación.

Cuando fueron cultivadas las CTE de ratón al inicio (etapa 1) del protocolo de diferenciación estas fueron positivas para los marcadores de estado indiferenciado OCT 3/4 y Sox2, que son factores transcripcionales cuya expresión confirma la capacidad pluripotencial que tienen estas células (Figura 7a).

Continuando con el proceso de selección y diferenciación celular del protocolo de 5 etapas, al cuarto día de proliferación de la etapa 4, las células expresaron el factor de transcripción específico de cerebro medio Engrailed 1 (En-1) y la proteína de filamentos intermedios Nestina en un 85% y 92.57% respectivamente, (Figura 7b) confirmado así su destino neural.

Finalmente, para corroborar el éxito del protocolo de diferenciación celular, se analizó la expresión de la enzima limitante en la biosíntesis de dopamina Tirosina Hidroxilasa (TH), así como la presencia de la proteína Tubulina β -III en las células cultivadas, las cuales nos indican que las CT embrionarias fueron diferenciadas hacia NDA al final del protocolo de diferenciación de 5 etapas. Posteriormente se realizó la cuantificación celular del número total de neuronas que expresan la TH, obteniendo hasta un 27% de células positivas con respecto al total de las neuronas diferenciadas. (Figura 7c)

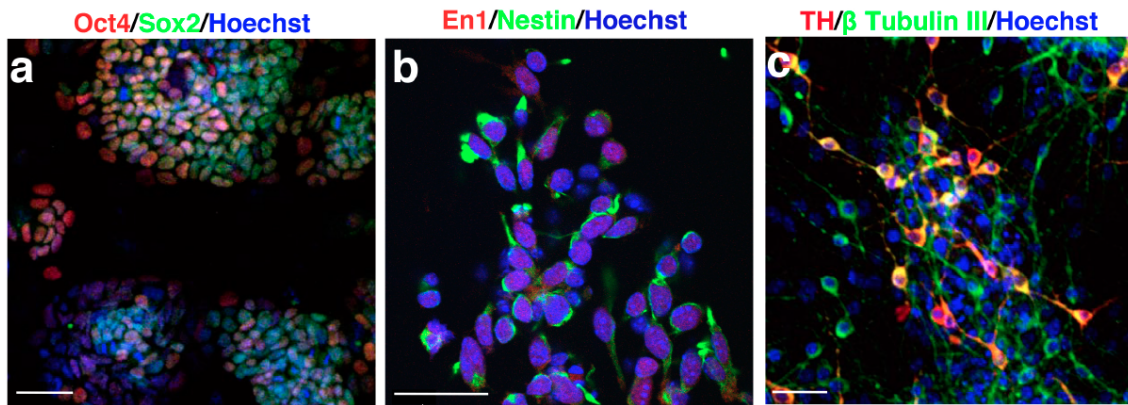


Figura 7. Protocolo de diferenciación de 5 etapas. a) Microfotografía de una colonia de CT embrionarias de ratón al inicio del protocolo de diferenciación en cultivo. Se observa la expresión de Oct4 (rojo) y Sox2 (verde), ambos marcadores de estadios indiferenciados. b) Expresión de Engrailed 1 (rojo) y nestina (verde) al día cuatro de proliferación celular. c) al tercer día de diferenciación en la etapa final las células inician la expresión de TH (rojo) y Tubulina Beta III (verde). La marca azul corresponde a Hoechst 33258 en todos los casos. La escala corresponde a 50 μ m.

Animales lesionados con 6-OHDA

Una vez infundida la toxina 6-OHDA de forma intracerebral de acuerdo a las coordenadas estereotáxicas previamente descritas, ocho semanas después, los animales desarrollaron un comportamiento estereotipado rotacional inducido por la administración subcutánea de apomorfina (Tabla 4) tal y como es esperado en un modelo parkinsonico murino. En promedio cada rata presentó esta conducta obteniendo un valor final de 671 ± 208 giros por hora, esta cifra se resume en la tabla 4.

Trasplante de neuronas dopaminérgicas derivadas de CT embrionarias de ratón en el estriado de ratas hemiparkinsonianas.

Una vez montado el modelo de ratas hemiparkinsonianas inducido con la toxina 6-OHDA, el siguiente objetivo fue tratar de revertir el déficit conductual mediante el trasplante en el estriado de NDA diferenciadas a partir de CT embrionarias de ratón.

Posterior al trasplante de 500 000 NDA por rata en el hemisferio lesionado se evaluó la conducta hemiparkinsoniana mediante varias pruebas farmacológicas y de exploración libre.

Prueba de Rotaciones

Dentro de la prueba de actividad rotacional, encontramos que los valores basales fueron de 573 ± 32 giros por hora para el grupo que no recibiría NDA y 568 ± 19 para los animales seleccionados para recibir el trasplante de NDA en el estriado, ver Tabla 4.

Posterior al trasplante de NDA intraestriatal, los animales fueron evaluados cada 2 semanas hasta concluir su tiempo de estudio de 45 días, encontrando que el grupo de animales que no recibió NDA provenientes de CT presentó un incremento de giros (935 ± 47), en contraste, los animales que si recibieron el trasplante de NDA, mostraron una disminución significativa en el número de giros (310 ± 13) lo cual se traduce en una recuperación conductual funcional, debido a una disminución del 45.4% seis semanas después de haber sido trasplantado con respecto a la condición inicial y un 66.8% menos en comparación con el grupo que no recibió NDA en el estriado. Figura 8

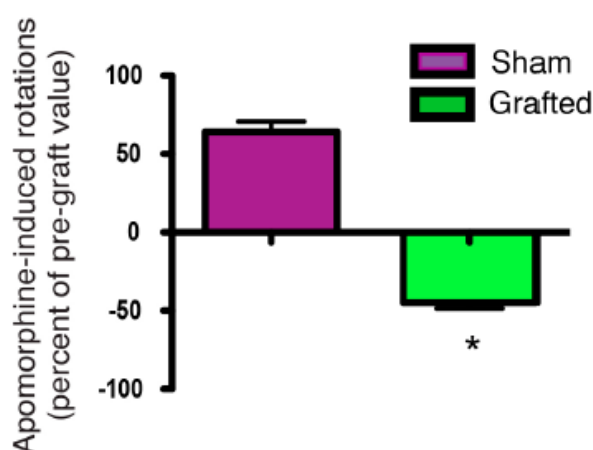


Figura 8. Prueba de rotaciones inducida por apomorfina 45 días posteriores al trasplante. En la gráfica se muestra un decremento significativo en el número de giros en los animales que recibieron el trasplante de NDA en el estriado, en contraste con el que no recibió células. Los datos son mostrados en porcentaje. $P < 0.05$

Prueba de Ajuste de pasos.

Al valorar la asimetría motora unilateral que presentan las ratas hemiparkinsonianas al ser desplazadas sobre una superficie lisa, encontramos en el caso de la condición que no recibió trasplante de NDA que el número de pasos se mantuvieron muy similares respecto a su valor basal (2.5 ± 0.3 vs 2.4 ± 0.2), en contraste, en los animales que recibieron el trasplante de NDA de forma intraestriatal se observó un incremento estadísticamente significativo en el número de pasos de 2.2 ± 0.2 a 9.9 ± 0.6 Figura 9.

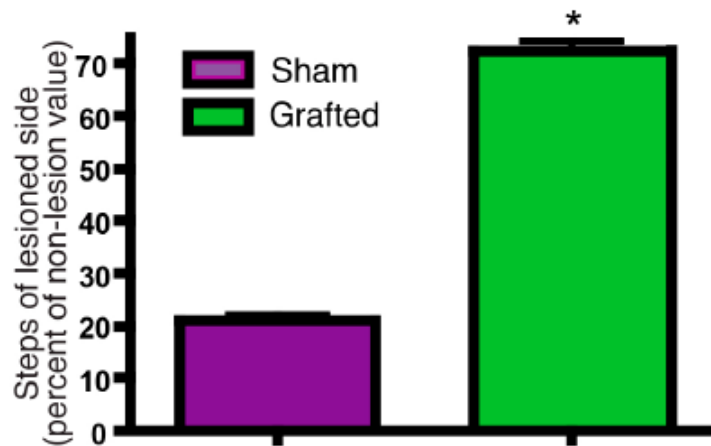


Figura 9. Prueba de ajuste de pasos. En el gráfico se representa el 100% como valor del lado del animal intacto, observando un 20% en el caso de la condición que no recibió el trasplante intraestriatal, así como un incremento significativo del 50% en la prueba de ajuste de pasos en los animales trasplantados con NDA en el estriado, comparado con el porcentaje obtenido en la condición basal. $P < 0.05$

Prueba de apoyo de miembros torácicos.

En la prueba de apoyo de los miembros anteriores, encontramos que el número de intentos exitosos al contacto con la mesa, se mantuvieron muy similares respecto a su valor basal en el caso de la condición que no recibió trasplante de NDA (1.9 ± 0.3 vs 2.0 ± 0.3), en contraste, en los animales que recibieron el trasplante de NDA de forma intraestriatal se observó un incremento estadísticamente significativo en el número de pasos de 1.9 ± 0.2 a 4.4 ± 0.2 Figura 10.

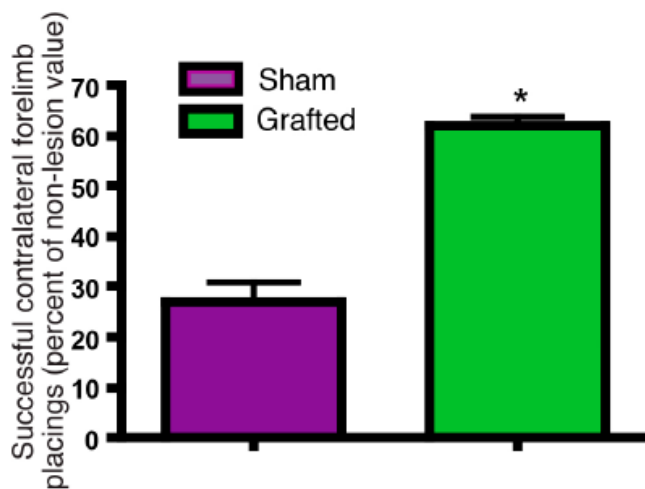


Figura 10. Prueba de apoyo de miembros torácicos. En el gráfico se representa el 100% como valor normalizado del lado del animal intacto, observando una disminución 28% en el caso de la condición que no recibió el trasplante intraestriatal, y un incremento significativo del 35% en la prueba de apoyo en los animales trasplantados con NDA en el estriado, comparado con el porcentaje obtenido en la condición basal. $P < 0.05$

Prueba de exploración libre en cilindro.

En la prueba de exploración libre en cilindro, encontramos que el número de contactos con la pared del cilindro, se mantuvieron muy similares respecto a su valor basal en el caso de la condición que no recibió trasplante de NDA (3.8 ± 0.6 vs 3.8 ± 0.3), en contraste, en los animales que recibieron el trasplante de NDA de forma intraestriatal se observó un incremento estadísticamente significativo en el número de pasos de 3.7 ± 0.4 a 8.7 ± 0.4 Figura 11.

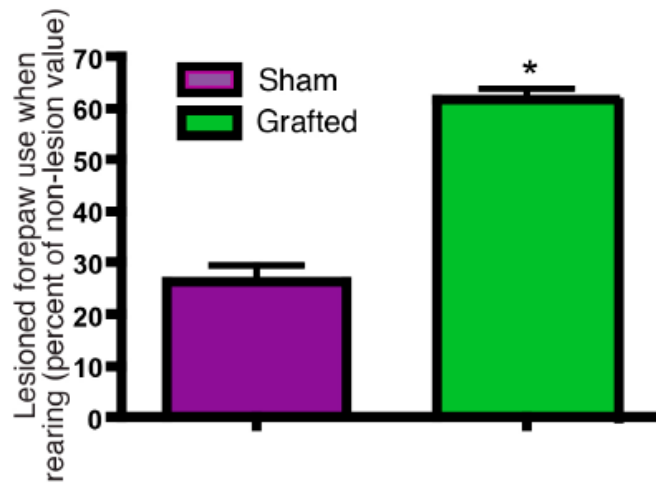


Figura 11. Prueba de exploración libre en cilindro. En el gráfico se representa el 100% como valor normalizado del lado del animal intacto, observando una disminución 27% en el caso de la condición que no recibió el trasplante intraestriatal, y un incremento significativo del 35% en la prueba de exploración libre en los animales trasplantados con NDA en el estriado, comparado con el porcentaje obtenido en la condición basal. $P < 0.05$

Análisis histológico

Para comprobar que la recuperación conductual observada en las pruebas farmacológicas y no farmacológicas fue asociada al trasplante de NDA en el estriado, procedimos a evaluar la presencia de TH en el sitio del trasplante. Al evaluar microscópicamente los cerebros, todos los tejidos presentaron las mismas características de los animales que no recibieron el trasplante de NDA no se observó la formación de teratomas en ninguno de los animales. Figura 12

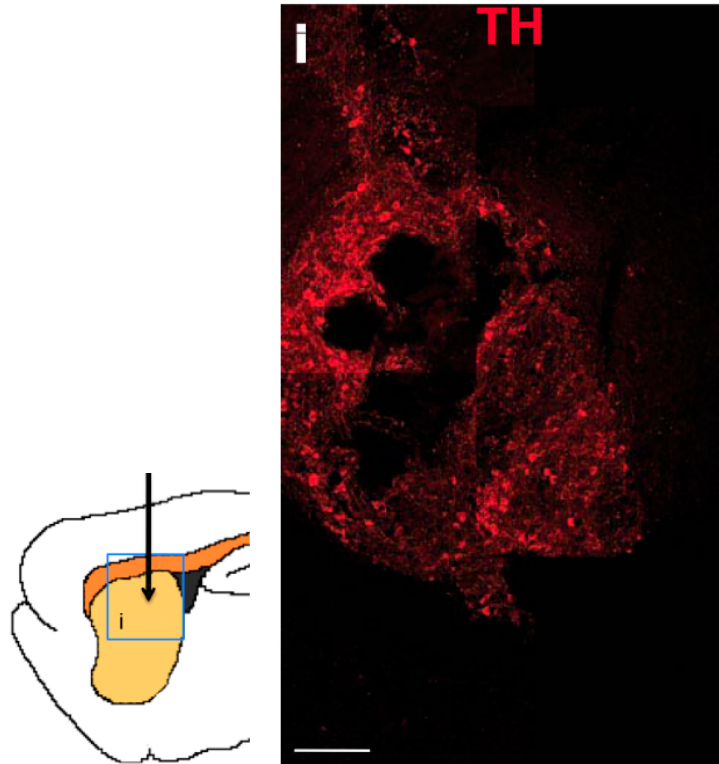


Figura 12. Trasplante intraestriatal. En el esquema se muestra el sitio del trasplante señalado con la letra i, en el recuadro se aprecia una reconstrucción representativa tomada a los 45 días posteriores al trasplante, en donde se observan células positivas para TH (rojo). Barra de escala = 100µm

Reconstrucción de la vía nigro-estriatal.

Degradación parcial de PGCS

Nuestro siguiente objetivo consistió en responder si el trasplante de NDA en la SN combinado con la degradación de PGCS, es suficiente para promover el crecimiento axonal hacia el estriado. Para determinar lo anterior, en animales hemiparkinsonianos se llevaron a cabo trasplantes de NDA (3.3×10^5 células) en la SN seguido de la aplicación de la enzima ChABC en dirección al estriado en repetidas ocasiones y a diferentes días.

El primer paso para cumplir con el objetivo anterior, fue estandarizar la trayectoria anteriormente descrita que traza una línea recta entre la SNpc y el estriado, para lo que se realizaron varias inyecciones con el colorante rojo fenol

y se evaluaron cortes histológicos una semana después con la finalidad de observar la ruta que siguió nuestra aguja. Figura 13.

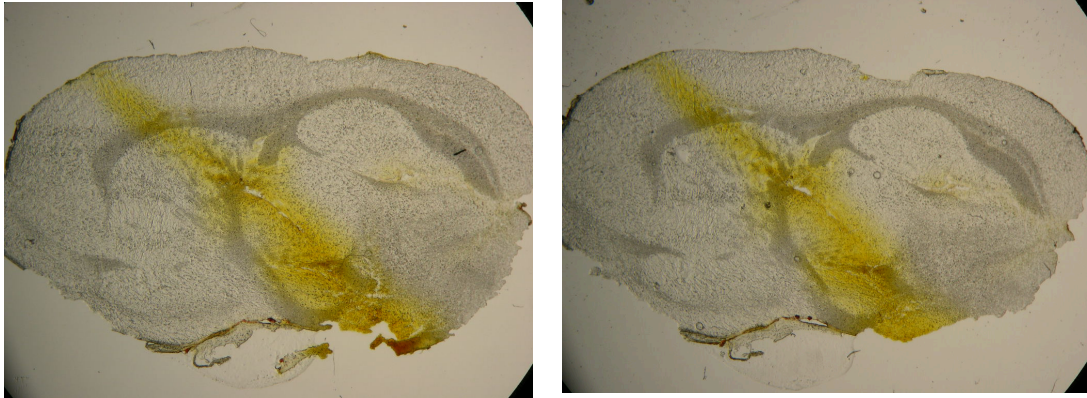


Figura 13. Inyección en angulo con rojo fenol. Se puede observar dos microfotografías de cortes sagitales de 20 μ m de cerebros de rata, en donde se visualiza la trayectoria que comunica a la SN con el estriado.

Una vez que delimitamos y el sitio de la trayectoria lineal se procedió a realizar los diferentes microinyectores para infundir la enzima ChABC tal y como se aprecia en la figura 14.

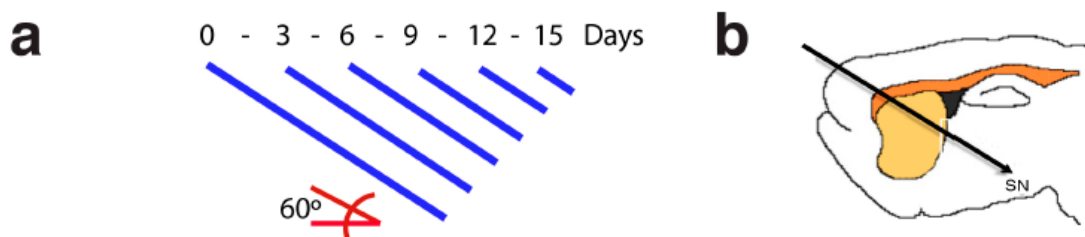


Figura 14. Largo de diferentes inyectores. a) Diagrama que muestra el tamaño de los microinyectores disminuyendo de acuerdo al día de tratamiento los cuales fueron utilizados para la inyección de ChABC, en b) representación esquemática de la trayectoria seguida en el trasplante intranigral y la posterior administración de ChABC.

Una vez finalizado el tiempo de estudio se realizaron evaluaciones conductuales farmacológicas y no farmacológicas para determinar si el trasplante de NDA aunado a la degradación de PGCS, proveían de una recuperación funcional en los animales hemiparkinsonicos.

Se encontró que, posterior al trasplante y al tratamiento con ChABC, ningún individuo mostró mejoría significativa en los siguientes ensayos: prueba de giros, prueba de apoyo de miembros anteriores y la prueba de exploración libre en cilindro. Para el caso de la prueba de ajuste de pasos, se encontró que el grupo que recibió trasplante con NDA+ChABC exhibía una mejoría estadísticamente significativa, presentando 4.7 ± 0.7 número de pasos, comparado con el valor arrojado previo a recibir el tratamiento que fue de 2.4 ± 0.2 . Figura 15.

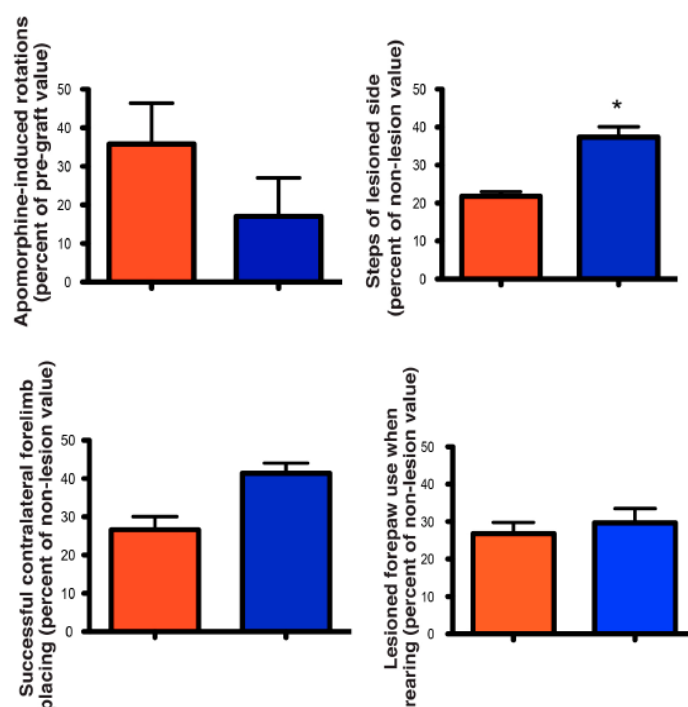


Figura 15. La degradación parcial de CSPG a través de la trayectoria nigro-estriatal, no favorece una recuperación funcional posterior al trasplante de neuronas DA en la SN. La recuperación en el grupo que recibió el tratamiento es únicamente observada en la prueba de ajuste de pasos. $P < 0.05$

Una vez determinada la actividad conductual de las ratas hemiparkinsonianas que recibieron el trasplante de NDA mas la enzima ChABC, se evaluó mediante microscopía confocal el sitio de inyección de la enzima siguiendo la trayectoria del trasplante previamente descrita. Cabe señalar que, como control, la administración del vehículo de la enzima ChABC fue realizada en ausencia de NDA en la SN. Los análisis histológicos fueron realizados 45 días posteriores al tratamiento, (Figura 16a) encontrando una fuerte asociación

entre la expresión de la Proteína Glial Fibrilar Ácida (GFAP) y la presencia de formas completas de PGCS detectados con el anticuerpo CS-56, confirmando la presencia incrementada de moléculas inhibitorias del crecimiento axonal (PGCS) de forma localizada en el sitio de inyección en nuestra comunicación nigro-estriatal, por lo que decidimos añadir la enzima ChABC para llevar a cabo y observar la digestión de los PGCS siendo identificando el procedimiento mediante una técnica inmunohistoquímica, lo cual resultó en una disminución parcial de los PGCS como se puede apreciar en la Figura 16b. Dentro de los grupos que recibieron el trasplante de NDA derivadas de CT embrionarias de ratón, la adición de la enzima ChABC causó la digestión parcial de los PGCS siendo evidenciado por la presencia del anticuerpo 2B6 que reconoce formas hidrolizadas de los proteoglicanos además de, observarse una disminución parcial en las formas completas de los PGCS Figura 16c. De igual manera, en los animales que fueron tratados con la enzima ChABC en la trayectoria nigro-estriatal previamente descrita, las formas completas (detectadas mediante el anticuerpo CS-56) o parcialmente hidrolizadas (visualizadas por el anticuerpo 2B6) de los PGCS mostraron una expresión colocalizada, indicando que la enzima ChABC degradó los PGCS. Figura 16d

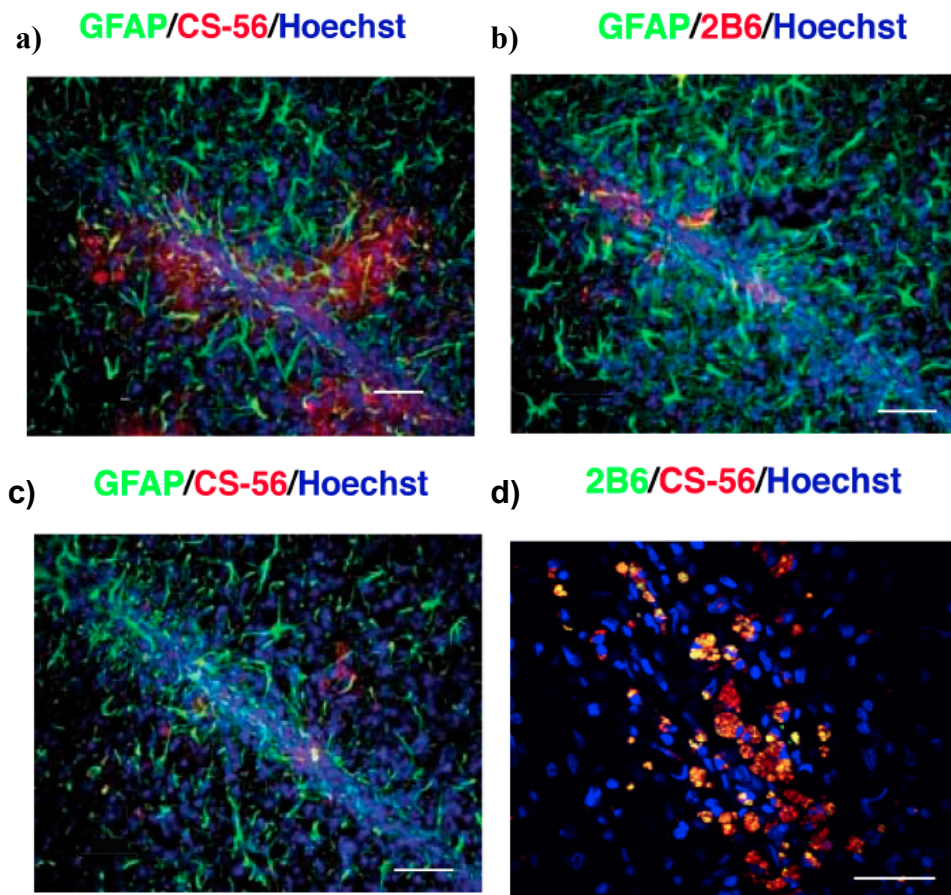


Figura 16. Degradación parcial de los PGCS. a) Presencia de las formas completas de los PGCS identificadas con el anticuerpo CS-56 (rojo) asociada con la proteína GFAP (verde). b) Microfotografía que muestra que la administración de ChABC causó la digestión parcial de las moléculas de PGCS lo cual es evidenciado por la presencia del anticuerpo 2B6 (rojo) el cual reconoce las formas hidrolizadas de los PGCS. c) Acorde a lo anterior hay una disminución paralela a las formas completas de los PGCS como se aprecia en la microfotografía. d) En los animales tratados las formas completas y parcialmente hidrolizadas de CSPG mostraron una expresión colocalizada. En todas las imágenes Hoechst 33258 (azul). Escala corresponde 50 μm .

Posterior a 45 días de haber sido realizado el trasplante intranigral, las NDA positivas para la expresión de la enzima limitante de la biosíntesis de DA (TH), fueron localizadas en la SN (Figura 17a) expresando el marcador específico de cerebro medio en la región A9 (GIRK2) Figura 17b. Sin embargo, aunque los injertos intranigrales contenían NDA (TH+/GIRK2+) y se comprobó la digestión enzimática por parte de ChABC sobre las moléculas de inhibición del crecimiento axonal (PGCS), no fue suficiente para recuperar la asimetría

observada en las ratas hemiparkinsonianas. Dejando fuera la capacidad de promover el crecimiento axonal en nuestro modelo de comunicación nigro-estriatal en ratas hemiparkinsonianas, por parte de la enzima ChABC en trasplantes dopaminérgicos derivadas de CT. En los animales que no recibieron NDA más la enzima ChABC, no se encontraron células positivas para TH ó el canal de potasio GIRK2 en el sitio de inyección (Datos no Mostrados).

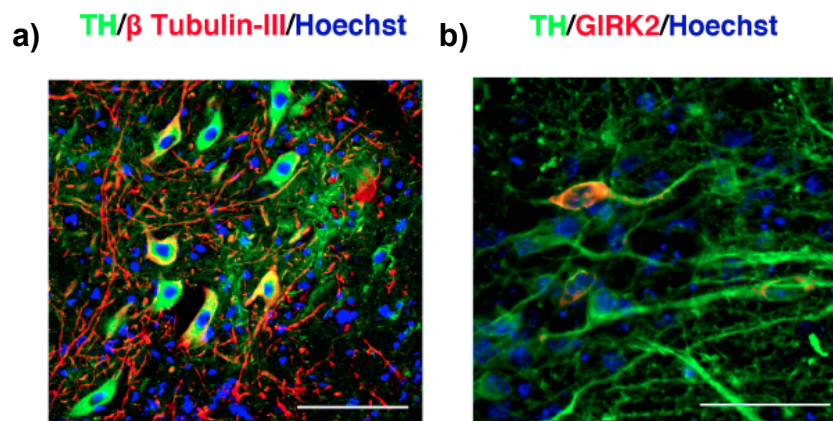


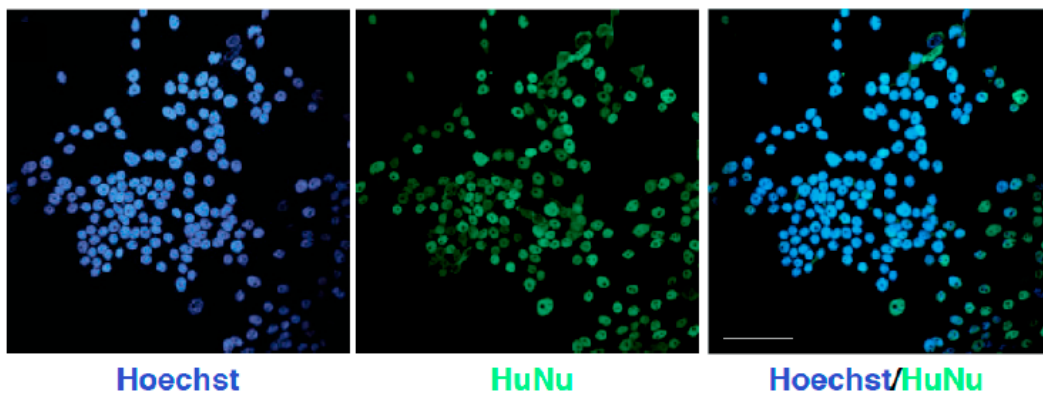
Figura 17. Marcadores de cerebro medio. a) Neuronas positivas a Tubulina β -III (rojo) y a la enzima TH (verde) fueron encontradas 45 días posterior al trasplante en la SN. b) Las NDA positivas a TH (verde) co-expresan el marcador GIRK2 (rojo). En todas las imágenes los núcleos fueron marcados con Hoechst 33258 (azul). Barra de escala = 50 μ m

Las células HEK293 secretan la proteína Sema 3C cuando es trasplantada en el cerebro de ratas adultas.

Teniendo como antecedente directo que la administración de la enzima ChABC para degradar los PGCS que están sobre-expresados en el sitio del daño neuronal en nuestro modelo de ratas hemiparkinsonianas no promueve el crecimiento axonal, nos propusimos plantear una nueva estrategia con el objeto de promover y dirigir el crecimiento de axones del trasplante de NDA en la SN hacia el estriado y de esa forma reconstruir la vía nigro-estriatal ausente en nuestro modelo. Para esta nueva estrategia sustituimos el tratamiento enzimático (ChABC) por moléculas quimioatrayentes de la familia Sema3 haciendo uso de células HEK293 trasfectadas con vectores de expresión para la proteína Semaforina 3A y 3C.¹⁰⁴

Para dar seguimiento al objetivo anteriormente descrito, lo primero que realizamos fue llevar a cabo la identificación de las células HEK293 *in vitro* a través de una técnica inmunocitoquímica para lo cual se empleó un anticuerpo que reconoce los núcleos de células que tienen un origen humano (HuNu) Figura 18a. Asimismo, en las células cultivadas y trasfectadas se comprobó la presencia de la semaforina clase 3. (Figura 18b)

a)



b)

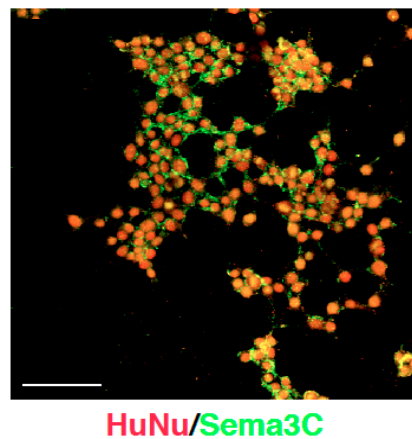


Figura 18. Ensayos *in vitro* células HEK293. a) Detección del antígeno HuNu (verde) en células HEK293 cultivadas, los núcleos fueron marcados con Hoechst 33258 (azul). b) Expresión de Sema3C (verde) en células HEK293 trasfectadas (rojo). Barra de escala = 100 μ m.

Sin embargo, una vez identificadas nuestras células HEK293 con el anticuerpo HuNu y la expresión de semaforina clase 3 por parte de estas células. Decidimos comprobar antes de iniciar nuestro protocolo, que en el cerebro adulto del animal lesionado no existieran moléculas que promueven la

proyección de axones, en particular sema3A y sema3C. Una semana posterior al co-trasplante se evaluó en células sin transfectar (repetiendo la técnica quirúrgica a emplear para los siguientes grupos) el marcaje contra anticuerpos específicos que reconocen las proteínas sema3A y sema3C respectivamente mediante un ensayo de inmunohistoquímica. Como era esperado, no fue detectada la expresión de semaforinas clase 3. Figura 19

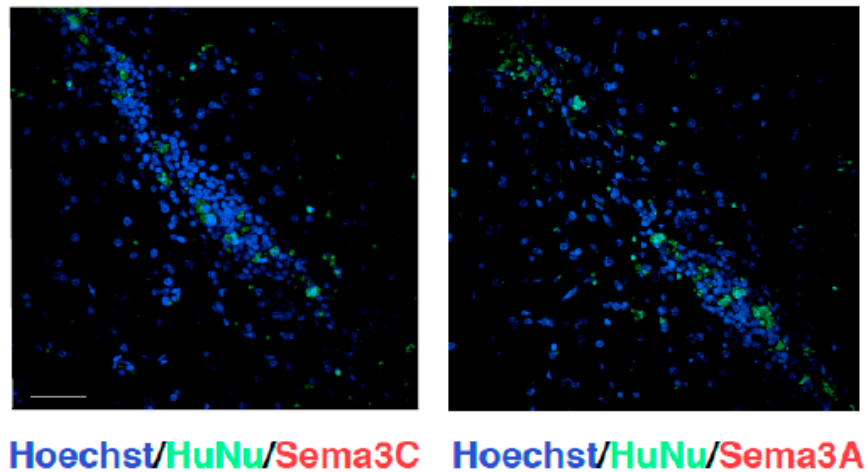


Figura 19. Ausencia de expresión de Sema 3 en el cerebro adulto. Identificación del antígeno HuNu (verde) en células HEK293. Los núcleos fueron marcados con Hoechst 33258 (azul). a) Es de resaltar la falta de marcaje con anticuerpo anti-Sema3C en el área trasplantada, indicando que esta proteína no está expresada en el cerebro adulto. b) Sema3A es ausente en células HEK293 sin transfectar y tampoco se expresa en la región del cerebro correspondiente al trasplante. Barra de escala = 100µm

Una vez comprobado que no existe la expresión de semaforinas de clase 3 en nuestro modelo de ratas hemiparkinsonianas en el sitio de inyección, lo siguiente fue demostrar que estas células HEK293 transfectadas con los vectores para Sema3A y Sema3C eran capaces de liberar la proteína hacia el medio extracelular para lo que se desarrollaron ensayos de WB y técnica de ELISA.

Cuantificación de la liberación de Semaforinas en el medio de cultivo.

Se recolectaron muestras del medio condicionado donde se cultivaron las células HEK293 ya transfectadas con Sema3A o con Sema3C al primer,

tercer y quinto día de cultivo. El análisis de WB reveló la presencia de la proteína Sema3A y Sema3C lo cual es indicativo de la liberación al medio de dichas proteínas. Como control se cargaron también concentraciones de 0.5, 1 y 1.5 µg del péptido recombinante (abcam, USA) de semaforina 3A y 3C para la estandarización del WB. Figura 20

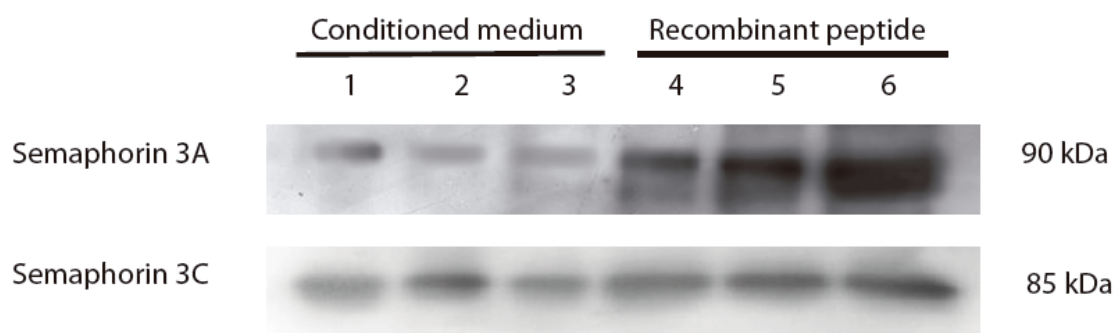


Figura 20. Liberación de Sema3 al medio de cultivo. En la figura se muestra un WB representativo del ensayo de liberación de Semaforinas por células HEK293 cultivadas. En el carril 1, 2 y 3 se aprecia la expresión de Sema3A y Sema3C en los días 1, 3 y 5 de cultivo. En los carriles 4, 5 y 6 se observa la expresión del péptido recombinante para la Sema3A y Sema3C que fue cargado a distintas concentraciones como control para este experimento.

Dado que la técnica de WB provee un análisis semi-cuantitativo, decidimos llevar a cabo un ensayo más preciso para la cuantificación de la proteína, utilizando un kit específico para la detección de la semaforina clase 3 *in vitro*. Fueron cuantificadas la cantidad total de la Sema3C liberada por el total de las células HEK293 (150,000 células) durante un periodo de 48 horas, la cantidad es expresada en ng/µl (Figura 21a) y la cantidad de Sema3C liberada por célula por hora expresado en fentogramos. (Figura 21b) Cabe señalar que como control negativo para este experimento, se midió también la concentración de semaforinas en células HEK293 que fueron trasfectadas con la proteína verde fluorescente (GFP) y como control positivo se utilizó el péptido recombinante de la Sema3C. Como era de esperarse en el medio recuperado de las células HEK293 trasfectadas con la GFP no se registró la presencia de Sema3. En cuanto al péptido recombinante, se obtuvo una concentración similar a la utilizada para realizar el ensayo.

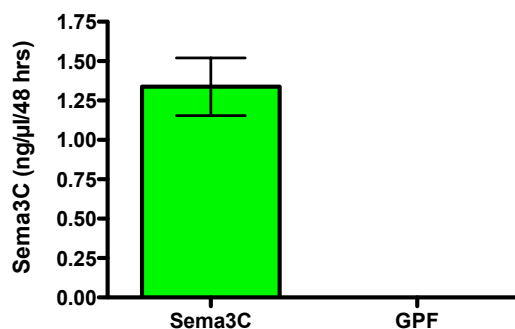


Figura 21. Cuantificación de Semaforina 3 liberada *in vitro*. a) Histograma que muestra la concentración de Sema3C liberada en el medio condicionado por las células HEK293 trasfectadas con dicha proteína. Como control negativo se utilizó el medio condicionado donde se cultivaron las células HEK293 trasfectadas con la GFP.

Ya que las células HEK293 son capaces de liberar semaforina al medio extracelular, se realizó el co-trasplante de NDA y células trasfectadas con semaforinas en nuestro modelo murino parkinsoniano. Tal y como se observa en el Figura 22a. Una semana después del co-trasplante con células HEK293 y NDA, se realizaron las inmunotinciones con anticuerpos específicos para el péptido de Sema3A y de Sema3C encontrando la marca específica dentro de las células HEK293 así como fuera de ellas, delimitando una gran zona del sitio del trasplante y la trayectoria que comunica la SN con el estriado. (Figura 22b-f) La detección de la proteína Sema 3A y Sema3C mostro un patrón punteado consistente con previos trabajos Minor K, et. al., Rubio S, et. al.,^{105,106} siendo evidente la presencia de NDA cercanas al sitio de trasplante.

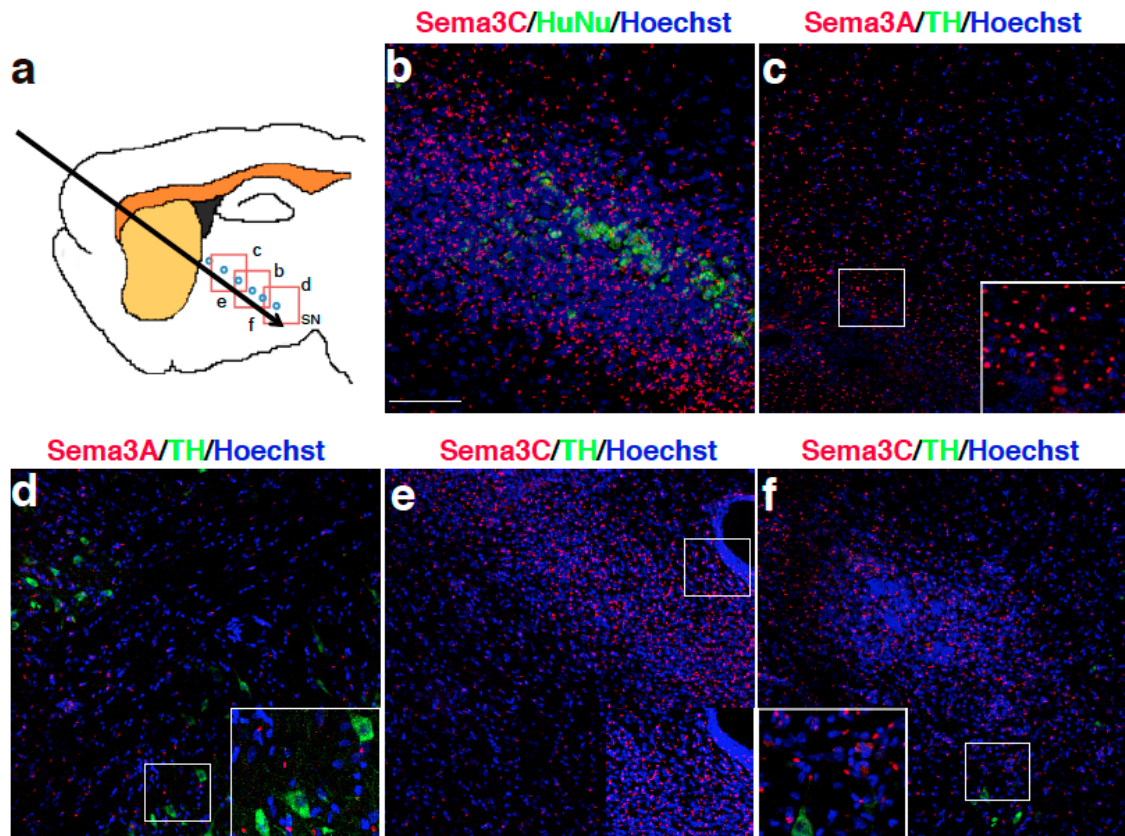


Figura 22. La expresión de Semaforinas de clase 3 en el cerebro lesionado. a) Diagrama que muestra los sitios de trasplante de células HEK293 (círculos azules), así como la localización de los paneles subsecuentes. b) Los animales que recibieron células trasfectadas con Sema3C, se identificó la población de HEK293 con el anticuerpo de HuNu (verde) y Sema3C (rojo), en c) y d) se observa la expresión de sema3A en la trayectoria de la inyección y cerca de la SN así como células TH positivas (verde) presentes una semana posterior al trasplante. En e) y f) se observa localizada la expresión de Sema3C (rojo) en la trayectoria y en el sitio de inyección. Todas las células fueron marcadas con Hoechst 33258 (azul) Barra de escala = 50 μ m.

El co-trasplante de células HEK293 trasfectadas con semaforinas clase 3 y NDA en la substantia nigra provoca una recuperación funcional en el modelo murino parkinsoniano.

Las evaluaciones conductuales farmacológicas y no farmacológicas, fueron realizadas 45 días después de ser realizado el co-trasplante intranigral de NDA derivadas de CT embrionarias de ratón y células HEK293. En el grupo donde únicamente se realizó el trasplante de NDA sin las células HEK293 o en el caso donde se trasplantaron las células HEK293 trasfectadas sin el vector de

Sema3, no se produjo recuperación conductual. Figura 23a-d (Tabla 4). En contraste, cuando las NDA fueron co-trasplantadas intranigralmente junto con las células HEK293 trasfectadas con Sema3A y Sema3C, resultó en una recuperación estadísticamente significativa en toda la batería de pruebas antes descritas. Figura 23a-d (Tabla 4). Otros grupos control fueron realizados, en donde el co-trasplante de células HEK293 trasfectadas con Sema3A o Sema3C se llevo a cabo sin NDA. En ninguno de los grupos control se observó efecto en las pruebas conductuales farmacológicas y no farmacológicas. Figura 24a-d (Tabla 4)

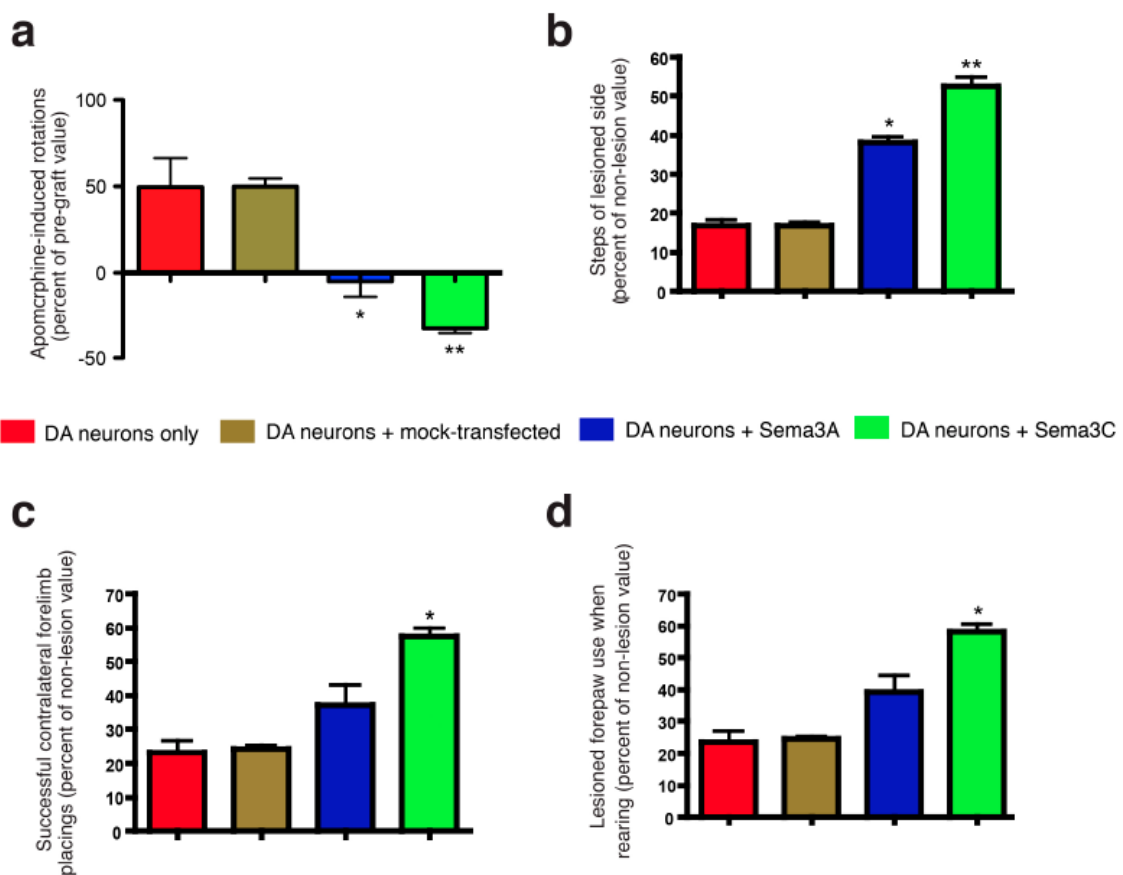


Figura 23. Recuperación funcional utilizando Semaforinas de clase 3. a) Reto farmacológico inducido por apomorfina en donde se observa la recuperación conductual en ratas hemiparkinsonianas que fueron trasplantadas con NDA y células HEK trasfectadas con Sema3A y SemaC. b) Recuperación significativa en la prueba de ajuste de pasos, c) apoyo de miembros torácicos y d) prueba de exploración libre en cilindro. * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ comparado con NDA solas y también comparado con células HEK trasfectadas sin Sema3.

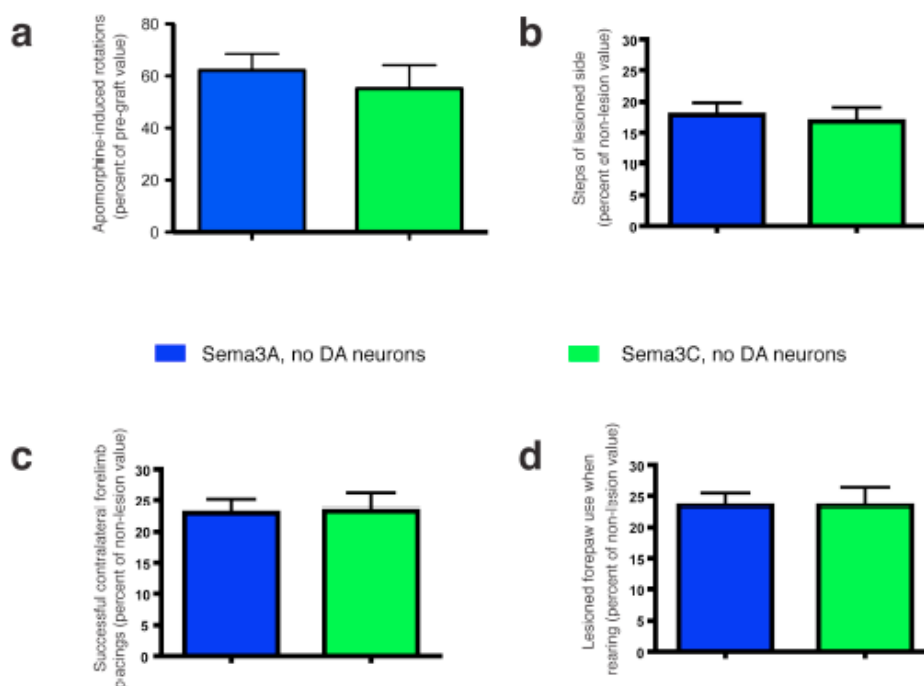


Figura 24. Trasplante de células HEK293 trasfectadas con Sema3 en ausencia de NDA. a) Los animales que no recibieron NDA no mostraron recuperación funcional en la prueba de rotaciones inducida por apomorfina, b) prueba de ajuste de pasos, c) prueba de apoyo de miembros torácicos y d) prueba de exploración libre en cilindro.

El co-trasplante de células expresando Sema3 con NDA causa liberación de DA en el estriado dorsal.

Posterior al co-trasplante de NDA en ratas hemiparkinsonianas y a la recuperación conductual observada, nuestra siguiente aproximación fue evaluar la funcionalidad de los injertos mediante la cuantificación de la liberación de DA en el estriado dorsolateral inducida por depolarización in vivo.

³⁹ La medición de la concentración de DA estriatal extracelular se realizó mediante microdialisis de manera bilateral. La cuantificación obtenida en el estriado sin lesionar en el caso de todos los animales mostró una liberación significativa de DA (Figura 25a,b) posterior a la estimulación inducida por altas concentraciones de potasio con respecto a los niveles basales hallados en previos reportes. ³⁹ En el caso de la liberación de DA en los animales lesionados con 6-OHDA y que recibieron el trasplante de manera estriatal, la

concentración liberada de DA fue menor que en la rata intacta. (Figura 25a) Por su parte, los animales que recibieron el trasplante de forma intranigral (NDA junto con células HEK293 trasfectadas con Sema3A o Sema3C) resultaron en la liberación del neurotransmisor dopaminérgico, siendo significativamente mas alta su concentración encontrada cuando se comparó con la condición basal, pero esta fue ligeramente menor que lo encontrado en el trasplante intraestriatal. (Figura 25a,b) Para el hemisferio lesionado que recibió NDA de manera intranigral y sin células HEK293 (Sema3A, Sema3C), la liberación de DA inducida por depolarización estriatal no fue detectable. Figura 25a

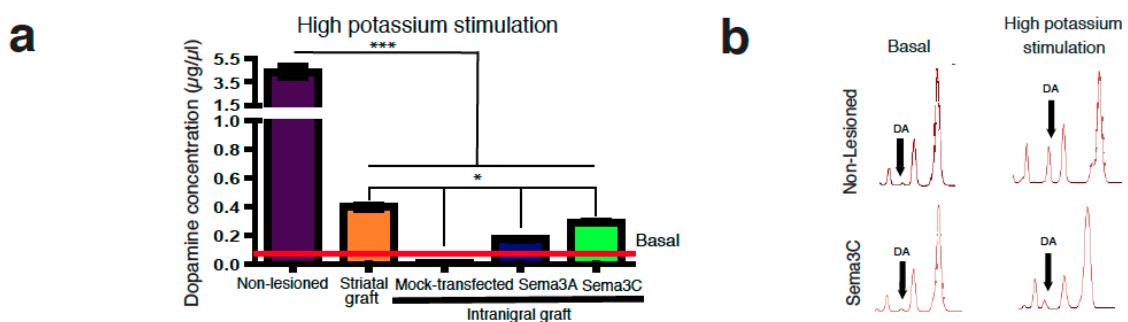


Figura 25. Liberación estriatal de dopamina. a) Medición por microdialisis de la liberación de DA después de ser estimulada con alto potasio. b) Electrofluorograma representativo en donde se aprecia el pico de liberación de dopamina. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$

Establecimiento de nuevas comunicaciones sinápticas dopaminérgicas evaluadas mediante el marcaje retrógrado en animales que recibieron el trasplante con NDA + Sema3C

Para observar los procesos neuronales en el sitio de trasplante y evidenciar la reconstrucción de la vía nigro-estriatal, 45 días posteriores al trasplante se analizó la expresión de la enzima TH mediante inmunohistoquímica y se realizó una composición constituida por múltiples imágenes capturadas mediante microscopía confocal las cuales ejemplifican la conexión existente entre la SN y el estriado. Esto se llevó a cabo en los animales intactos, (Figura 26a) en los animales con trasplante de NDA intranigralmente con células HEK293 sin trasfectar (Figura 26b) y en los animales que recibieron el co-trasplante de NDA

más células HEK293 trasfectadas con Sema3C (Figura 26c). Encontrando en la composición de microfotografías realizadas para obtener un campo de visualización mayor que incluya casi toda la vía dopaminérgica en cortes sagitales de cerebros de animales intactos evidenciando una morfología típica de la SN y del fascículo medial del cerebro anterior (Figura 26a). En contraste, los animales que recibieron únicamente el trasplante de NDA en la SN con células HEK293 que no expresaban SEMA3 presentaron algunas neuronas positivas para TH en la SN pero sin reactividad en el estriado o el fascículo medial (Figura 26b). Sin embargo, cuando se realizó el co-trasplante de NDA más células HEK293 trasfectadas con Sema3C fue evidente la presencia de somas neuronales en la SN y procesos axonales positivos a TH extendiéndose hacia la región estriatal (Figura 26c). En particular el grupo que recibió NDA más células HEK293 trasfectadas con Sema3C, la expresión de TH en los axones que fueron encontrados de la SN en dirección hacia el estriado nos sugiere un proceso de reinervación axonal por parte de los implantes dopaminérgicos, más que de auto-regeneración de la vía nigro estriatal.

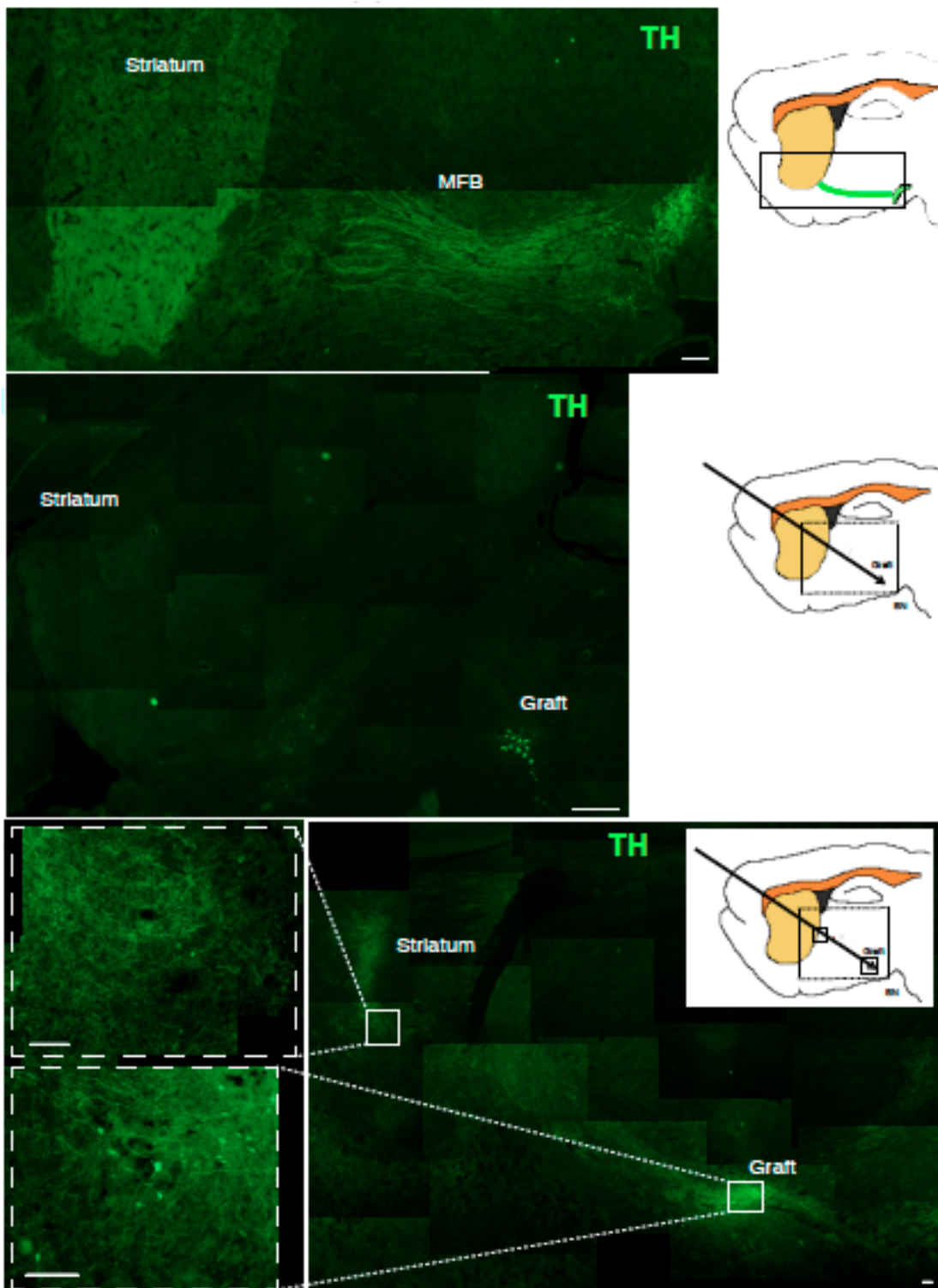


Figura 26. Formación de una vía dopaminérgica entre la SN y el estriado. a) Composición que muestra la vía nigro-estriatal intacta, incluyendo el fascículo medial del cerebro anterior. Barra de escala = 100 μ m. b) Composición fotográfica representativa donde se muestra el cerebro de una rata lesionada que recibió el trasplante de NDA en la SN y células HEK293 sin trasfectar. Barra de escala = 200 μ m. c) Composición representativa del cerebro de una rata que recibió NDA y células que sobreexpresan Sema3C. Barra de escala = 50 μ m

Algo muy importante de resaltar, es que la recuperación asociada al trasplante intranigral con NDA más células trasfectadas con Sema3C fue independiente de la presencia de somas dopaminérgicos en el estriado, eliminando así la posibilidad de migración celular por parte de las NDA injertadas en la SN. En razón de estimar el grado de reinervación estriatal, se cuantificó la expresión relativa de la proteína de TH en los grupos representados en la Figura 26b-c y se comparó con el grupo no lesionado (Figura 26a). Para el análisis de datos, el grupo intacto fue normalizado a 100%. En los injertos intranigrales combinados con células sin trasfectar se encontró una disminución en la intensidad de fluorescencia estadísticamente significativa del $87.6\% \pm 0.6$ ($n=3$, $p<0.001$), en contraste, los animales que recibieron el trasplante intranigral de NDA mas células HEK trasfectadas con Sema3C mostraron un $44.4\% \pm 2.8$ de la concentración relativa de TH comparado con el grupo intacto ($n=3$, $p<0.001$) Figura 27. Lo cual confirma que el co-trasplante intranigral de NDA favorece el crecimiento axonal dirigido hacia el estriado.

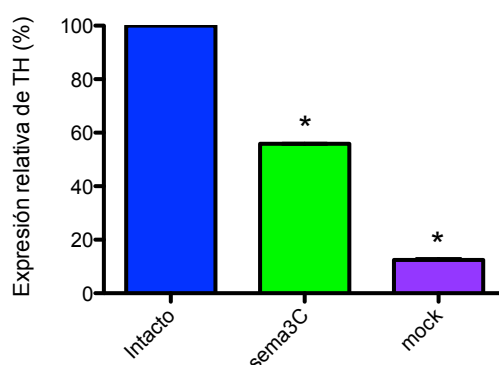


Figura 27. Expresión relativa de TH en el estriado. Intensidad de fluorescencia de TH normalizado con respecto a la expresión del grupo intacto, comparando los animales que recibieron el trasplante de NDA en la SN con células HEK trasfectadas con Sema3C y sin trasfectar. * $p<0.001$

Establecimiento de nuevas conexiones sinápticas dopaminérgicas.

Con la intención de evaluar los contactos sinápticos provenientes de las NDA trasplantadas en la SN, se realizó el marcaje retrógrado mediante el compuesto Fluorogold (FG), el cual es capturado por los axones y transportado hacia el

soma de las neuronas teniendo como ventaja que no penetra a los axones intactos y ha sido utilizado para la detección de contactos monosinápticos entre la SN y el estriado después de un trasplante.¹⁰⁷

Para comprobar si nuestras NDA trasplantadas intranigralmente extendieron axones para alcanzar el estriado dorsal, realizamos 2 inyecciones de FG en el estriado de las ratas hemiparkinsonianas. Al tercer día previo al término del periodo de estudio se evaluó la expresión de la enzima TH y la expresión de FG en animales no lesionados, observando la co-localización de ambos marcadores (Figura 28a). Este ensayo se llevo a cabo también en los animales lesionados que no recibieron NDA en la SN, donde se encontró una disminución en el número de células positivas a TH que co-expresaban FG (Figura 28b). Por otra parte, los animales que recibieron injertos de NDA en la SN combinados con células trasfectadas con Sema3C encontramos un número considerable de neuronas positivas a ambos marcadores (TH/FG) en el sitio de trasplante (Figura 28c), indicando que los axones de las NDA injertadas en la SN fueron capaces de proyectar axones y alcanzar el estriado. En contraste, los animales que recibieron NDA más células HEK293 sin trasfectar (Figura 28d) o células HEK 293 con Sema3C en ausencia de NDA (Figura 28e) presentaron escasas o nulas neuronas positivas para TH/FG.

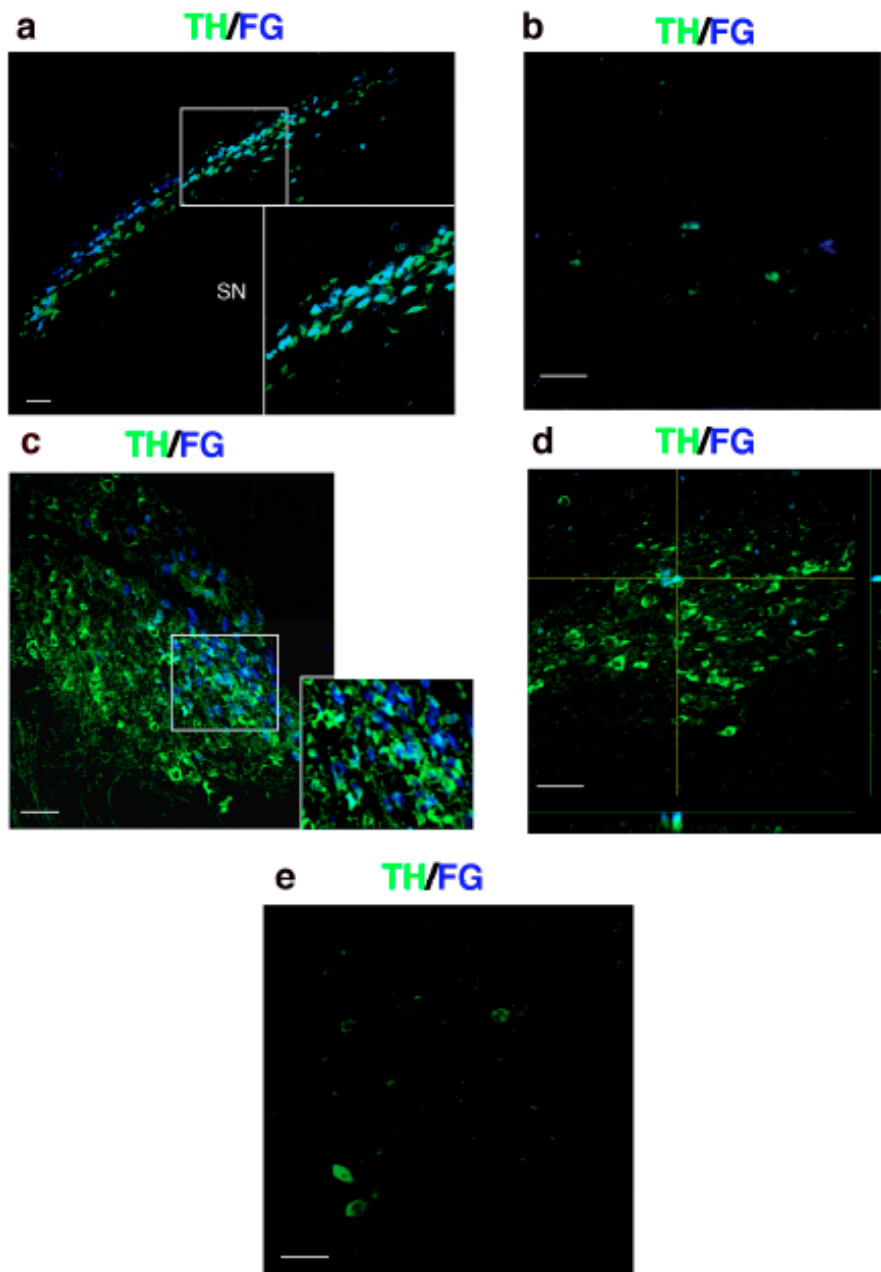


Figura 28. Establecimiento de nuevas proyecciones entre la SN y el estriado. a) Composición que muestra somas positivos a TH (verde) en la SN posterior a la inyección de FG (azul) en la región estriatal de animales intactos. b) Animal lesionado sin trasplantar que muestra una disminución significativa en el número de células que co-expresan TH/FG. c) Detección de TH/FG 45 días posteriores al trasplante de NDA con HEK293 trasfectadas con Sema3C. d) Rata que recibió trasplante de NDA intranigral más células HEK sin trasfectar. e) Imagen representativa de una rata que recibió células trasfectadas con Sema3C en ausencia de NDA. Barra de escala = 30µm

Posteriormente realizamos el conteo estereológico de las NDA que co-expresaban ambos marcadores (TH/FG) en la SN, siendo estadísticamente significativa la diferencia entre todas las condiciones (Figura 29). El número encontrado de NDA positivas para FG en la condición sin lesionar es consistente con lo reportado en previos estudios.¹⁰⁸

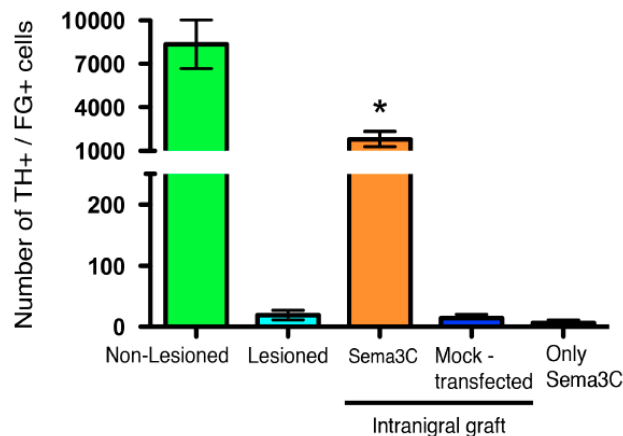


Figura 29. Cuantificación de células positivas a TH/FG en la SN. En el histograma se muestra el número de NDA que co-expresan TH/FG en el grupo no lesionado, con lesión, en el grupo que recibió NDA más HEK293 trasfectadas con Sema3C, en los animales que recibieron NDA más HEK293 sin trasfectar y en los que sólo recibieron HEK293 trasfectadas con Sema3C. * $p < 0.05$ comparado con el resto de los grupos.

El trasplante intranigral contiene neuronas dopaminérgicas específicas de la SN *pars compacta*, con una supervivencia similar a lo encontrado en los injertos estriatales.

Para confirmar la identidad de las NDA trasplantadas en la SN, se detectó la expresión del marcador mesencefálico (Pitx3) y el marcador de NDA específico de la región A9 (GIRK2) en las células trasplantadas en la SN en nuestro modelo de animales lesionados con 6-OHDA. Las NDA diferenciadas *in vitro* fueron positivas para Pitx3 (Figura 30a) asimismo, las NDA implantadas en la SN de ratas parkinsonianas, expresaron ambos marcadores Pitx3 y el canal de potasio GIRK2, indicativo de NDA maduras de la región A9 (Figura 30b-c). Posteriormente se realizó el conteo estereológico de NDA que expresaron

Pitx3 y GIRK2. Se encontró que el porcentaje de NDA localizadas en el sitio de trasplante positivas para Pitx3 fue del $82\% \pm 12$ y del marcador GIRK2 fue del $38\% \pm 3$ Figura 30d.

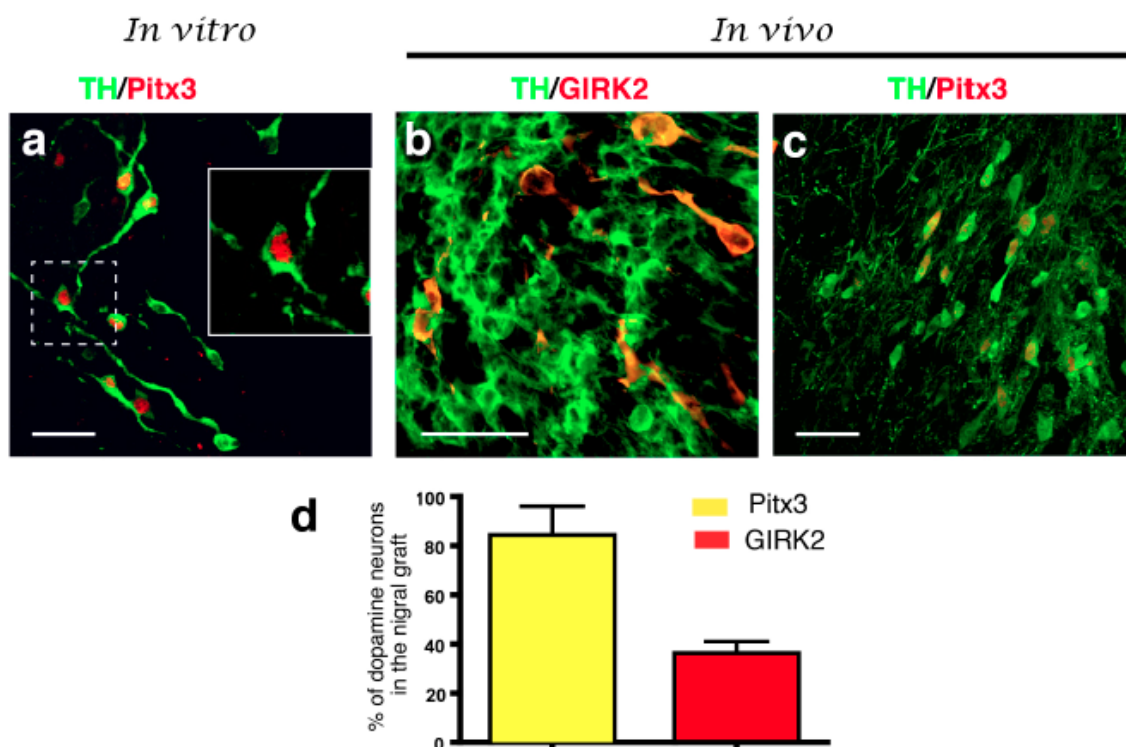


Figura 30. Expresión de marcadores dopaminérgicos antes y después del trasplante intranigral. a) NDA al día 6 de la etapa 5 co-expresa TH (verde) y Pitx3 (rojo). b) Co-expresión de TH y GIRK2 (rojo) en NDA en la SN de una rata que recibió NDA y células Hek293 trasfectadas con Sema3C. c) Neuronas positivas a TH trasplantadas intranigralmente expresan Pitx3. d) Cuantificación de la proporción de neuronas positivas a TH que expresan Pitx3 o GIRK2 en la SN a los 45 días posteriores al trasplante. Barra de escala = 30 μ m

Para determinar el número de NDA trasplantadas en la SN (Figura 31a) en comparación con el trasplante en el estriado, se realizó el conteo estereológico de las NDA, encontrando un 43% más de NDA que en el encontrado en los injertos intranigrales (Figura 31b). Esta información es consistente con el 51% más de células que fueron implantadas en el trasplante intraestriatal, mostrando un rango similar de supervivencia cuando se realiza el injerto en ambas regiones.

Finalmente, no se observó la presencia de teratomas, corroborando esto con estudios anteriores en donde los animales recibieron células derivadas de ES en el estriado y fueron evaluados hasta 32 semanas post injerto.³⁹

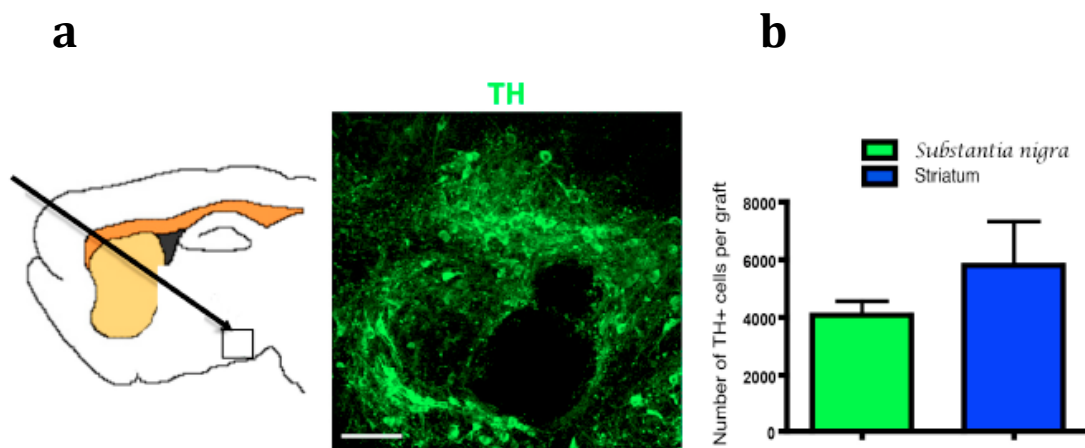


Figura 31. Cuantificación de los injertos estriatales e intranigrales. a) Diagrama representativo del sitio de trasplante intranigral en donde el recuadro muestra el área de los trasplantes intranigrales evidenciado por la expresión de TH (verde). b) Histograma que muestra el número total de Neuronas TH positivas para ambas condiciones. Barra de escala = 50µm.

Discusión

Para cumplir con los objetivos inicialmente planteados para este proyecto, en nuestra primera aproximación degradamos las moléculas implicadas en la inhibición del crecimiento axonal (PGCS) mediante el uso de la enzima ChABC en trasplantes de tipo intranigral. Esta enzima presenta la ventaja de ser altamente confiable para promover la plasticidad y regeneración de axones¹⁰⁹ así como la funcionalidad cuando es combinada con un autoinjerto de nervio periférico en un modelo de daño medular agudo.¹¹⁰ Desafortunadamente, en ratas hemiparkinsonianas los implantes de NDA injertadas en la SN, no dirigieron sus axones a lo largo de la vía delimitada por las formas hidrolizadas o parcialmente digeridas de los PGCS, aunque cabe señalar que sólo la degradación parcial fue detectada a lo largo de la trayectoria que trazamos. La falla en la regeneración de la vía nigro-estriatal en nuestro modelo, se correlaciona con la ausencia de recuperación significativa de la actividad conductual analizada en retos farmacológicos y no farmacológicos. Sin embargo, es de llamar la atención la ligera mejoría mostrada al contabilizar los números de pasos en el miembro anterior lesionado. Esto permite especular que las repetidas inyecciones con apomorfina en la prueba de rotaciones pudieran provocar cierta recuperación pero sólo al combinar el trasplante intranigral de NDA con la enzima ChABC, ya que los tratamientos por separado no provocaron mejoría alguna.

En nuestra segunda aproximación los resultados mostraron que el desarrollo y guía del crecimiento axonal de NDA derivadas de CT embrionarias de ratón puede ser activado utilizando moléculas quimiotróficas como la Semaforina de clase 3 en el cerebro adulto de un animal lesionado con 6-OHDA. Nosotros observamos que animales hemiparkinsonianos tratados con esta estrategia presentaron una recuperación conductual comparable a la que se observa cuando los implantes son realizados en el estriado, sitio donde comúnmente se han enfocado todas las estrategias de reemplazo celular en modelos de la EP.

El trasplante intranigral combinado con células HEK293 transfectadas con semaforinas de clase 3, causó una recuperación estadísticamente significativa

en los retos farmacológicos y no farmacológicos. Un hallazgo que fue correlacionado con la liberación de DA en el estriado dorsal y con la presencia de conexiones sinápticas provenientes de NDA injertadas en la SN, las cuales fueron evidenciadas por la expresión de la enzima TH a lo largo de la vía nigro-estriatal en ratas hemiparkinsonianas. Cabe resaltar que la recuperación sólo fue observada cuando las NDA fueron co-trasplantadas con células HEK293 expresando Sema3, ya que en ningún otro caso se mostró un efecto similar, descartando algún efecto intrínseco por parte de las células HEK293.

Interesantemente, varios autores han descrito efectos opuestos al interaccionar las Semaforinas de clase 3 con componentes de la matriz extracelular, por ejemplo la Sema5A anclada a la membrana produce un efecto atrayente cuando interactúa con el PG heparan sulfato en la guía de axones del diencefalo. En contraste, esta misma proteína al interactuar con PGCS produce un efecto repulsivo sobre los axones. Sin embargo, la repulsión de estos axones por parte de la Sema3F no se ve alterada después del tratamiento con la enzima heparinasa, sugiriendo que la interacción de proteínas solubles como las semaforinas clase 3 con heparan sulfato no es requerida para el fenómeno de repulsión.¹¹¹

En la estrategia de co-trasplante descrita aquí, nosotros no encontramos somas TH positivos en el estriado y por lo tanto la recuperación no puede ser asociada a la migración de NDA desde la SN. Acorde con esto, las NDA expuestas a las células HEK293 trasfectadas *in vitro* no promueven la migración celular y sólo muestran respuesta las proyecciones axonales.¹⁰⁴ Por otra parte, se ha demostrado que las semaforinas de clase 3 han sido involucradas en la migración de precursores oligodendrocíticos, en particular la Sema3F, causa una movilización de precursores gliales hacia áreas desmielinizadas originadas por la previa administración de lisofosfatidilcolina en la médula espinal en estudios *in vivo*. La Sema3A por otra parte, es repulsiva para precursores de oligodendrocitos *in vivo* y el ratón Nrp1^{sema-}, el cual posee un receptor Nrp1 modificado que no reconoce a la Sema3A, mostró un incremento en los niveles de precursores después de la desmielinización, sugiriendo así un papel negativo de la Sema3A en el reclutamiento de

precursores oligodendrocitos. Estos efectos observados fueron independientes de la proliferación celular y la muerte celular apoptótica ¹¹². Asimismo, el efecto de la Sema3A en poblaciones neuronales diferentes de NDA mesencefálicas es repelente ¹¹² e interfiere con la regeneración de axones después del daño a la médula espinal. ⁹⁴

Recientemente, muchos grupos describieron la regeneración de la vía nigro-estriatal en roedores hemiparkinsonianos. El primero de ellos realizó un análisis en ratas parcialmente lesionadas y tratadas con un agonista del receptor D₃ de DA, modelo donde fue evidente un incremento en el número de nuevas neuronas TH positivas en la SN. La recuperación conductual en pruebas farmacológicas fue reportada, sin embargo aunque este tratamiento incrementó el marcaje retrógrado del estriado a la SN, no hay una clara evidencia de nuevas neuronas TH positivas etiquetadas para el marcaje con FG en la SN. ¹¹³ Asimismo, en dos publicaciones similares, ratones inyectados unilateralmente con 6-OHDA en la SN e injertados en la misma región con tejido proveniente del mesencéfalo ventral proveniente de embriones de ratón, los animales mostraron una reconstrucción anatómica de la vía meso-estriatal dopaminérgica y una recuperación en la prueba rotacional inducida por drogas, ^{114,115} la cual no fue corroborada con pruebas no farmacológicas o de exploración espontánea. En el primer caso las lesiones fueron parciales y la inervación observada permanecía en el estriado ventral, aun más, la expresión de GDNF incrementó la expresión de TH hacia el tálamo y el globo pálido siendo un mecanismo no específico de la SN, y sólo bajo ciertas condiciones la conducta fue significativamente diferente. ³⁸ Teniendo que, las principales diferencias entre todos estos estudios y nuestro trabajo es que nosotros utilizamos NDA derivadas de células troncales embrionarias, evaluamos de manera farmacológica y no farmacológica la recuperación conductual, detectamos liberación de DA en una gran área del estriado mediante microdiálisis y encontramos conexiones sinápticas mediante el marcaje con FG. La evidencia de todas estas pruebas reveló una inervación dopaminérgica del estriado a partir de la SN.

Existen dos grandes subgrupos de neuronas dopaminérgicas en el cerebro medio, las neuronas de la región A9 en la SN *pars compacta* y las neuronas de la región A10 que pertenecen al área tegmental ventral. Ambas presentan una localización anatómica distinta y una proyección de axones hacia blancos diferentes. La región A9 expresa el marcador GIRK2 y proyecta principalmente hacia el estriado dorso – lateral y el área A10 que inerva el estriado ventral, el nucleus accumbens y áreas corticales. Dentro de la región A9 la expresión del factor de transcripción Pitx3 durante el desarrollo es vital para conservar el fenotipo dopaminérgico deseado, se ha reportado que los ratones knockout para Pitx3 carecen de NDA en el área A9 en el mesencefalo y que suspensiones de células CT diferenciadas enriquecidas con neuronas expresando Pitx3 inducen la recuperación de ratas parkinsonianas después del trasplante intraestriatal.⁴³ Además experimentos recientes muestran que las neuronas de la región A9 (GIRK2+/Pitx3+) son requeridas para recuperar la conducta y presentar una eficiente re-inervación del estriado dorso lateral con fibras positivas para TH en ratas hemiparkinsonianas.¹¹⁶ Interesantemente, en animales que se recuperaron posterior al trasplante ectópico, neuronas expresando el marcador GIRK2 y Pitx3 fueron encontradas predominantemente en la periferia de los injertos,¹¹⁷ sugiriendo una alta habilidad de estas neuronas para el establecimiento de contactos sinápticos con el tejido del huésped.

Nuestros resultados muestran que la presencia de NDA con el marcador mesencefálico Pitx3 con una baja proporción de NDA positivas a GIRK2 en la SN posterior al trasplante intranigral, son suficientes para re-inervar a la región dorso-lateral del estriado lesionado con 6-OHDA, región normalmente inervada por las NDA endógenas.

El uso de tejido fetal mesencefálico tiene una limitación fundamental para el uso clínico en la terapia de remplazo celular en pacientes con EP, debido a la escasa oportunidad de obtener donadores y la incapacidad de estos precursores neuronales de preservar su fenotipo dopaminérgico después de la expansión celular.¹¹⁸ Las CT parecen ser la herramienta más prometedora en las alternativas del reemplazo celular en la medicina regenerativa, ya que

superan las limitaciones del número celular y presentan un estable potencial de diferenciación hacia células DA. Adicionalmente estas células tienen la gran ventaja de ser manipulables genéticamente. El uso clínico de neuronas derivadas de CT humanas requiere no sólo de la optimización de protocolos de diferenciación dopaminérgicos y la completa eliminación de células formadoras de neoplasias antes de ser injertadas, sino también del desarrollo de estrategias que dirijan el crecimiento axonal de la SN al estriado. Nuestro estudio constituye un importante paso en este sentido, aunque futuros estudios serán requeridos para elucidar la integración efectiva de NDA en circuitos funcionales y asegurar que las inervaciones sean correctas y por lo tanto capaces de tener una regulación fisiológica de la liberación de dopamina.

Conclusiones

Hasta el momento hemos logrado la diferenciación de NDA a partir de CTE de ratón *in vitro* mediante el protocolo de 5 etapas, comprobando fenotípicamente su destino mediante marcadores inmunocitoquímicos.

Comenzamos a lesionar ratas adultas con 6-OHDA y demostramos que la asimetría motora se manifiesta en las ratas lesionadas con la inyección sistémica de apomorfina posterior a un mes de la lesión. También confirmamos que el implantar NDA en el estriado ocasiona una disminución importante en la prueba rotacional y una recuperación de la asimetría motora al ser evaluados conductualmente por pruebas no farmacológicas⁸⁻¹².

Por otra parte, tenemos que los PGCS son un grupo de proteínas localizadas en la superficie celular y en el espacio extracelular de todos los tejidos animales, incluyendo el sistema nervioso central. Estas moléculas delimitan el sitio de lesiones físicas o químicas, lo cual sugiere un efecto negativo en la regeneración de axones por lo que adquiere gran importancia analizar su papel en el cerebro adulto en condiciones normales y después de un daño¹⁵. Como el trasplante de neuronas siempre involucra lesiones mecánicas, quisimos evaluar la expresión de PGCS posterior a la realización de una inyección como la llevada a cabo en el protocolo de trasplante. En el presente estudio se comprobó la presencia de estas moléculas inhibitorias del crecimiento axonal en nuestro modelo de comunicación SN *pars compacta*–estriado. Asimismo, se demostró la digestión por parte de la enzima ChABC a lo largo de la trayectoria descrita. Sin embargo, esta degradación parcial no fue suficiente para obtener un crecimiento axonal dirigido ni una recuperación en la prueba farmacológica al transplantar NDA en la SN *pars compacta* además del tratamiento enzimático hacia el estriado. No obstante, en nuestros experimentos con digestión enzimática usando la ChABC, la evaluación conductual (prueba de ajuste de paso) reveló una diferencia modesta pero significativa, lo cual podría ser relevante porque esta prueba evalúa la actividad propioceptiva de los animales de manera fisiológica.

Por otra parte, al adicionar moléculas quimioatrayentes del crecimiento axonal en nuestro modelo de reconstrucción nigro-estriatal, se logró revertir el comportamiento rotacional inducido por apomorfina y lograr una recuperación de la asimetría fisiológica en las pruebas conductuales no farmacológicas de manera significativa en el caso particular de los animales tratados con semaforina 3C. Al realizar el análisis histológico encontramos la expresión de ambas semaforinas hasta por 9 días. En el caso particular de la semaforina 3C se observó la presencia de NDA en el sitio del trasplante y un incremento en la reactividad contra TH a lo largo de la trayectoria antes descrita. El grupo transplantado en la SNpc y que recibió el tratamiento con semaforina 3A mostró una recuperación significativa con respecto a los animales que no recibieron el tratamiento, encontrando NDA en el sitio del injerto, sin embargo no se apreció un incremento en la reactividad para TH a lo largo de la trayectoria que comunica a la SNpc con el estriado.

Creemos que buscar alternativas terapéuticas para el tratamiento de la EP a nivel experimental es de suma importancia y esperamos que la información generada de estos experimentos pueda eventualmente ser utilizada para el tratamiento en pacientes con EP.

En conclusión, nosotros describimos condiciones que promueven el crecimiento axonal dirigido de NDA después de ser trasplantadas en la SN permitiendo así el establecimiento de nuevas terminales en el estriado del huésped, resultando en una recuperación conductual en ratas hemiparkinsonianas. Haciendo una recopilación de nuestros resultados, es posible afirmar que el crecimiento axonal dirigido a larga distancia es posible en el trasplante intranigral de NDA combinado con moléculas neurotróficas. Estos hallazgos refuerzan la idea de que las estrategias basadas en terapias de ES pueden ser efectivas para restaurar las conexiones estriatales y normalizar la información en un sistema de circuitos neuronales dañado.

Referencias

- 1 Obeso, J. A. *et al.* Missing pieces in the Parkinson's disease puzzle. *Nature medicine* **16**, 653-661, doi:10.1038/nm.2165 (2010).
- 2 Exner, N., Lutz, A. K., Haass, C. & Winklhofer, K. F. Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease: molecular mechanisms and pathophysiological consequences. *The EMBO journal* **31**, 3038-3062, doi:10.1038/emboj.2012.170 (2012).
- 3 Hardy, J. Genetic analysis of pathways to Parkinson disease. *Neuron* **68**, 201-206, doi:10.1016/j.neuron.2010.10.014 (2010).
- 4 Nuytemans, K., Theuns, J., Cruts, M. & Van Broeckhoven, C. Genetic etiology of Parkinson disease associated with mutations in the SNCA, PARK2, PINK1, PARK7, and LRRK2 genes: a mutation update. *Human mutation* **31**, 763-780, doi:10.1002/humu.21277 (2010).
- 5 Cookson, M. R. The biochemistry of Parkinson's disease. *Annu Rev Biochem* **74**, 29-52 (2005).
- 6 Klein, C. Implications of genetics on the diagnosis and care of patients with Parkinson disease. *Arch Neurol* **63**, 328-334 (2006).
- 7 Horowitz, M. P. & Greenamyre, J. T. Gene-environment interactions in Parkinson's disease: the importance of animal modeling. *Clinical pharmacology and therapeutics* **88**, 467-474, doi:10.1038/clpt.2010.138 (2010).
- 8 Kanthasamy, A. G., Kitazawa, M., Yang, Y., Anantharam, V. & Kanthasamy, A. Environmental neurotoxin dieldrin induces apoptosis via caspase-3-dependent proteolytic activation of protein kinase C delta (PKCdelta): Implications for neurodegeneration in Parkinson's disease. *Molecular brain* **1**, 12, doi:10.1186/1756-6606-1-12 (2008).
- 9 Slotkin, T. A. & Seidler, F. J. Developmental exposure to organophosphates triggers transcriptional changes in genes associated with Parkinson's disease in vitro and in vivo. *Brain research bulletin* **86**, 340-347, doi:10.1016/j.brainresbull.2011.09.017 (2011).
- 10 Moretto, A. & Colosio, C. Biochemical and toxicological evidence of neurological effects of pesticides: the example of Parkinson's disease. *Neurotoxicology* **32**, 383-391, doi:10.1016/j.neuro.2011.03.004 (2011).
- 11 Schon, E. A. & Przedborski, S. Mitochondria: the next (neurode)generation. *Neuron* **70**, 1033-1053, doi:10.1016/j.neuron.2011.06.003 (2011).
- 12 Olanow, C. W. The scientific basis for the current treatment of Parkinson's disease. *Annu Rev Med* **55**, 41-60 (2004).
- 13 Ferreri, F., Agbokou, C. & Gauthier, S. Recognition and management of neuropsychiatric complications in Parkinson's disease. *CMAJ : Canadian Medical Association journal = journal de l'Association medicale canadienne* **175**, 1545-1552, doi:10.1503/cmaj.060542 (2006).
- 14 Auluck, P. K., Caraveo, G. & Lindquist, S. alpha-Synuclein: membrane interactions and toxicity in Parkinson's disease. *Annual review of cell and developmental biology* **26**, 211-233, doi:10.1146/annurev.cellbio.042308.113313 (2010).
- 15 Cabin, D. E. *et al.* Synaptic vesicle depletion correlates with attenuated synaptic responses to prolonged repetitive stimulation in mice lacking alpha-synuclein. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **22**, 8797-8807 (2002).

- 16 Sherer, T. B. *et al.* An in vitro model of Parkinson's disease: linking mitochondrial impairment to altered alpha-synuclein metabolism and oxidative damage. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **22**, 7006-7015, doi:20026721 (2002).
- 17 Choi, S. J. *et al.* Acute inhibition of corticostriatal synaptic transmission in the rat dorsal striatum by ethanol. *Alcohol* **40**, 95-101, doi:10.1016/j.alcohol.2006.12.004 (2006).
- 18 Klein, C. & Schlossmacher, M. G. The genetics of Parkinson disease: Implications for neurological care. *Nature clinical practice. Neurology* **2**, 136-146, doi:10.1038/ncpneuro0126 (2006).
- 19 Sakata, E. *et al.* Parkin binds the Rpn10 subunit of 26S proteasomes through its ubiquitin-like domain. *EMBO reports* **4**, 301-306, doi:10.1038/sj.embor.embor764 (2003).
- 20 Valente, E. M. *et al.* Hereditary early-onset Parkinson's disease caused by mutations in PINK1. *Science* **304**, 1158-1160, doi:10.1126/science.1096284 (2004).
- 21 Schulz, J. B. Update on the pathogenesis of Parkinson's disease. *Journal of neurology* **255 Suppl 5**, 3-7, doi:10.1007/s00415-008-5011-4 (2008).
- 22 Rajput, A. & Rajput, A. H. Parkinson's disease management strategies. *Expert Rev Neurother* **6**, 91-99 (2006).
- 23 Freed, C. R. *et al.* Transplantation of embryonic dopamine neurons for severe Parkinson's disease. *N Engl J Med* **344**, 710-719, doi:10.1056/NEJM200103083441002 (2001).
- 24 Olanow, C. W. *et al.* A double-blind controlled trial of bilateral fetal nigral transplantation in Parkinson's disease. *Annals of neurology* **54**, 403-414, doi:10.1002/ana.10720 (2003).
- 25 Goetz, C. G. *et al.* Placebo response in Parkinson's disease: comparisons among 11 trials covering medical and surgical interventions. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society* **23**, 690-699, doi:10.1002/mds.21894 (2008).
- 26 Nichols, J. & Smith, A. The origin and identity of embryonic stem cells. *Development* **138**, 3-8, doi:10.1242/dev.050831 (2011).
- 27 McKay, R. Stem cells--hype and hope. *Nature* **406**, 361-364 (2000).
- 28 Kawasaki, H. *et al.* Induction of midbrain dopaminergic neurons from ES cells by stromal cell-derived inducing activity. *Neuron* **28**, 31-40 (2000).
- 29 Kim, J. H. *et al.* Dopamine neurons derived from embryonic stem cells function in an animal model of Parkinson's disease. *Nature* **418**, 50-56, doi:10.1038/nature00900 nature00900 [pii] (2002).
- 30 Lee, S. H., Lumelsky, N., Studer, L., Auerbach, J. M. & McKay, R. D. Efficient generation of midbrain and hindbrain neurons from mouse embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* **18**, 675-679, doi:10.1038/76536 (2000).
- 31 Perrier, A. L. *et al.* Derivation of midbrain dopamine neurons from human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 12543-12548 (2004).
- 32 Zeng, X. *et al.* Dopaminergic differentiation of human embryonic stem cells. *Stem Cells* **22**, 925-940 (2004).
- 33 Alves dos Santos, M. T. & Smidt, M. P. En1 and Wnt signaling in midbrain dopaminergic neuronal development. *Neural development* **6**, 23, doi:10.1186/1749-8104-6-23 (2011).

- 34 Kriks, S. *et al.* Dopamine neurons derived from human ES cells efficiently engraft in animal models of Parkinson's disease. *Nature* **480**, 547-551, doi:10.1038/nature10648 (2011).
- 35 Takagi, Y. *et al.* Dopaminergic neurons generated from monkey embryonic stem cells function in a Parkinson primate model. *J Clin Invest* **115**, 102-109, doi:10.1172/JCI21137 (2005).
- 36 Barberi, T. *et al.* Neural subtype specification of fertilization and nuclear transfer embryonic stem cells and application in parkinsonian mice. *Nat Biotechnol* **21**, 1200-1207 (2003).
- 37 Kawasaki, H. *et al.* Generation of dopaminergic neurons and pigmented epithelia from primate ES cells by stromal cell-derived inducing activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 1580-1585 (2002).
- 38 Fasano, C. A., Chambers, S. M., Lee, G., Tomishima, M. J. & Studer, L. Efficient derivation of functional floor plate tissue from human embryonic stem cells. *Cell stem cell* **6**, 336-347, doi:10.1016/j.stem.2010.03.001 (2010).
- 39 Rodriguez-Gomez, J. A. *et al.* Persistent dopamine functions of neurons derived from embryonic stem cells in a rodent model of Parkinson disease. *Stem Cells* **25**, 918-928, doi:2006-0386 [pii] 10.1634/stemcells.2006-0386 (2007).
- 40 Roy, N. S. *et al.* Functional engraftment of human ES cell-derived dopaminergic neurons enriched by coculture with telomerase-immortalized midbrain astrocytes. *Nature medicine* **12**, 1259-1268, doi:nm1495 [pii] 10.1038/nm1495 (2006).
- 41 Mendez, I., Sadi, D. & Hong, M. Reconstruction of the nigrostriatal pathway by simultaneous intrastriatal and intranigral dopaminergic transplants. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **16**, 7216-7227 (1996).
- 42 Mukhida, K., Baker, K. A., Sadi, D. & Mendez, I. Enhancement of sensorimotor behavioral recovery in hemiparkinsonian rats with intrastriatal, intranigral, and intrasubthalamic nucleus dopaminergic transplants. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **21**, 3521-3530, doi:21/10/3521 [pii] (2001).
- 43 Olsson, M., Nikkhah, G., Bentlage, C. & Bjorklund, A. Forelimb akinesia in the rat Parkinson model: differential effects of dopamine agonists and nigral transplants as assessed by a new stepping test. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **15**, 3863-3875 (1995).
- 44 Tang, F. I., Tien, L. T., Zhou, F. C., Hoffer, B. J. & Wang, Y. Intranigral ventral mesencephalic grafts and nigrostriatal injections of glial cell line-derived neurotrophic factor restore dopamine release in the striatum of 6-hydroxydopamine-lesioned rats. *Experimental brain research. Experimentelle Hirnforschung. Experimentation cerebrale* **119**, 287-296 (1998).
- 45 Nikkhah, G., Cunningham, M. G., McKay, R. & Bjorklund, A. Dopaminergic microtransplants into the substantia nigra of neonatal rats with bilateral 6-OHDA lesions. II. Transplant-induced behavioral recovery. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **15**, 3562-3570 (1995).
- 46 Filbin, M. T. Myelin-associated inhibitors of axonal regeneration in the adult mammalian CNS. *Nature reviews. Neuroscience* **4**, 703-713, doi:10.1038/nrn1195 (2003).

- 47 Matsui, F. & Oohira, A. Proteoglycans and injury of the central nervous system. *Congenit Anom (Kyoto)* **44**, 181-188 (2004).
- 48 Schwab, M. E., Kapfhammer, J. P. & Bandtlow, C. E. Inhibitors of neurite growth. *Annu Rev Neurosci* **16**, 565-595 (1993).
- 49 Schwartz, N. B. & Domowicz, M. Proteoglycans in brain development. *Glycoconj J* **21**, 329-341 (2004).
- 50 Galtrey, C. M. & Fawcett, J. W. The role of chondroitin sulfate proteoglycans in regeneration and plasticity in the central nervous system. *Brain Res Rev* **54**, 1-18 (2007).
- 51 Oohira, A., Matsui, F., Tokita, Y., Yamauchi, S. & Aono, S. Molecular interactions of neural chondroitin sulfate proteoglycans in the brain development. *Arch Biochem Biophys* **374**, 24-34 (2000).
- 52 Rauch, U. Brain matrix: structure, turnover and necessity. *Biochem Soc Trans* **35**, 656-660 (2007).
- 53 Milev, P. *et al.* Differential regulation of expression of hyaluronan-binding proteoglycans in developing brain: aggrecan, versican, neurocan, and brevican. *Biochem Biophys Res Commun* **247**, 207-212 (1998).
- 54 Melendez-Vasquez, C. *et al.* Differential expression of proteoglycans at central and peripheral nodes of Ranvier. *Glia* **52**, 301-308 (2005).
- 55 Cattaruzza, S. & Perris, R. Approaching the proteoglycome: molecular interactions of proteoglycans and their functional output. *Macromol Biosci* **6**, 667-680 (2006).
- 56 Matsui, F. *et al.* Changes in the amounts of chondroitin sulfate proteoglycans in rat brain after neonatal hypoxia-ischemia. *J Neurosci Res* **81**, 837-845 (2005).
- 57 Polito, A. & Reynolds, R. NG2-expressing cells as oligodendrocyte progenitors in the normal and demyelinated adult central nervous system. *J Anat* **207**, 707-716 (2005).
- 58 Properzi, F., Asher, R. A. & Fawcett, J. W. Chondroitin sulphate proteoglycans in the central nervous system: changes and synthesis after injury. *Biochem Soc Trans* **31**, 335-336 (2003).
- 59 Viapiano, M. S. & Matthews, R. T. From barriers to bridges: chondroitin sulfate proteoglycans in neuropathology. *Trends Mol Med* **12**, 488-496 (2006).
- 60 Ruoslahti, E. Brain extracellular matrix. *Glycobiology* **6**, 489-492 (1996).
- 61 Rhodes, K. E. & Fawcett, J. W. Chondroitin sulphate proteoglycans: preventing plasticity or protecting the CNS? *J Anat* **204**, 33-48 (2004).
- 62 Friedlander, D. R. *et al.* The neuronal chondroitin sulfate proteoglycan neurocan binds to the neural cell adhesion molecules Ng-CAM/L1/NILE and N-CAM, and inhibits neuronal adhesion and neurite outgrowth. *J Cell Biol* **125**, 669-680 (1994).
- 63 Gauthier, S., Herrmann, N., Ferreri, F. & Agbokou, C. Use of memantine to treat Alzheimer's disease. *CMAJ : Canadian Medical Association journal = journal de l'Association medicale canadienne* **175**, 501-502, doi:10.1503/cmaj.1060168 (2006).
- 64 Bandtlow, C. E. & Zimmermann, D. R. Proteoglycans in the developing brain: new conceptual insights for old proteins. *Physiological reviews* **80**, 1267-1290 (2000).
- 65 Aono, S. *et al.* Glycosylation site for chondroitin sulfate on the neural part-time proteoglycan, neuroglycan C. *J Biol Chem* **279**, 46536-46541 (2004).

- 66 Engel, M., Maurel, P., Margolis, R. U. & Margolis, R. K. Chondroitin sulfate proteoglycans in the developing central nervous system. I. cellular sites of synthesis of neurocan and phosphacan. *J Comp Neurol* **366**, 34-43 (1996).
- 67 Silver, J. & Miller, J. H. Regeneration beyond the glial scar. *Nat Rev Neurosci* **5**, 146-156 (2004).
- 68 Fawcett, J. W. Overcoming inhibition in the damaged spinal cord. *J Neurotrauma* **23**, 371-383 (2006).
- 69 Mueller, B. K., Mack, H. & Teusch, N. Rho kinase, a promising drug target for neurological disorders. *Nat Rev Drug Discov* **4**, 387-398 (2005).
- 70 Yiu, G. & He, Z. Glial inhibition of CNS axon regeneration. *Nature reviews. Neuroscience* **7**, 617-627, doi:10.1038/nrn1956 (2006).
- 71 Giger, R. J., Hollis, E. R., 2nd & Tuszynski, M. H. Guidance molecules in axon regeneration. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2**, a001867, doi:cshperspect.a001867 [pii] 10.1101/cshperspect.a001867 (2010).
- 72 Kolk, S. M. *et al.* Semaphorin 3F is a bifunctional guidance cue for dopaminergic axons and controls their fasciculation, channeling, rostral growth, and intracortical targeting. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **29**, 12542-12557, doi:29/40/12542 [pii] 10.1523/JNEUROSCI.2521-09.2009 (2009).
- 73 Aguayo, A. J., David, S. & Bray, G. M. Influences of the glial environment on the elongation of axons after injury: transplantation studies in adult rodents. *The Journal of experimental biology* **95**, 231-240 (1981).
- 74 Caroni, P. & Schwab, M. E. Two membrane protein fractions from rat central myelin with inhibitory properties for neurite growth and fibroblast spreading. *The Journal of cell biology* **106**, 1281-1288 (1988).
- 75 Schwab, J. M. & Schluesener, H. J. Microglia rules: insights into microglial-neuronal signaling. *Cell death and differentiation* **11**, 1245-1246, doi:10.1038/sj.cdd.4401487 (2004).
- 76 Bolsover, S., Fabes, J. & Anderson, P. N. Axonal guidance molecules and the failure of axonal regeneration in the adult mammalian spinal cord. *Restorative neurology and neuroscience* **26**, 117-130 (2008).
- 77 Loweth, J. A., Baker, L. K., Gupta, T., Guillory, A. M. & Vezina, P. Inhibition of CaMKII in the nucleus accumbens shell decreases enhanced amphetamine intake in sensitized rats. *Neuroscience letters* **444**, 157-160, doi:10.1016/j.neulet.2008.08.004 (2008).
- 78 Liebl, D. J., Morris, C. J., Henkemeyer, M. & Parada, L. F. mRNA expression of ephrins and Eph receptor tyrosine kinases in the neonatal and adult mouse central nervous system. *Journal of neuroscience research* **71**, 7-22, doi:10.1002/jnr.10457 (2003).
- 79 Sobel, R. A. Ephrin A receptors and ligands in lesions and normal-appearing white matter in multiple sclerosis. *Brain Pathol* **15**, 35-45 (2005).
- 80 Bundesen, L. Q., Scheel, T. A., Bregman, B. S. & Kromer, L. F. Ephrin-B2 and EphB2 regulation of astrocyte-meningeal fibroblast interactions in response to spinal cord lesions in adult rats. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **23**, 7789-7800 (2003).
- 81 Lyuksyutova, A. I. *et al.* Anterior-posterior guidance of commissural axons by Wnt-frizzled signaling. *Science* **302**, 1984-1988, doi:10.1126/science.1089610 (2003).

- 82 Roth, L. *et al.* Transmembrane domain interactions control biological functions of neuropilin-1. *Molecular biology of the cell* **19**, 646-654, doi:10.1091/mbc.E07-06-0625 (2008).
- 83 Trusolino, L. & Comoglio, P. M. Scatter-factor and semaphorin receptors: cell signalling for invasive growth. *Nature reviews. Cancer* **2**, 289-300, doi:10.1038/nrc779 (2002).
- 84 Bagnard, D., Lohrum, M., Uziel, D., Puschel, A. W. & Bolz, J. Semaphorins act as attractive and repulsive guidance signals during the development of cortical projections. *Development* **125**, 5043-5053 (1998).
- 85 Bagnard, D., Thomasset, N., Lohrum, M., Puschel, A. W. & Bolz, J. Spatial distributions of guidance molecules regulate chemorepulsion and chemoattraction of growth cones. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **20**, 1030-1035 (2000).
- 86 de Castro, F., Hu, L., Drabkin, H., Sotelo, C. & Chedotal, A. Chemoattraction and chemorepulsion of olfactory bulb axons by different secreted semaphorins. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **19**, 4428-4436 (1999).
- 87 Bagnard, D. *et al.* Semaphorin 3A-vascular endothelial growth factor-165 balance mediates migration and apoptosis of neural progenitor cells by the recruitment of shared receptor. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **21**, 3332-3341 (2001).
- 88 Castellani, V., Chedotal, A., Schachner, M., Faivre-Sarrailh, C. & Rougon, G. Analysis of the L1-deficient mouse phenotype reveals cross-talk between Sema3A and L1 signaling pathways in axonal guidance. *Neuron* **27**, 237-249 (2000).
- 89 Falk, J. *et al.* Dual functional activity of semaphorin 3B is required for positioning the anterior commissure. *Neuron* **48**, 63-75, doi:10.1016/j.neuron.2005.08.033 (2005).
- 90 Koncina, E., Roth, L., Gonthier, B. & Bagnard, D. Role of semaphorins during axon growth and guidance. *Advances in experimental medicine and biology* **621**, 50-64, doi:10.1007/978-0-387-76715-4_4 (2007).
- 91 Soker, S., Miao, H. Q., Nomi, M., Takashima, S. & Klagsbrun, M. VEGF165 mediates formation of complexes containing VEGFR-2 and neuropilin-1 that enhance VEGF165-receptor binding. *Journal of cellular biochemistry* **85**, 357-368 (2002).
- 92 Tamagnone, L. *et al.* Plexins are a large family of receptors for transmembrane, secreted, and GPI-anchored semaphorins in vertebrates. *Cell* **99**, 71-80 (1999).
- 93 Reza, J. N., Gavazzi, I. & Cohen, J. Neuropilin-1 is expressed on adult mammalian dorsal root ganglion neurons and mediates semaphorin3a/collapsin-1-induced growth cone collapse by small diameter sensory afferents. *Molecular and cellular neurosciences* **14**, 317-326, doi:10.1006/mcne.1999.0786 (1999).
- 94 Kaneko, S. *et al.* A selective Sema3A inhibitor enhances regenerative responses and functional recovery of the injured spinal cord. *Nature medicine* **12**, 1380-1389, doi:nm1505 [pii] 10.1038/nm1505 (2006).
- 95 Moreau-Fauvarque, C. *et al.* The transmembrane semaphorin Sema4D/CD100, an inhibitor of axonal growth, is expressed on oligodendrocytes and upregulated after CNS lesion. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **23**, 9229-9239 (2003).

- 96 Pasterkamp, R. J., Kolk, S. M., Hellemons, A. J. & Kolodkin, A. L. Expression patterns of semaphorin7A and plexinC1 during rat neural development suggest roles in axon guidance and neuronal migration. *BMC developmental biology* **7**, 98, doi:10.1186/1471-213X-7-98 (2007).
- 97 Kury, P., Zickler, P., Stoll, G., Hartung, H. P. & Jander, S. Osteopontin, a macrophage-derived matricellular glycoprotein, inhibits axon outgrowth. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **19**, 398-400, doi:10.1096/fj.04-1777fje (2005).
- 98 Diaz, N. F. *et al.* 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, doi:S0361-9230(07)00068-8 [pii] 10.1016/j.brainresbull.2007.02.002 (2007).
- 99 Diaz, N. F., Diaz-Martinez, N. E., Camacho-Arroyo, I. & Velasco, I. 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, doi:S0736-5748(09)00043-4 [pii] 10.1016/j.ijdevneu.2009.04.002 (2009).
- 100 Velasco, I., Velasco-Velazquez, M. A., Salazar, P., Lajud, N. & Tapia, R. 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 (2003).
- 101 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* **18**, 1171-1181, doi:ct2045lopezgonzalez [pii] 10.3727/096368909X12483162197123 (2009).
- 102 Schallert, T., Fleming, S. M., Leasure, J. L., Tillerson, J. L. & Bland, S. T. CNS plasticity and assessment of forelimb sensorimotor outcome in unilateral rat models of stroke, cortical ablation, parkinsonism and spinal cord injury. *Neuropharmacology* **39**, 777-787, doi:S0028390800000058 [pii] (2000).
- 103 Guzman-Ramos, K., Osorio-Gomez, D., Moreno-Castilla, P. & Bermudez-Rattoni, F. Off-line concomitant release of dopamine and glutamate involvement in taste memory consolidation. *J Neurochem* **114**, 226-236, doi:JNC6758 [pii] 10.1111/j.1471-4159.2010.06758.x (2010).
- 104 Tamariz, E. *et al.* Axon responses of embryonic stem cell-derived dopaminergic neurons to semaphorins 3A and 3C. *Journal of neuroscience research* **88**, 971-980, doi:10.1002/jnr.22268 (2010).
- 105 Minor, K. H., Bournat, J. C., Toscano, N., Giger, R. J. & Davies, S. J. Decorin, erythroblastic leukaemia viral oncogene homologue B4 and signal transducer and activator of transcription 3 regulation of semaphorin 3A in central nervous system scar tissue. *Brain* **134**, 1140-1155, doi:awq304 [pii] 10.1093/brain/awq304 (2011).
- 106 Rubio, S. E. *et al.* Semaphorin 3C is not required for the establishment and target specificity of the GABAergic septohippocampal pathway in vitro. *Eur J Neurosci* **34**, 1923-1933, doi:10.1111/j.1460-9568.2011.07906.x (2011).
- 107 Mendez, I., Baker, K. A. & Hong, M. Simultaneous intrastriatal and intranigral grafting (double grafts) in the rat model of Parkinson's disease. *Brain Res Brain Res Rev* **32**, 328-339 (2000).

- 108 Bukhatwa, S. *et al.* An immunohistochemical and stereological analysis of PSI-induced nigral neuronal degeneration in the rat. *J Neurochem* **109**, 52-59, doi:JNC5956 [pii]
10.1111/j.1471-4159.2009.05956.x (2009).
- 109 Bradbury, E. J. *et al.* Chondroitinase ABC promotes functional recovery after spinal cord injury. *Nature* **416**, 636-640, doi:10.1038/416636a
416636a [pii] (2002).
- 110 Alilain, W. J., Horn, K. P., Hu, H., Dick, T. E. & Silver, J. Functional regeneration of respiratory pathways after spinal cord injury. *Nature* **475**, 196-200, doi:nature10199 [pii]
10.1038/nature10199 (2011).
- 111 Kantor, D. B. *et al.* Semaphorin 5A is a bifunctional axon guidance cue regulated by heparan and chondroitin sulfate proteoglycans. *Neuron* **44**, 961-975, doi:S0896627304007925 [pii]
10.1016/j.neuron.2004.12.002 (2004).
- 112 Piaton, G. *et al.* Class 3 semaphorins influence oligodendrocyte precursor recruitment and remyelination in adult central nervous system. *Brain* **134**, 1156-1167, doi:awr022 [pii]
10.1093/brain/awr022 (2011).
- 113 Van Kampen, J. M. & Eckman, C. B. Dopamine D3 receptor agonist delivery to a model of Parkinson's disease restores the nigrostriatal pathway and improves locomotor behavior. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **26**, 7272-7280, doi:26/27/7272 [pii]
10.1523/JNEUROSCI.0837-06.2006 (2006).
- 114 Gaillard, A. *et al.* Anatomical and functional reconstruction of the nigrostriatal pathway by intranigral transplants. *Neurobiol Dis* **35**, 477-488, doi:S0969-9961(09)00173-9 [pii]
10.1016/j.nbd.2009.07.003 (2009).
- 115 Thompson, L. H., Grealish, S., Kirik, D. & Bjorklund, A. Reconstruction of the nigrostriatal dopamine pathway in the adult mouse brain. *Eur J Neurosci* **30**, 625-638, doi:EJN6878 [pii]
10.1111/j.1460-9568.2009.06878.x (2009).
- 116 Grealish, S. *et al.* The A9 dopamine neuron component in grafts of ventral mesencephalon is an important determinant for recovery of motor function in a rat model of Parkinson's disease. *Brain* **133**, 482-495, doi:awp328 [pii]
10.1093/brain/awp328 (2010).
- 117 O'Keefe, F. E. *et al.* Induction of A9 dopaminergic neurons from neural stem cells improves motor function in an animal model of Parkinson's disease. *Brain* **131**, 630-641, doi:awm340 [pii]
10.1093/brain/awm340 (2008).
- 118 Studer, L., Tabar, V. & McKay, R. D. Transplantation of expanded mesencephalic precursors leads to recovery in parkinsonian rats. *Nat Neurosci* **1**, 290-295, doi:10.1038/1105 (1998).

Axon Responses of Embryonic Stem Cell-Derived Dopaminergic Neurons to Semaphorins 3A and 3C

Elisa Tamariz,¹ N. Emmanuel Díaz-Martínez,² Néstor F. Díaz,²
 Claudia M. García-Peña,¹ Iván Velasco,^{2*} and Alfredo Varela-Echavarría^{1*}

¹Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México, Querétaro, México

²Departamento de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F., México

Class 3 Semaphorins are a subfamily of chemotropic molecules implicated in the projection of dopaminergic neurons from the ventral mesencephalon and in the formation of the nigrostriatal pathway (NSP) during embryonic development. In humans, loss of mesencephalic dopaminergic neurons leads to Parkinson's disease (PD). Cell replacement therapy with dopaminergic neurons generated from embryonic stem cells (ES-TH⁺) is being actively explored in models of PD. Among several requisites for this approach to work are adequate reconstruction of the NSP and correct innervation of normal striatal targets by dopaminergic axons. In this work, we characterized the response of ES-TH⁺ neurons to semaphorins 3A, 3C, and 3F and compared it with that of tyrosine hydroxylase-positive neurons (TH⁺) obtained from embryonic ventral mesencephalon (VM-TH⁺). We observed that similar proportions of ES-TH⁺ and VM-TH⁺ neurons express semaphorin receptors neuropilins 1 and 2. Furthermore, the axons of both populations responded very similarly to semaphorin exposure: semaphorin 3A increased axon length, and semaphorin 3C attracted axons and increased their length. These effects were mediated by neuropilins, insofar as addition of blocking antibodies against these proteins reduced the effects on axonal growth and attraction, and only TH⁺ axons expressing neuropilins responded to the semaphorins analyzed. The observations reported here show phenotypic similarities between VM-TH⁺ and ES-TH⁺ neurons and suggest that semaphorins 3A and 3C could be employed to guide axons of grafted ES-TH⁺ in therapeutic protocols for PD. © 2009 Wiley-Liss, Inc.

Key words: semaphorins; dopamine neurons; embryonic stem cells; neuropilin; collagen gels

Embryonic stem (ES) cells give rise to cell types from the three embryonic germ layers. Among them, dopaminergic neurons are widely studied because of their potential in cell therapy for the neurodegenerative disorder Parkinson's disease (PD; Lindvall and Kokaia, 2006). Two main protocols have been developed to

differentiate dopaminergic neurons from ES cells in vitro. One uses stromal cells (Kawasaki et al., 2000; Barberi et al., 2003; Shintani et al., 2008), and the other is a multistep protocol including the formation of embryoid bodies and the use of growth factors (Lee et al., 2000; Kim et al., 2002). In both cases, the obtained tyrosine hydroxylase-expressing neurons (ES-TH⁺) resemble the A9 subtype, which corresponds to the dopaminergic neurons from the substantia nigra pars compacta (SNc) in the ventral midbrain, assessed by the expression of markers such as Nurr-1, Pitx3, Lmx1b, Foxa2, RALDH1, calretinin, and GIRK2 (Barberi et al., 2003; Zhao et al., 2004; Lin et al., 2005; Roy et al., 2006; Rodríguez-Gomez et al., 2007; Diaz et al., 2009).

SNc dopaminergic neurons project to the dorsolateral striatum, forming the nigrostriatal pathway (NSP), which has an important role in the control of movement. In humans, the specific loss of SNc neurons leads to PD. Successful transplantation protocols for cell therapy for PD will require considerable knowledge regarding the identity of the neurons obtained from ES cells and their capacity to maintain a phenotype similar to the endogenous dopaminergic populations upon transplantation (Isacson et al., 2003). Another aspect to consider is the behavior of dopaminergic axons in response to guidance cues, as projection to their normal target is desirable to reestablish the lost pathway (Mendez et al., 1996).

Contract grant sponsor: IMPULSA02-UNAM (Stem Cell Group), National Institute of Neurological Disorders and Stroke/Fogarty International Center; Contract grant number: NS057850; Contract grant sponsor: CONACYT; Contract grant numbers: 40286M, 14825 and 82482.

*Correspondence to: Alfredo Varela-Echavarría, Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México, Blvd. Juriquilla 3001, Querétaro, 76230 México. E-mail: varela@inb.unam.mx or Iván Velasco, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México D.F., México. E-mail: ivelasco@ifc.unam.mx

Received 19 December 2008; Revised 12 June 2009; Accepted 21 August 2009

Published online 26 October 2009 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com). DOI: 10.1002/jnr.22268

During development of the nervous system, axons project to their targets following stereotypical routes guided by molecular cues secreted by, or expressed at, the surface of surrounding cells (Yamamoto et al., 2002). Some guidance molecules implicated in the projection of dopaminergic neurons to form the NSP are the ephrin tyrosine kinase receptors (Yue et al., 1999; Sieber et al., 2004), the Slit proteins (Bagri et al., 2002; Lin et al., 2005), netrin-1 (Livesey and Hunt, 1997; Lin et al., 2005), and the class 3 semaphorins (Sema-) 3A, 3C, and 3F (Hernandez-Montiel et al., 2008). The effect of some of these guidance molecules has been studied on ES-TH⁺ neurons; netrin-1 enhanced axon growth, whereas Slit1 and Slit3 impaired it (Lin and Isacson, 2006).

Class 3 semaphorins are secreted proteins involved in the guidance of neuronal and nonneuronal cells, and they interact with receptor complexes formed by plexins and neuropilins (Pasterkamp and Kolodkin, 2003; Koncina et al., 2007; Neufeld et al., 2007; Suzuki et al., 2008). Using explants of ventral mesencephalon (VM), we previously observed that Sema3A increases the growth of TH⁺ axons, Sema3C attracts them and increases their length, whereas Sema3F repels them (Hernandez-Montiel et al., 2008), suggesting that these proteins are involved in promoting and directing dopaminergic projections during the formation of NSP. In the present study, we analyzed the response of growing axons of ES-TH⁺ neurons, obtained by a five-stage differentiation protocol, to the same molecules. We show that ES-TH⁺ neurons express the receptors neuropilin 1 (Npn1) and neuropilin 2 (Npn2) in a proportion similar to that of embryonic ventral mesencephalic dopaminergic neurons (VM-TH⁺). Moreover, under the same experimental conditions, ES-TH⁺ and VM-TH⁺ axons increase their length or are attracted, in response to specific semaphorins. These results reveal a functional chemotropic resemblance between both assayed TH⁺ neurons and suggest that class 3 semaphorins could be employed to promote or guide axons of ES-TH⁺ neurons upon their transplantation in therapeutic approaches for treatment of PD.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Wistar rat embryos at 13.5 and 14.5 days of gestational age (E13.5 and E14.5) were used in accordance with the regulations of the Mexican government regarding the use of laboratory animals for research purposes (NOM-062-ZOO-1999) and following *The Guide for the care and use of laboratory animals* of the Institute of Laboratory Animal Resources, U.S. National Research Council. Pregnant dams were euthanized by cervical dislocation by trained personnel with a minimum of distress for the animal. The day of detection of vaginal plug was considered E0.5.

ES Cell Differentiation

R1 ES cells were differentiated into TH⁺ neurons using the five-stage protocol as previously described (Diaz et al., 2007, 2009). ES cells were expanded undifferentiated (stage I) in the presence of 1,000 U/ml leukemia inhibitory factor (Chemicon, Temecula, CA). Subconfluent ES cultures were detached from the culture plate by trypsin-EDTA (Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA) treatment and seeded on bacterial culture dishes to allow formation of embryoid bodies (stage II). After 4 days in culture, embryoid bodies were transferred to tissue culture dishes and incubated for 7–11 days with serum-free medium supplemented with insulin, transferrin, selenite, and fibronectin (ITSFn) to select nestin-positive neural precursor cells (stage III). To expand the nestin-positive population (stage IV), cells were detached with trypsin, and the cell suspension was plated on 24-well plates and incubated with N2 medium (Gibco, Invitrogen) supplemented with 10 ng/ml fibroblast growth factor (FGF-2; Peprotech, Rocky Hill, NJ), 100 ng/ml FGF-8b (Peprotech), and 100 ng/ml recombinant human sonic hedgehog (Shh; R&D Systems, Minneapolis, MN) for 4–6 days. Final differentiation was induced by incubation with N2 medium supplemented with 200 μM ascorbic acid (Sigma, St. Louis, MO) and without growth factors (stage V).

Collagen Gel Cocultures

Human embryonic kidney (HEK) 293 cells were mock transfected or transfected with expression vectors for Sema3A, Sema3C, or Sema3F using the FuGene reagent (Roche, Indianapolis, IN). Cells were detached with trypsin-EDTA 24 hr after transfection, washed, and resuspended in a collagen solution extracted from rat tail at 7,000 cells/μl. Drops of 1 μl of this suspension were dispensed onto a culture dish and polymerized for 40 min at 37°C, 5% CO₂ as described elsewhere (Hernandez-Montiel et al., 2008). For cocultures, differentiated ES cells at day 3 of stage V were trypsinized and resuspended in the collagen solution at a final concentration of 300 cells/μl. Drops of 35 μl of the collagen-ES cell suspension mix were placed over the cell clusters of HEK293 cells included in minigels, prepared as described above. The new gel was allowed to polymerize for 40 min at 37°C, 5% CO₂, and then N2-supplemented DMEM-F12 medium containing 0.2 mM ascorbic acid was added to each coculture to allow neurons to develop their processes for 48 hr. For dissociated embryonic ventral mesencephalic (VM) cocultures, tissue from E13.5 or E14.5 embryos was obtained in Hank's solution (Gibco, Invitrogen) and dissociated as described previously (Hernandez-Montiel et al., 2008). Briefly, VM portions were treated with trypsin and partially dissociated using a Pasteur pipette. The resulting suspension was centrifuged, resuspended in collagen solution, and placed over a cell cluster of HEK293 cells previously included in a small collagen gel as described above for cocultures with differentiated ES cells. To block neuropilins, cocultures were incubated for 2 days with antibodies specific for Npn1 and/or Npn2 (R&D Systems) at a concentration of 5 μg/ml and 3 μg/ml, respectively, or with purified normal goat IgG (R&D Systems), at equivalent concentrations.

TABLE I. Number of Axons Measured in All Semaphorin-Exposed Cultures*

Effect of semaphorins on axon length of ES-TH ⁺ and VM-TH ⁺ neurons (Fig. 2)				
	Control/Sema3A	Control/Sema3C	Control/Sema3F	Control/Sema3A-Fc
VM-TH ⁺	92/102	60/93	27/50	NA
ES-TH ⁺	54/35	54/37	54/33	30/41
Effect of semaphorins on direction of ES-TH ⁺ and VM-TH ⁺ axons (Fig. 3)				
	Control/Sema3A	Control/Sema3C	Control/Sema3F	
VM-TH ⁺	56/71	69/95		28/39
ES-TH ⁺	68/23	68/46		68/26
Effect of anti-Npn1 antibodies on axon growth of semaphorin 3A-treated ES-TH ⁺ (Fig. 4)				
	Control	Sema3A	Sema3A + anti-Npn1	Sema3A + goat Ig
ES-TH ⁺	76	54	96	92
Effect of anti-Npn1 plus anti-Npn2 antibodies on axon growth of semaphorin 3C-treated ES-TH ⁺ (Fig. 4)				
	Control	Sema3C	Sema3C + anti-Npn1/Npn2	Sema3C + goat Ig
ES-TH ⁺	75	70	116	80
Effect of anti-Npn1 plus anti-Npn2 antibodies on axon direction of semaphorin 3C-treated ES-TH ⁺ (Fig. 4)				
	Control	Sema3C	Sema3C + anti-Npn1/Npn2	Sema3C + goat Ig
ES-TH ⁺	60	77	106	91
Effect of semaphorins on axon growth of ES-TH ⁺ expressing Npn1 and Npn2 receptors (Fig. 5)				
	Npn1 ⁺	Npn1 ⁻	Npn2 ⁺	Npn2 ⁻
Control	60	9	78	7
Sema3A	35	7	85	7
Control	75	17	102	9
Sema3C	82	24	44	16
Effect of semaphorins on angle of axon growth of ES-TH ⁺ expressing Npn1 and Npn2 receptors (Fig. 5)				
	Npn1 ⁺	Npn1 ⁻	Npn2 ⁺	Npn2 ⁻
Control	75	17	102	9
Sema3C	78	18	39	12

*ES-TH⁺, dopaminergic neurons differentiated from embryonic stem cells; VM-TH⁺, dopaminergic neurons obtained from embryonic ventral mesencephalon; NA, not applicable; Npn1, neuropilin-1; Npn2, neuropilin-2; Sema, semaphorin.

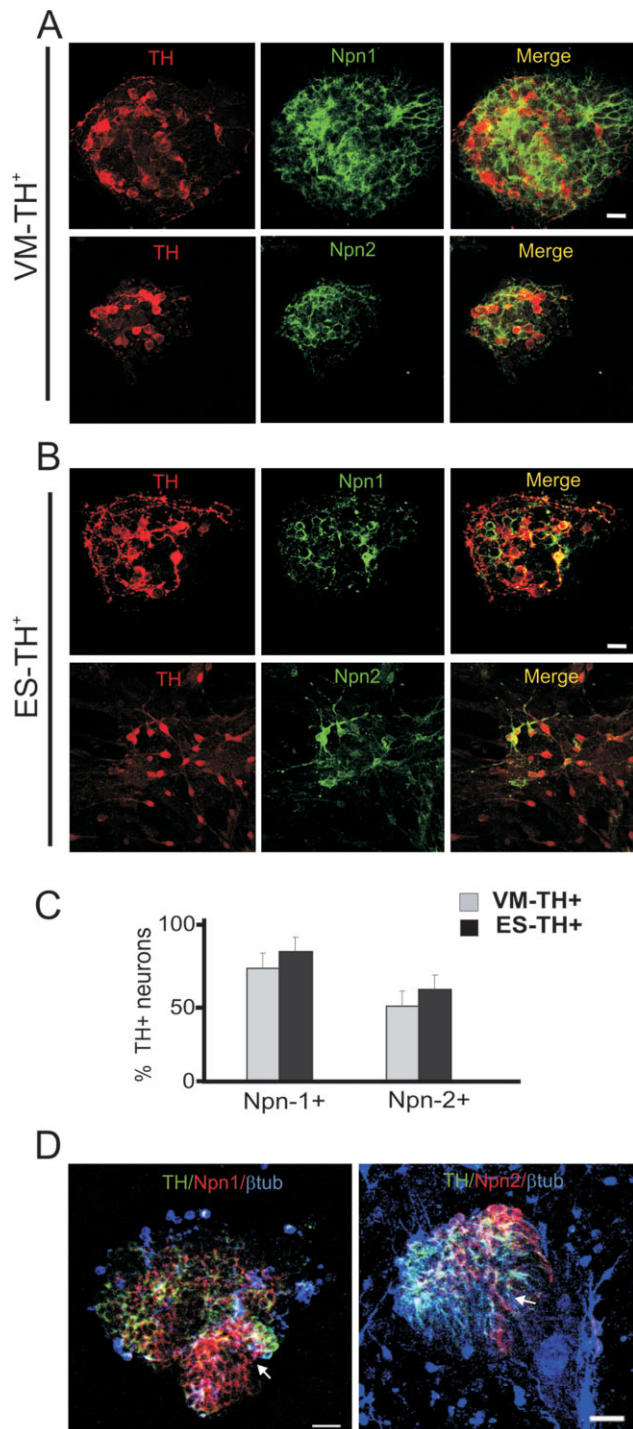
Immunostaining

Cultures were fixed with 3.5% paraformaldehyde in phosphate-buffered saline (PBS), washed extensively with PBS, and blocked with 5% preimmune goat or horse serum in PBS. Gels were incubated with mouse monoclonal anti-TH (Sigma), rabbit anti-TH (Pel-Freez, Rogers, AK), mouse anti- β tubulin III (Covance, Berkeley, CA), goat anti-Npn1 (R&D Systems), or goat anti-Npn2 (R&D Systems) antibodies in 0.1% Triton X-100/PBS. After extensive PBS washes, primary antibodies were detected with Alexa-Fluor secondary antibodies (Invitrogen). Immunostained cocultures were mounted in Fluoromont-G medium (Southern Biotechnology, Birmingham, AL) and observed via confocal microscopy.

Statistical Analyses

The mean \pm SEM is presented for each experimental set, performed in three to six independent experiments. Table I shows the number of axons measured for each figure. The number of cells expressing Npn1 or Npn2 was compared between VM-TH⁺ and ES-TH⁺ cells and analyzed with the Student's *t*-test in the SAS statistical program (SAS institute Inc., Cary, NC). For axon outgrowth experiments, TH⁺ axons were measured in confocal images in ImagePro Plus (Media Cybernetics, Inc., Bethesda, MD). The data obtained for each condition were analyzed by the Student's *t*-test in the SAS statistical program. For axon orientation experiments, the angles of growth of TH⁺ axons were measured in confocal images in ImagePro Plus. Axons

in each condition were categorized into three possible angle ranges as depicted in Figure 3A, and the frequency of axons in each angle category was determined. Only TH⁺ neurons that were clear of the HEK293 clusters were considered, so dopaminergic cells located above the clusters were not quantified. These data sets were evaluated by ANOVA, and means were compared by the least square mean method in the SAS statistical program.



RESULTS

ES-TH⁺ Neurons Express the Semaphorin Coreceptors Neuropilin 1 and Neuropilin 2

TH⁺ neurons were generated from ES cells by a five-stage differentiation protocol, yielding $32\% \pm 4\%$ (mean \pm SEM, $n = 6$) of neurons that express TH (not shown), in agreement with previous reports (Lee et al., 2000; Diaz et al., 2007, 2009). We examined the expression of semaphorin coreceptors Npn1 and Npn2 in differentiated ES cells at day 3 of stage V. This maturation stage has been previously used for transplantation of ES-TH⁺ neurons into the striatum of hemiparkinsonian rats to revert motoric symptoms (Kim et al., 2002; Rodriguez-Gomez et al., 2007). Differentiated ES cultures were fixed and immunostained for TH/Npn1 or TH/Npn2. Similar studies were performed in partially dissociated rat ventral mesencephalic (VM) cells from E13.5, a stage at which TH⁺ neurons are growing and can respond to Semaphorin 3C and -3F (Hernandez-Montiel et al., 2008). Dissociated VM cells grew in small cell clusters that contain TH⁺ neurons in a less compact distribution than in a VM explant. Among VM-TH⁺ cells, 77.2% of the neurons expressed Npn1, whereas 48.3% expressed Npn2 (Fig. 1A,C). In differentiated ES cultures, TH⁺ neurons were also positive for Npn1 and Npn2 (Fig. 1B,C); Npn1 was also present in a higher proportion of TH⁺ neurons (82%) than Npn2 (58.6%). When we compared the percentage of TH⁺ cells expressing either one of the Npn receptors, no differences were observed between ES-TH⁺ and VM-TH⁺ (Fig. 1C). Interestingly, in VM and ES cultures, a β -tubulin III⁺/TH⁻ neuronal population also expressed Npn1 and Npn2 (Fig. 1D, VM not shown).

Sema3A and -3C Increase VM-TH⁺ and ES-TH⁺ Axon Length

Expression of Npn1 and Npn2 in ES-TH⁺ neurons raised the possibility that their axons could respond to class 3 semaphorins. To compare the responses of VM-TH⁺ and ES-TH⁺ axons to semaphorins, we prepared gels that included HEK293 cells and either VM-TH⁺ or ES-TH⁺ neurons. Mock-transfected HEK293 cell clusters or clusters expressing Sema3A, -3C, or -3F

Fig. 1. ES-TH⁺ neurons express Npn1 and Npn2 in a proportion similar to VM-TH⁺ neurons. Partially dissociated E13.5 VM (A) or differentiated ES cells cultured until day 3/stage V (B) were double immunostained for TH/Npn1 or TH/Npn2. VM-TH⁺ and ES-TH⁺ express Npn1 and Npn2 (A,B). In both ES and VM cultures, the percentage of TH⁺ neurons expressing Npn1 was larger than that expressing Npn2 (C). There was no difference, however, in the fraction of the cells expressing Npn1 or Npn2 between VM and ES dopamine neurons (C). Triple immunostaining of differentiated ES cultures for TH, β -tubulin III, and Npn1 or Npn2 showing that TH-negative neurons present in the culture express Npn1 and Npn2 (D, arrows). Images representative of four independent experiments are averaged in C. Scale bars = 10 μ m in A,B; 20 μ m in D.

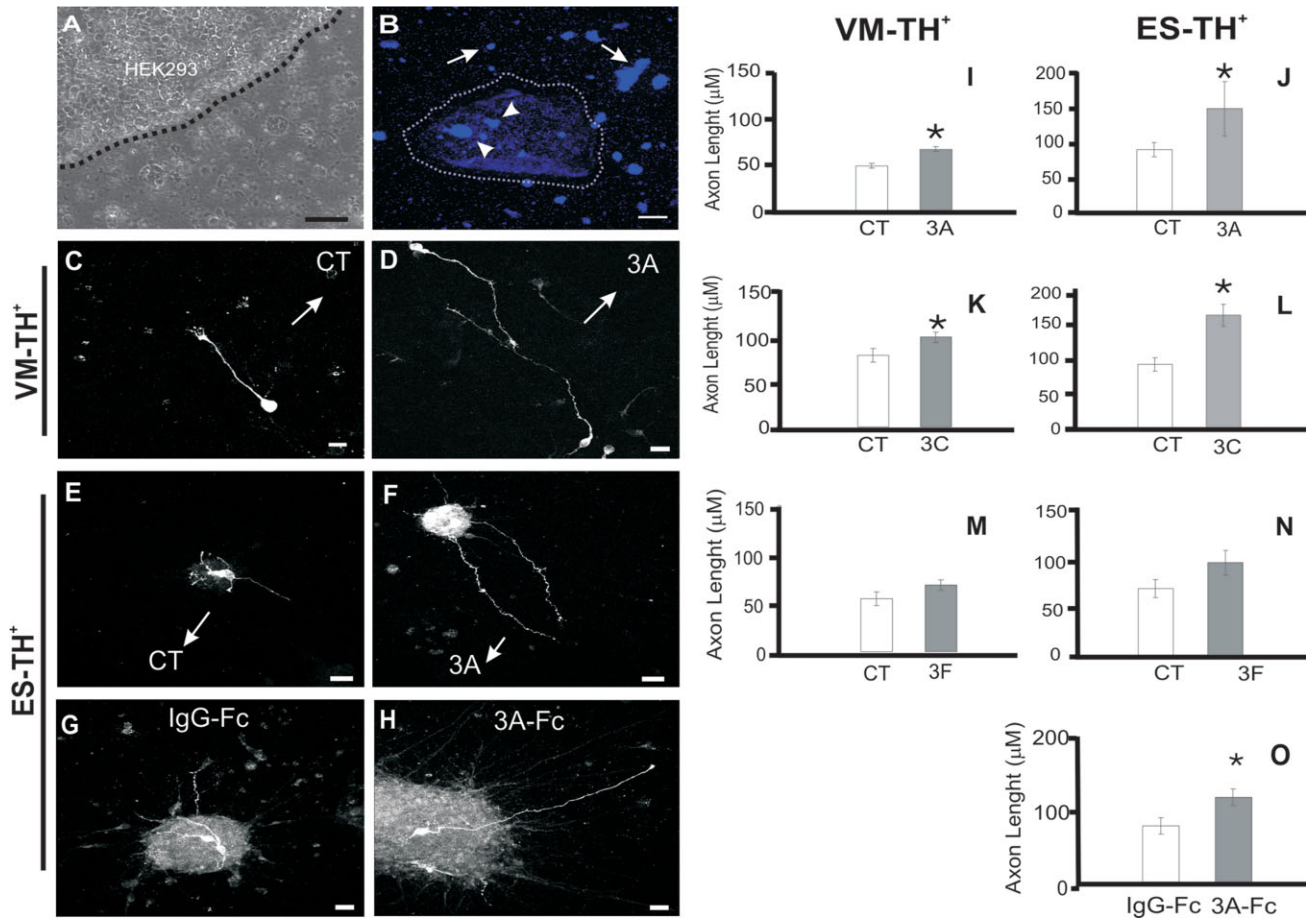


Fig. 2. Semaphorins 3A and 3C increase axon length of ES-TH⁺ neurons. VM and differentiated ES cells included in collagen gels were cocultured with mock- or semaphorin vector-transfected HEK293 cells. **A:** Phase-contrast micrograph showing a coculture of a HEK293 cell cluster and partially dissociated differentiated ES cells included in a collagen gel. **B:** Low-magnification micrograph of a coculture stained with Hoechst, showing nuclei of HEK293 clusters (dotted line) and ES cells (arrows). ES clusters detected over the HEK293 aggregates (arrowheads) were not measured. **C,D,I:** Partially dissociated E14.5 VM cells exposed to mock-transfected HEK293 cells (control; CT) or to Semaphorin 3A and quantification of TH⁺ axon length. Partially dissociated E13.5 VM exposed to

Sema3C (**K**) showed enhanced axonal growth, whereas Sema3F (**M**) had no effect. Differentiated ES cultures exposed to HEK293 cells transfected with Sema3A (**E,F,J**), Sema3C (**L**), or Sema3F (**N**) or alternatively incubated with recombinant Sema3A-Fc (**O**). TH⁺ axon length was measured in images obtained by confocal microscopy. Representative images for Sema3A and recombinant Sema3A-treated cultures are shown with their respective controls (**C-H**). In **I-L,O**, a significant difference was found between control and semaphorin-treated cultures (**P* < 0.05). Arrows in **C-F** indicate the direction in which HEK293 aggregates were located. Scale bars = 100 μm in **A**; 200 μm in **B**; 20 μm in **C-H**.

were cocultured with dissociated TH⁺ neurons derived from VM or ES cells (Fig. 2A,B). Based on our previous results, E13.5 VM cultures were exposed to Sema3C and -3F, and E14.5 cultures were exposed to Sema3A (Hernandez-Montiel et al., 2008). Figure 2C,D,I shows that Sema3A increases by 35% the axon length in VM-TH⁺ cultures compared with control cultures (mock-transfected HEK293 cells), whereas, in VM-TH⁺ cultures treated with Sema3C, an increase of 25% was observed (Fig. 2K). ES-TH⁺ cultures treated with Sema3A or -3C showed more dramatic increases in axon length: Sema3A caused an increase of 64% (Fig. 2E,F,J) and Sema3C an increase of 78% over con-

trol values (Fig. 2L). Moreover, addition of recombinant Sema3A to the culture, in the absence of HEK293 cells, caused an increase in axon length of 50% (Fig. 2G,H,O). No effect, however, was observed when VM-TH⁺ or ES-TH⁺ neurons were cocultured with HEK293 cells transfected with a Sema3F expression vector (Fig. 2M,N).

Sema3C Attracts ES-TH⁺ Axons

To evaluate the chemotropic effects of semaphorins on ES-TH⁺ axons and to compare them with those on VM-TH⁺, we performed collagen gel coculture experi-

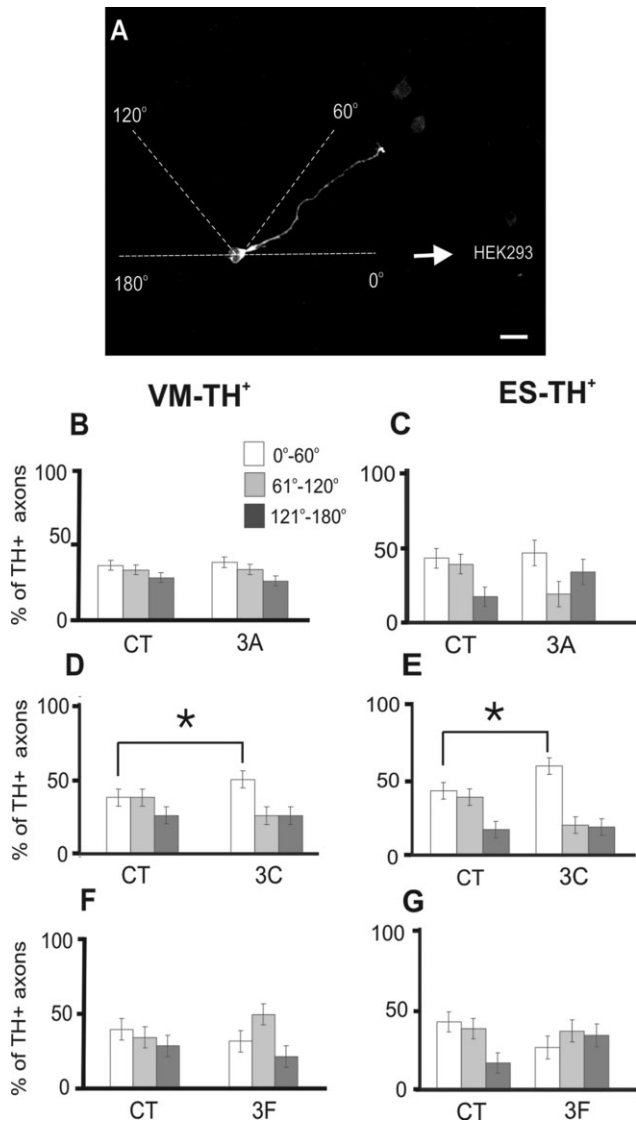


Fig. 3. Semaphorin 3C attracts ES-TH⁺ axons. **A:** Diagram to illustrate angle classification of TH⁺ neurons. TH⁺ cells were immunostained, and the angle of growth of each axon relative to the location of clustered HEK cell was determined. The frequency of axons with angles falling in each of the three ranges 0°–60°, 61°–120°, and 121°–180° was determined. E14.5 VM (**B**), E13.5 VM (**D,F**), or cultures of ES differentiated to TH⁺ neurons (**C,E,G**) were partially dissociated and cocultured in collagen gels with mock-transfected HEK293 (CT) or HEK cells transfected with expression vectors for Semaphorin 3A (**B,C**), Semaphorin 3C (**D,E**) or Semaphorin 3F (**F,G**). **B,D,F** show the results for VM-TH⁺, whereas **C,E,G** include data from ES-TH⁺ neurons. In **D,E** (Semaphorin 3C), an increase in the proportion of processes falling between 0° and 60° was found in comparison with the control (CT) condition (**P* < 0.05). Scale bar = 20 μm.

ments in which the angles of growing TH⁺ processes, relative to the location of the HEK293 clusters, were measured and grouped within three possible categories, as shown in Figure 3A. Control cocultures with mock-transfected HEK293 cells showed a random distribution

of TH axons (Fig. 3). An increase in the frequency in the 0°–60° range reveals an attractive effect, whereas an increase in the 121°–180° range indicates a repulsive effect. Semaphorin 3C attracted both VM-TH⁺ and ES-TH⁺ axons, insofar as increases were observed in the percentage of TH⁺ axons in the 0°–60° category in comparison with control cultures (Fig. 3D,E). No attractive or repulsive effects on TH⁺ processes were detected in Semaphorin 3A or Semaphorin 3F cocultures (Fig. 3B,C,F,G).

Effects of Semaphorin 3A and -3C on ES-TH⁺ Axons Are Mediated by Npn1 and Npn2

To test whether the observed effects of Semaphorin 3A and Semaphorin 3C on ES-TH⁺ axons were specific and mediated by interaction with the coreceptors Npn1 and Npn2, we cocultured ES-TH⁺ neurons with HEK293 cell aggregates expressing Semaphorin 3A and added a Npn1 blocking antibody to the culture medium (Chauvet et al., 2007). Because Npn1 mediates responses to Semaphorin 3A (He and Tessier-Lavigne, 1997; Kitsukawa et al., 1997; Kolodkin et al., 1997), we expected a reduction in the axon length. In this new set of experiments, we observed again the growth-promoting action of Semaphorin 3A relative to control cultures (Fig. 4A,B,I). Addition of anti-Npn1 antibody, but not of control immunoglobulins, reduced axonal growth to control levels (Fig. 4C,D,I). Responses to Semaphorin 3C are mediated through both Npn1 and Npn2 coreceptors (Chen et al., 1997; Takahashi et al., 1998). We therefore tested whether neutralizing Npn antibodies prevented the growth increase and attraction resulting from Semaphorin 3C. Hence, cocultures of ES-TH⁺ cells with HEK293 cell aggregates expressing Semaphorin 3C in the presence or absence of anti-Npn1 and anti-Npn2 antibodies were evaluated. We observed that addition of both anti-Npn1 and anti-Npn2 antibodies reduced the axon length-enhancing effect of Semaphorin 3C (Fig. 4E–G,J), whereas control immunoglobulins did not (Fig. 4H,J). When we evaluated the orientation of TH⁺ axons in Semaphorin 3C-exposed cultures in the presence of anti-Npn1 and anti-Npn2 antibodies, we also observed that the chemotropic effect of Semaphorin 3C was abolished (Fig. 4K).

To analyze further the specificity of ES-TH⁺ axon responses to semaphorins, we performed double immunostaining (TH/Npn1 or TH/Npn2; Fig. 5A–H) in collagen gel cocultures to quantify independently the responses of TH⁺ axons expressing or lacking neuropilins. Differentiated ES cultures exposed to mock-transfected (control) Semaphorin 3A- or Semaphorin 3C-expressing HEK293 cell clusters were cultured for 48 hr, and the length and orientation of the different axon populations were measured. Among TH⁺ axons, Npn1⁺ axons significantly increased their length in response to Semaphorin 3A, whereas no increase was observed in Npn1[−], Npn2⁺, or Npn2[−] axons (Fig. 5I). In the case of cultures exposed to Semaphorin 3C (Fig. 5A–H), TH⁺ axons expressing Npn1 and Npn2 significantly increased their length and also showed significant attraction toward HEK293 aggregates

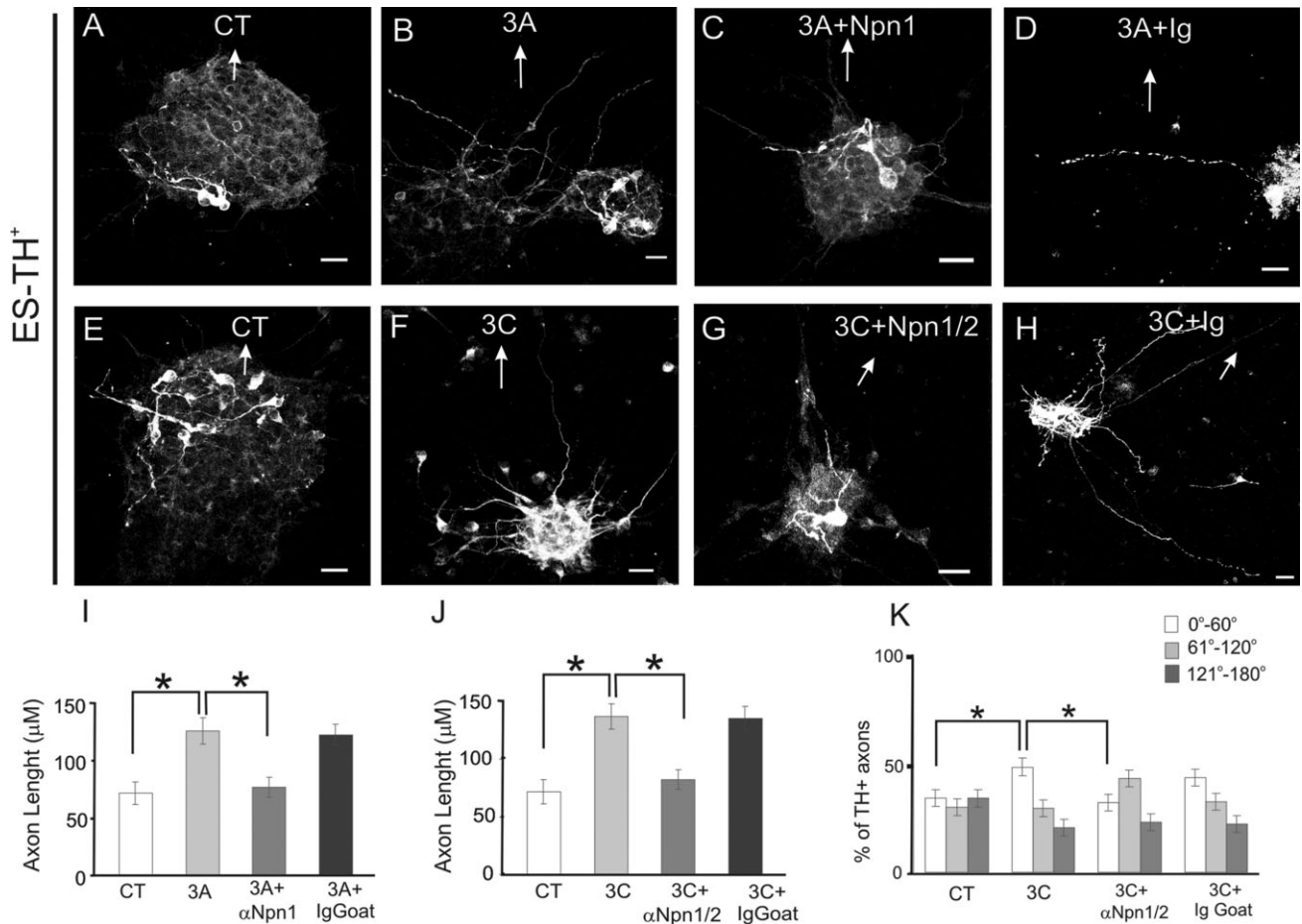


Fig. 4. Antibodies against Npn1 and Npn2 abolish Semaphorin 2A and -3C effects. ES cultures differentiated to TH⁺ neurons were partially dissociated and cocultured in collagen gels with mock-transfected HEK293 cells (CT; **A,E**) or cells transfected with expression vectors for Semaphorin 3A (**B-D**) or Semaphorin 3C (**F-H**). Arrows indicate the direction of HEK293 aggregates. Anti-Npn1 antibodies were added to Semaphorin 3A-exposed cultures (C); anti-Npn1 plus anti-Npn2 antibodies

were added to Semaphorin 3C exposed cultures (G). To test for specificity, goat immunoglobulins (Ig) were added to Semaphorin 3A- or Semaphorin 3C-exposed cultures at equivalent concentrations (D,H). As described in the legends to Figures 2 and 3, axon length and angle of growth were measured (**I-K**). Brackets indicate statistical differences between bars (* $P < 0.05$). Scale bars = 20 μm.

(Fig. 5J-L), although no responses in length or angle of growth were observed in either Npn1⁻ or Npn2⁻ axons. Altogether, these results show that both the increase in axon length induced by Semaphorin 3A and 3C and the change of angle of growth induced by Semaphorin 3C are mediated by neuropilin coreceptors.

DISCUSSION

In this work, we show that ES-TH⁺ neurons express the semaphorin coreceptors Npn1 and Npn2 in proportions similar to those of partially dissociated embryonic VM-TH⁺ neurons. Moreover, ES-TH⁺ neurons show the same response as VM-TH⁺ neurons when exposed to Semaphorin 3A or -3C. In both types of neurons, Semaphorin 3A and -3C increased axon length, whereas only Semaphorin 3C had attractive properties. The use of neu-

ropilin-blocking antibodies and the analysis of responses of TH⁺/Npn1⁺ and TH⁺/Npn2⁺ axons to Semaphorin 3A and Semaphorin 3C confirmed that these effects are specific and are mediated by Npn1 and Npn2 in accordance with the known specificity of these semaphorins for their receptors. On the other hand, Semaphorin 3F did not produce any effect on either type of neurons. Hence, the responses of ES-TH⁺ and partially dissociated VM-TH⁺ axons to Semaphorin 3A, -3C, or -3F were similar.

In previous studies, we observed similar responses to semaphorins of TH⁺ axons of ventral midbrain neurons, but some differences from the present study were detected. Using rat embryonic ventral midbrain explants, we showed, in agreement with the present data, that Semaphorin 3A increases the length of TH⁺ axons of E14 explants and that Semaphorin 3C attracts and increases the length of TH⁺ axons of E13 explants (Hernandez-Montiel et al.,

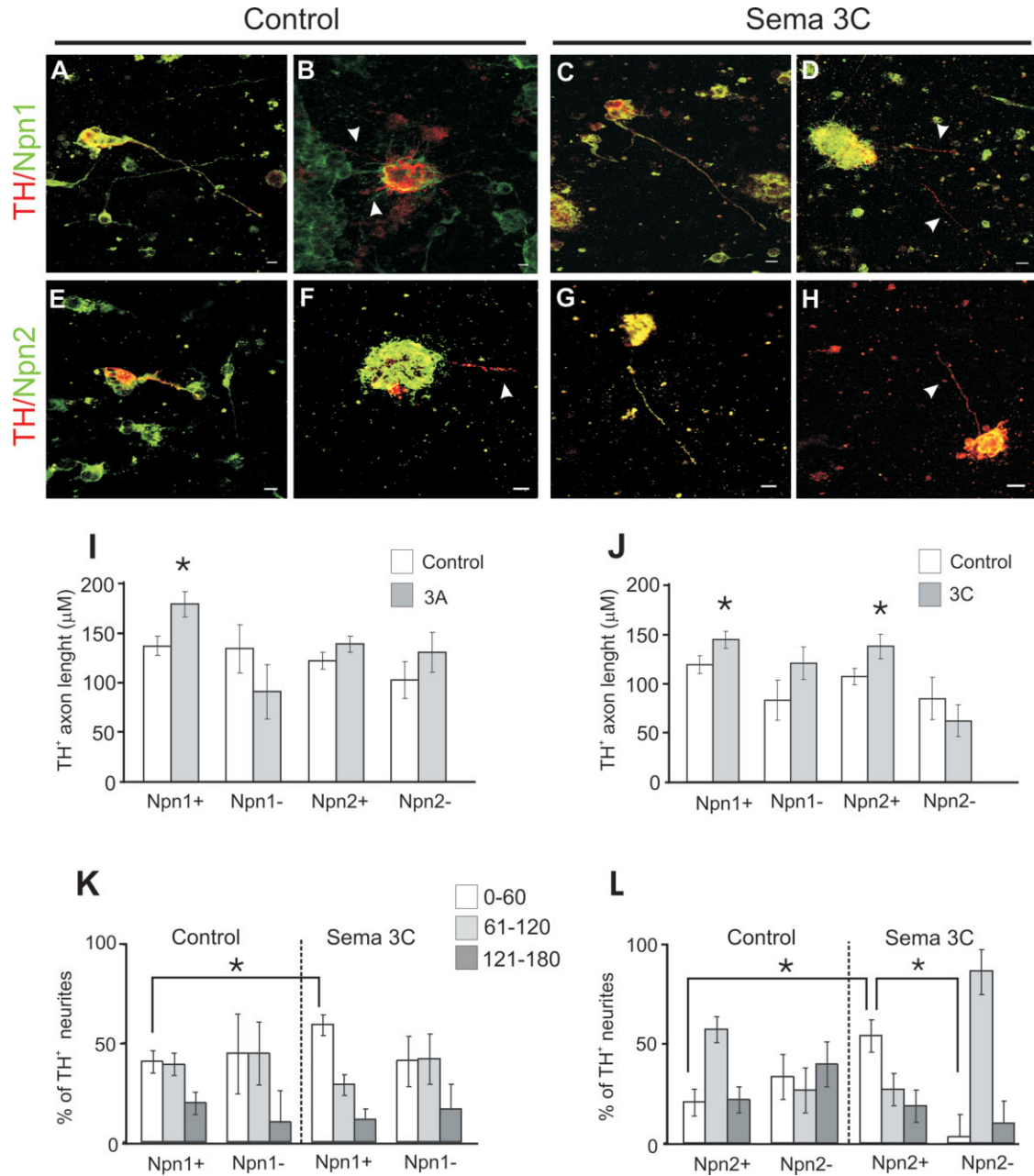


Fig. 5. TH⁺ axons expressing Npn1 and Npn2 are responsive to semaphorins 3A and 3C. Differentiated ES cells were cocultured for 48 hr with mock- or semaphorin-vector-transfected HEK293 cell aggregates and then double immunostained for TH/Npn1 or TH/Npn2. Representative images of ES-TH⁺ control cultures immunostained for Npn1 (A,B) or Npn2 (E,F) and cultures exposed to Sema3C stained for Npn1 (C,D) or Npn2 (G,H) are shown. Arrowheads in B,D,F,H indicate TH⁺/Npn-negative axons. Length of TH-expressing axons that were positive or negative for Npn1 and Npn2 was measured in confocal microscopic images. In Sema3A-treated cultures (I), an increase in

length was observed only in Npn1-expressing axons, whereas, in Sema3C-treated cells (J), Npn1- and Npn2-expressing axons showed significant increases in length compared with control cultures (**P* < 0.05). The frequency of angle of axon growth of control and Sema3C-treated cultures falling into each of the three ranges 0°–60°, 61°–120°, and 121°–180° relative to the location of the HEK293 cell clusters was determined. Npn1⁺ (K) and Npn2⁺ (L) axons showed an increase in the frequency of axons falling into the 0°–60° range (color code in K also applies to L). Brackets indicate differences between bars (**P* < 0.05). Scale bars = 20 µm.

2008). Sema3F was found to have a repulsive effect on TH⁺ axons of E13 explants, which contrasts with the lack of effect of this guidance molecule on VM-TH⁺

axons in the present study. The main difference between our previous report and the present study is that, in the former, nondissociated ventral midbrain explants were

used, and here we worked with partially dissociated cultures. A possible explanation for this differential behavior regarding *Sema3F* is that extracellular matrix components and/or other cellular elements present in the explant influence the response to these guidance cues. Upon dissociation, these elements could be affected or eliminated, thus altering the response to the guidance molecules. In dissociated cultures, a fraction of TH⁺ cells does not express Npn receptors, and there are also nondopaminergic neurons that are Npn immunoreactive. Interaction between these neuronal types might determine responses of VM-TH⁺/Npn⁻ neurons to semaphorins. Axons of dissociated VM-TH⁺ neurons, however, can respond directly to *Sema3A* and *Sema3C*, and their response is blocked by Npn-blocking antibodies.

The effect of other chemotropic molecules on TH⁺ neurons produced from ES cells has been reported recently, albeit using a different protocol to generate dopamine neurons. *Netrin1*, a chemotropic molecule that enhances and attracts TH⁺ neurite outgrowth from embryonic ventral mesencephalic explants (Lin et al., 2005), also enhances growth of ES-TH⁺ neurites, but it does not guide their growth (Lin and Isacson, 2006). *Slit1* and *Slit3*, two chemotropic proteins expressed in the VM and striatum (Marillat et al., 2002), are repellent for ventral mesencephalic dopamine neurons (Lin et al., 2005) and also impair ES-TH⁺ neurite outgrowth (Lin and Isacson, 2006). No guidance activity, however, was observed for ES-TH⁺ neurons. Overall, these results reveal similarities and differences in the responses of VM-TH⁺ and ES-TH⁺ neurons to axon guidance cues. The differences could be due to interactions between the different axon types present in explant cultures, as suggested by our results. In addition, it has been postulated that ES-TH⁺ neurons might not be developmentally equivalent to VM-TH⁺ neurons on the basis of the steps they follow to their final differentiation (Tropepe et al., 2001; Parmar and Li, 2007). The differences in the response to axon guidance molecules, therefore, could be due to the stage of development of each neuronal population. Whereas E13.5 VM-TH⁺ axons do not respond to *Sema3A*, the ES-TH⁺ neurons at the stage used in this work responded equally to *Sema3A* and *Sema3C*, thus resembling more the behavior of E14.5 VM-TH⁺ neurons. Hence, the differences in developmental stages of the embryonic and the in-vitro-differentiated TH⁺ neurons must be taken into consideration when studying these populations. Another aspect to consider is the expression of neuropilins by dopaminergic neurons: in our initial quantification (Fig. 1) made in adherent cultures, the percentage of ES-TH⁺ cells positive for Npn1 was 82%, and the proportion of Npn2⁺ dopamine neurons was 58%. Although the percentage of Npn1⁺ dopaminergic cells remained unchanged after collagen gel cocultures (82%, Table I), the Npn2⁺ population increased considerably, to reach 86% of TH⁺ neurons. This suggests that neuronal maturation or different culture conditions influence Npn2 expression, which could result in higher responsiveness

to *Sema3C*. The data presented here, however, reveal very consistent responses to semaphorins by VM-TH⁺ and ES-TH⁺ neurons.

Other studies have reported similarities between VM-TH⁺ and ES-TH⁺ neurons. ES-TH⁺ neurons generated from neural precursors using the five-stage protocol express progenitor or mature dopaminergic markers found in mesencephalic cells such as *En1*, *Lmx1a*, *Lmx1b*, *Foxa2*, *Pitx3*, *RALDH1* and *calretinin* (Rodríguez-Gomez et al., 2007; Smidt and Burbach, 2007; Diaz et al., 2009). These ES-TH⁺ neurons have the ability to restore dopaminergic function in hemiparkinsonian rats (Kim et al., 2002; Rodríguez-Gomez et al., 2007) to levels comparable to those observed after transplantation of ventral mesencephalic tissue (Dunnett et al., 1989; Yurek and Fletcher-Turner, 2004; Bartlett and Mendez, 2005). Furthermore, ES-derived dopaminergic neurons generated by a different differentiation protocol also express ventral mesencephalic dopaminergic markers (Barberi et al., 2003). These resemblances, in addition to the similar responses to guidance cues already mentioned, suggests that ES-derived TH⁺ neurons are phenotypically very close to those generated in vivo in the ventral midbrain.

The use of natural or induced pluripotent cells for restitution therapy has gained wide interest as a possible alternative treatment for neurodegenerative conditions such as PD (Wernig et al., 2008; Soldner et al., 2009). The success of such an approach will depend among other things on a solid understanding of ES differentiation, the characteristics of the dopamine neurons generated, and their behavior after transplantation into the brain of PD model animals. Our study adds evidence of the dopaminergic character of ES-derived TH⁺ neurons, namely, their expression of Npn1 and Npn2 receptors and their response to class 3 semaphorins, knowledge that could help in devising better transplantation procedures. Hence, *Sema3A* and *-3C* have the potential to serve as tools to achieve the goal of correct reinnervation of the striatum by intranigally transplanted ES-TH⁺ cells.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Ofelia Mora and Magda Giordano for help with the statistical analyses. Technical support was provided by Elsa Nydia Hernandez, Martín García-Servin, Anayansi Molina-Hernández, Adriana González, Anaïd Antaramián, Omar González, and Pilar Galarza.

REFERENCES

- Bagri A, Marin O, Plump AS, Mak J, Pleasure SJ, Rubenstein JL, Tessier-Lavigne M. 2002. Slit proteins prevent midline crossing and determine the dorsoventral position of major axonal pathways in the mammalian forebrain. *Neuron* 33:233–248.
- Barberi T, Klivenyi P, Calingasan NY, Lee H, Kawamata H, Loonam K, Perrier AL, Bruses J, Rubio ME, Topf N, Tabar V, Harrison NL, Beal MF, Moore MA, Studer L. 2003. Neural subtype specification of fertilization and nuclear transfer embryonic stem cells and application in parkinsonian mice. *Nat Biotechnol* 21:1200–1207.

- Bartlett LE, Mendez I. 2005. Dopaminergic reinnervation of the globus pallidus by fetal nigral grafts in the rodent model of Parkinson's disease. *Cell Transplant* 14:119–127.
- Chauvet S, Cohen S, Yoshida Y, Fekrane L, Livet J, Gayet O, Segu L, Buhot MC, Jessell TM, Henderson CE, Mann F. 2007. Gating of Sema3E/plexinD1 signaling by neuropilin-1 switches axonal repulsion to attraction during brain development. *Neuron* 56:807–822.
- Chen H, Chedotal A, He Z, Goodman CS, Tessier-Lavigne M. 1997. Neuropilin-2, a novel member of the neuropilin family, is a high affinity receptor for the semaphorins Sema E and Sema IV but not Sema III. *Neuron* 19:547–559.
- Diaz NF, Guerra-Araiza C, Diaz-Martinez NE, Salazar P, Molina-Hernandez A, Camacho-Arroyo I, Velasco I. 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.
- Diaz NF, Diaz-Martinez NE, Camacho-Arroyo I, 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.
- Dunnett SB, Rogers DC, Richards SJ. 1989. Nigrostriatal reconstruction after 6-OHDA lesions in rats: combination of dopamine-rich nigral grafts and nigrostriatal “bridge” grafts. *Exp Brain Res* 75:523–535.
- He Z, Tessier-Lavigne M. 1997. Neuropilin is a receptor for the axonal chemorepellent semaphorin III. *Cell* 90:739–751.
- Hernandez-Montiel HL, Tamariz E, Sandoval-Minero MT, Varela-Echavarría A. 2008. Semaphorins 3A, 3C, and 3F in mesencephalic dopaminergic axon pathfinding. *J Comp Neurol* 506:387–397.
- Isacson O, Bjorklund LM, Schumacher JM. 2003. Toward full restoration of synaptic and terminal function of the dopaminergic system in Parkinson's disease by stem cells. *Ann Neurol* 53(Suppl 3):S135–S146; discussion S146–S148.
- Kawasaki H, Mizuseki K, Nishikawa S, Kaneko S, Kuwana Y, Nakanishi S, Nishikawa SI, Sasai Y. 2000. Induction of midbrain dopaminergic neurons from ES cells by stromal cell-derived inducing activity. *Neuron* 28:31–40.
- Kim JH, Auerbach JM, Rodriguez-Gomez JA, Velasco I, Gavin D, Lumelsky N, Lee SH, Nguyen J, Sanchez-Pernaute R, Bankiewicz K, McKay R. 2002. Dopamine neurons derived from embryonic stem cells function in an animal model of Parkinson's disease. *Nature* 418:50–56.
- Kitsukawa T, Shimizu M, Sanbo M, Hirata T, Taniguchi M, Bekku Y, Yagi T, Fujisawa H. 1997. Neuropilin-semaphorin III/D-mediated chemorepulsive signals play a crucial role in peripheral nerve projection in mice. *Neuron* 19:995–1005.
- Kolodkin AL, Levengood DV, Rowe EG, Tai YT, Giger RJ, Ginty DD. 1997. Neuropilin is a semaphorin III receptor. *Cell* 90:753–762.
- Koncina E, Roth L, Gonthier B, Bagnard D. 2007. Role of semaphorins during axon growth and guidance. *Adv Exp Med Biol* 621:50–64.
- Lee SH, Lumelsky N, Studer L, Auerbach JM, McKay RD. 2000. Efficient generation of midbrain and hindbrain neurons from mouse embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 18:675–679.
- Lin L, Isacson O. 2006. Axonal growth regulation of fetal and embryonic stem cell-derived dopaminergic neurons by netrin-1 and slits. *Stem Cells* 24:2504–2513.
- Lin L, Rao Y, Isacson O. 2005. Netrin-1 and slit-2 regulate and direct neurite growth of ventral midbrain dopaminergic neurons. *Mol Cell Neurosci* 28:547–555.
- Lindvall O, Kokaia Z. 2006. Stem cells for the treatment of neurological disorders. *Nature* 441:1094–1096.
- Livesey FJ, Hunt SP. 1997. Netrin and netrin receptor expression in the embryonic mammalian nervous system suggests roles in retinal, striatal, nigral, and cerebellar development. *Mol Cell Neurosci* 8:417–429.
- Marillat V, Cases O, Nguyen-Ba-Charvet KT, Tessier-Lavigne M, Sotelo C, Chedotal A. 2002. Spatiotemporal expression patterns of slit and robo genes in the rat brain. *J Comp Neurol* 442:130–155.
- Mendez I, Sadi D, Hong M. 1996. Reconstruction of the nigrostriatal pathway by simultaneous intrastriatal and intranigral dopaminergic transplants. *J Neurosci* 16:7216–7227.
- Neufeld G, Lange T, Varshavsky A, Kessler O. 2007. Semaphorin signaling in vascular and tumor biology. *Adv Exp Med Biol* 600:118–131.
- Pamar M, Li M. 2007. Early specification of dopaminergic phenotype during ES cell differentiation. *BMC Dev Biol* 7:86.
- Pasterkamp RJ, Kolodkin AL. 2003. Semaphorin junction: making tracks toward neural connectivity. *Curr Opin Neurobiol* 13:79–89.
- Rodriguez-Gomez JA, Lu JQ, Velasco I, Rivera S, Zoghbi SS, Liow JS, Musachio JL, Chin FT, Toyama H, Seidel J, Green MV, Thanos PK, Ichise M, Pike VW, Innis RB, McKay RD. 2007. Persistent dopamine functions of neurons derived from embryonic stem cells in a rodent model of Parkinson disease. *Stem Cells* 25:918–928.
- Roy NS, Cleren C, Singh SK, Yang L, Beal MF, Goldman SA. 2006. Functional engraftment of human ES cell-derived dopaminergic neurons enriched by coculture with telomerase-immortalized midbrain astrocytes. *Nat Med* 12:1259–1268.
- Shintani A, Nakao N, Kakishita K, Itakura T. 2008. Generation of dopamine neurons from embryonic stem cells in the presence of the neuralizing activity of bone marrow stromal cells derived from adult mice. *J Neurosci Res* 86:2829–2838.
- Sieber BA, Kuzmin A, Canals JM, Danielsson A, Paratcha G, Arenas E, Alberch J, Ogren SO, Ibanez CF. 2004. Disruption of EphA/ephrin-a signaling in the nigrostriatal system reduces dopaminergic innervation and dissociates behavioral responses to amphetamine and cocaine. *Mol Cell Neurosci* 26:418–428.
- Smidt MP, Burbach JP. 2007. How to make a mesodiencephalic dopaminergic neuron. *Nat Rev Neurosci* 8:21–32.
- Soldner F, Hockemeyer D, Beard C, Gao Q, Bell GW, Cook EG, Hargus G, Blak A, Cooper O, Cooper O, Mitalipova M, Isacson O, Jaenisch R. 2009. Parkinson's disease patient-derived induced pluripotent stem cells free of viral reprogramming factors. *Cell* 136:964–977.
- Suzuki K, Kumanogoh A, Kikutani H. 2008. Semaphorins and their receptors in immune cell interactions. *Nat Immunol* 9:17–23.
- Takahashi T, Nakamura F, Jin Z, Kalb RG, Strittmatter SM. 1998. Semaphorins A and E act as antagonists of neuropilin-1 and agonists of neuropilin-2 receptors. *Nat Neurosci* 1:487–493.
- Tropepe V, Hitoshi S, Sirard C, Mak TW, Rossant J, van der Kooy D. 2001. Direct neural fate specification from embryonic stem cells: a primitive mammalian neural stem cell stage acquired through a default mechanism. *Neuron* 30:65–78.
- Wernig M, Zhao JP, Pruszak J, Hedlund E, Fu D, Soldner F, Broccoli V, Constantine-Paton M, Isacson O, Jaenisch R. 2008. Neurons derived from reprogrammed fibroblasts functionally integrate into the fetal brain and improve symptoms of rats with Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:5856–5861.
- Yamamoto N, Tamada A, Murakami F. 2002. Wiring of the brain by a range of guidance cues. *Prog Neurobiol* 68:393–407.
- Yue Y, Widmer DA, Halladay AK, Cerretti DP, Wagner GC, Dreyer JL, Zhou R. 1999. Specification of distinct dopaminergic neural pathways: roles of the Eph family receptor EphB1 and ligand ephrin-B2. *J Neurosci* 19:2090–2101.
- Yurek DM, Fletcher-Turner A. 2004. Comparison of embryonic stem cell-derived dopamine neuron grafts and fetal ventral mesencephalic tissue grafts: morphology and function. *Cell Transplant* 13:295–306.
- Zhao S, Maxwell S, Jimenez-Beristain A, Vives J, Kuehner E, Zhao J, O'Brien C, de Felipe C, Semina E, Li M. 2004. Generation of embryonic stem cells and transgenic mice expressing green fluorescence protein in midbrain dopaminergic neurons. *Eur J Neurosci* 19:1133–1140.

Recovery From Experimental Parkinsonism by Semaphorin-guided Axonal Growth of Grafted Dopamine Neurons

N Emmanuel Díaz-Martínez¹, Elisa Tamariz^{2,3}, N Fabián Díaz^{1,4}, Claudia M García-Peña², Alfredo Varela-Echavarría² and Iván Velasco¹

¹Instituto de Fisiología Celular—Neurociencias, Universidad Nacional Autónoma de México, México, México; ²Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México, Querétaro, México; Current Addresses: ³Instituto de Ciencias de la Salud, Universidad Veracruzana, Xalapa, México;

[Q1] ⁴Departamento de Biología Celular, Instituto Nacional de Perinatología, México, México

Cell therapy in animal models of Parkinson's disease (PD) is effective after intrastriatal grafting of dopamine (DA) neurons, whereas intranigral transplantation of dopaminergic cells does not cause consistent behavioral recovery. One strategy to promote axonal growth of dopaminergic neurons from the *substantia nigra* (SN) to the striatum is degradation of inhibitory components such as chondroitin sulphate proteoglycans (CSPG). An alternative is the guidance of DA axons by chemotropic agents. Semaphorins 3A and 3C enhance axonal growth of embryonic stem (ES) cell-derived dopaminergic neurons *in vitro*, while Semaphorin 3C also attracts them. We asked whether intranigral transplantation of DA neurons, combined with either degradation of CSPG or with grafts of Semaphorin 3-expressing cells, towards the striatum, is effective in establishing a new nigrostriatal dopaminergic pathway in rats with unilateral depletion of DA neurons. We found depolarization-induced DA release in dorsal striatum, DA axonal projections from SN to striatum, and concomitant behavioral improvement in Semaphorin 3-treated animals. These effects were absent in animals that received intranigral transplants combined with Chondroitinase ABC treatment, although partial degradation of CSPG was observed. These results are evidence that Semaphorin 3-directed long-distance axonal growth of dopaminergic neurons, resulting in behavioral improvement, is possible in adult diseased brains.

Received 30 August 2012; accepted 24 March 2013; advance online publication 00 Month 2013. doi:10.1038/mt.2013.78

INTRODUCTION

Parkinson's disease (PD) is produced after degeneration of *substantia nigra* (SN) dopamine (DA) neurons (A9 group) with concomitant dopaminergic denervation of the dorsal striatum. Ectopic grafts of human DA neurons isolated from developing ventral mesencephalon into the caudate-putamen (striatum) benefit patients under certain conditions.^{1,2} In animal models of PD,

intra-striatal grafting of DA neurons differentiated from wild-type and transgenic embryonic stem (ES) cells as well as inducible pluripotent stem cells, improves motor performance for extended time periods,^{3–6} restores DA release together with DA transporter binding and suppresses DA receptor super-sensitivity.⁴ Although transplanted DA neurons extend processes beyond the graft core and establish synaptic contacts with the host striatum,³ DA somata are outside the SN, thus precluding their regulation by neural circuits in the midbrain. Grafting of DA neurons in the adult SN did not improve motor alterations in parkinsonian rats because axons were unable to reach the dorsolateral striatal region.^{7–9}

The adult mammalian brain is largely inhibitory for axonal growth due to the presence of inhibitors such as chondroitin sulphate proteoglycans (CSPG) and other extracellular matrix or myelin components.¹⁰ One strategy to allow axonal extension of grafted neurons is degradation of such inhibitors; an alternative is to use chemotropic molecules that specifically attract the axons of DA neurons. During establishment of the dopaminergic nigrostriatal pathway, some class 3 Semaphorins (Sema3) are expressed in regions traversed by DA axons *en route* to reach the striatum.^{11–14}

Sema3 proteins are secreted and their actions are mediated through activation of receptors containing Neuropilins (Nrp) and plexins.^{15,16} Sema3A was initially described as a chemorepellent that also causes axonal growth cone collapse of sensory neurons.^{17,18} Knockout mice for *Sema3A* show abnormal sensory innervation and defective cerebral cortex.¹⁹ In developing cerebrocortical explants, Sema3A is repulsive for axons,^{20,21} but attractive to apical dendrites.²¹ Such opposing effects are explained by differential local signaling in dendrites²¹ and the axon.²² Sema3C is attractive for cortical axons²⁰ and has been involved in hemisphere crossing of commissural axons through the corpus callosum.²³

In midbrain explants growing in collagen gels, Sema3-transfected human embryonic kidney (HEK) 293 cells had differential effects on DA neurons: Sema3A and Sema3C induced axonal growth, whereas Sema3C attracted DA axons as well.¹¹ These responses to Sema3 are also present in axons of dissociated DA neurons isolated from developing ventral mesencephalon or differentiated *in vitro* from mouse ES cells in collagen gel assays.²⁴ Seventy-seven percent of DA neurons differentiated *in vitro* from

Correspondence: Iván Velasco, Instituto de Fisiología Celular—Neurociencias, Universidad Nacional Autónoma de México, AP 70–253, México D.F.-04510, México. E-mail: ivelasco@ifc.unam.mx or Alfredo Varela-Echavarría, Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México, Blvd. Juriquilla 3001, Querétaro, 76230, México. E-mail: avarela@unam.mx

mouse ES cells express Nrp1, whereas Nrp2 is present in 48% of TH-positive neurons; these proportions of Nrp1⁺ and Nrp2⁺ neurons are very similar to those found in dopaminergic neurons isolated from the developing midbrain.²⁴ The effects of Sema3 on DA axons in this *in vitro* system are mediated by Nrp receptors, because only Nrp⁺ axons were responsive. Furthermore, in ES cell-derived DA neurons, Sema3 effects were blocked by incubation with Nrp-neutralizing antibodies.²⁴

In this study, we report that cografting of DA neurons in the SN with Sema3C-expressing cells along a straight trajectory to the striatum produced significant behavioral recovery in rats with unilateral depletion of DA neurons, similar to DA neuron striatal grafting. The observed improvement after cografting was concomitant with striatal DA release and the establishment of new synaptic contacts between the SN and the dorsal striatum, evidenced by immunohistochemistry and retrograde labeling.

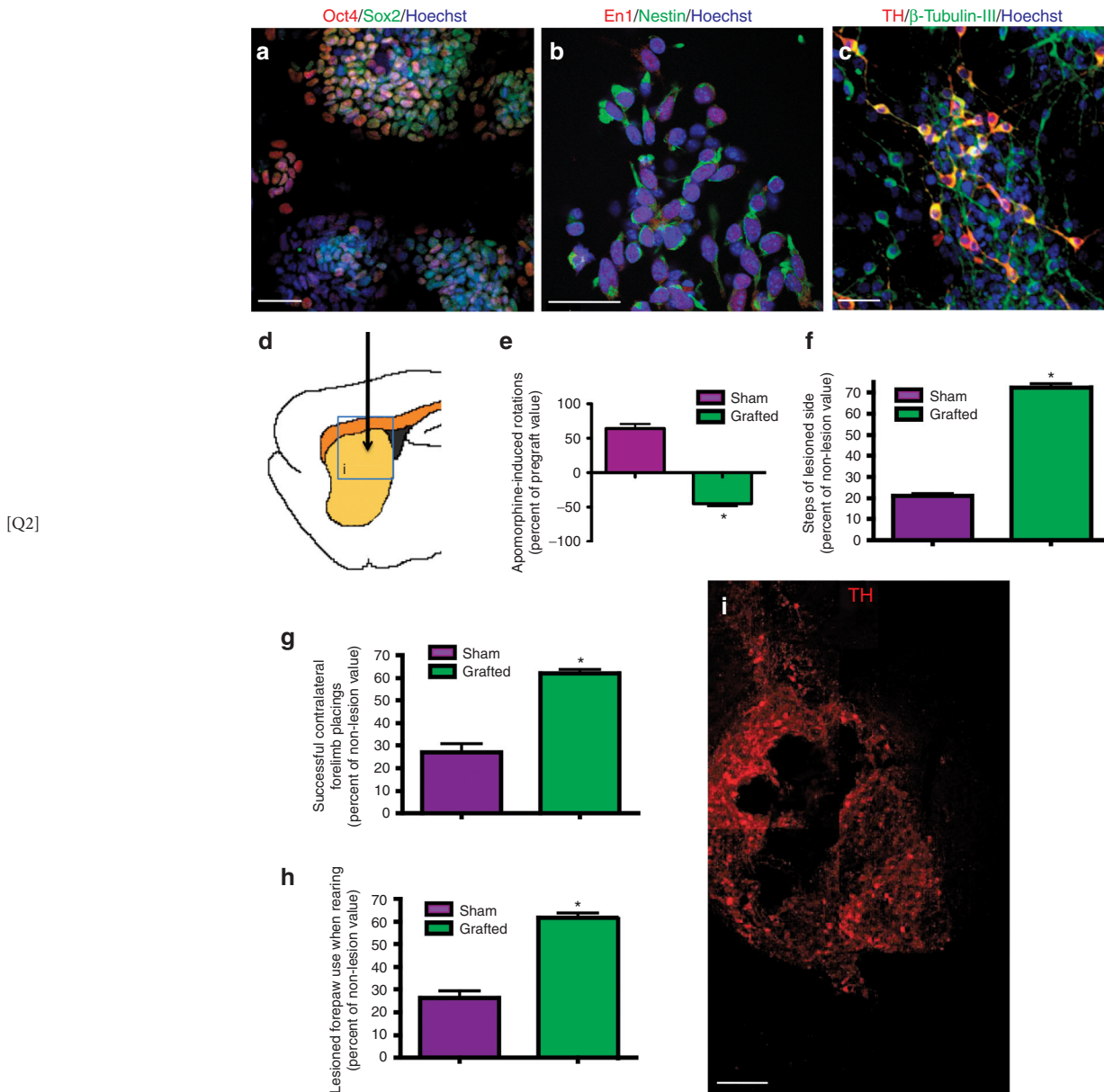


Figure 1 Intra-striatal grafting of mouse embryonic stem (ES) cells differentiated to dopamine (DA) neurons cause behavioral recovery in pharmacological and non-pharmacological test. **(a)** Undifferentiated ES cells express the pluripotency markers Oct4 and Sox2. **(b)** ES cell-derived neural precursors are positive for Nestin and Engrailed1 (En1). **(c)** During stage 5, neurons labeled with β -tubulin-III are present, and 27 \pm 3% of these are tyrosine hydroxylase (TH)-positive, indicating differentiation to DA neurons. Nuclear staining with Hoechst 33258 is shown in **a–c**. Scale bar = 30 μ m. **(d)** Half a million ES cells-differentiated *in vitro* to DA neurons were grafted in the lesioned dorsal striatum of 6-OHDA-injected hemiparkinsonian adult rats as shown in the scheme. **(e–h)** Behavioral recovery was monitored for 45 days. Pharmacological and non-pharmacological behavioral tests showed, as previously reported, that grafted animals improved significantly. **(e)** Apomorphine-induced rotations decreased in grafted animals 45 days after grafting compared with the sham group. Accordingly, **(f)** adjusting step, **(g)** forelimb placing, and **(h)** cylinder tests showed a significant recovery in the grafted group 45 days after grafting. * $P < 0.05$. **(i)** Representative composition of a graft 45 days after transplantation decorated with anti-TH antibodies in the area depicted in **a**. Scale bar = 100 μ m.

RESULTS

Transplantation of ES cell-derived DA neurons in the striatum causes behavioral recovery

We differentiated mouse wild-type ES cells to DA neurons by a protocol described previously^{3,4,25} (Figure 1a–c). The effect of grafts in behavioral recovery of parkinsonian traits was assessed in adult young rats lesioned with 6-hydroxyDA (6-OHDA) in one cerebral hemisphere (Figure 1d). Injection of 6-OHDA causes an acute depletion of striatal DA. This PD animal model has been widely used to test several strategies aimed to restore DA levels and behavioral alterations, but lacks the aging component associated to development of sporadic Parkinson in humans. As reported,^{3,4} striatal transplantation of 5×10^5 ES-derived neurons (in which close to 30% are dopaminergic) induced behavioral improvement in apomorphine-induced rotations and in non-pharmacological motor tests (Figure 1e–h; Table 1). The observed improvement in these behavioral assessments was used as reference for intranigral grafting. TH-positive neurons were present within the graft 45 days after transplantation (Figure 1i).

Partial degradation of CSPG is not sufficient to allow growth of DA axons from the SN to the striatum

We asked whether DA neuron transplantation in the SN, combined with degradation of CSPG, is sufficient to direct dopaminergic axonal growth to the striatum. Degradation of CSPG by Chondroitinase ABC (ChABC) has allowed axonal regeneration and plasticity in the spinal cord.^{26,27} To test whether degradation of CSPG permits DA axons to grow from SN to striatum, we performed transplantation of lesioned animals with 3.3×10^5 ES cell-differentiated DA neurons (to use the same cell suspension for striatal grafting, but in a smaller volume) in a 60° angle to reach the SN *pars compacta*, followed by application of ChABC along a straight line towards the striatum (encompassing cerebral cortex, striatum, internal capsule, thalamus, and zona incerta), either as a single bolus (data not shown) or in repeated injections at different days (Figure 2a,b).

On the day of surgery, ChABC was injected at 0.01 U/μl in 6 applications of 0.5 μl each, retracting the injector 0.5 mm every time. At days 3, 6, 9, 12, and 15 after grafting, six additional ChABC injections were made per session, but since the injector was 0.5 mm shorter every time, these applications started closer to the striatum. Every injection at the indicated days consisted of 3 μl of ChABC solution encompassing 2.5 mm. Behavioral evaluations were performed during 45 days. Neither axonal growth nor overt behavioral recovery was detected, although a significant difference in the stepping test was observed (Figure 2c–f; Table 1). As a control, ChABC application was made in the absence of nigral grafts (sham + ChABC). Additional controls included injections of ChABC vehicle, in the absence of enzyme or grafts, to analyze the expression of CSPG at the injection trajectory from the nigra to the striatum. One week after vehicle administration, we found that reactivity for Glial Fibrillary Acidic Protein is closely associated with the presence of full forms of CSPG detected with antibody CS-56 (data not shown). After 45 days, CS-56 immunoreactivity is still present in animals that did not receive ChABC (Figure 2g).

Table 1 Summary of behavioral evaluations of hemiparkinsonian rats, before and after grafting

	n	Number of rotations		Number of steps		Contralateral forelimb placing		Forepaw use when rearing							
		Pregraft	45 days	Pregraft	45 days	Pregraft	45 days	Pregraft	45 days						
Striatal graft															
Sham	7	573 ± 32	935 ± 47	2.4 ± 0.2	2.5 ± 0.3	12.2 ± 0.4	12.1 ± 0.7	1.9 ± 0.3	2.0 ± 0.3	7.2 ± 0.2	7.3 ± 0.2	3.8 ± 0.6	3.8 ± 0.3	14.6 ± 0.3	14.7 ± 0.3
DA neurons (DNA)	12	568 ± 19	310 ± 13*	2.2 ± 0.2	9.9 ± 0.6*	12.7 ± 0.3	13.0 ± 0.3	1.9 ± 0.2	4.4 ± 0.2*	7.2 ± 0.2	7.3 ± 0.3	3.7 ± 0.4	8.7 ± 0.4*	14.4 ± 0.3	14.5 ± 0.4
Nigral graft plus ChABC															
Sham + ChABC	7	483 ± 42	636 ± 32	2.5 ± 0.2	2.6 ± 0.3	12.1 ± 0.3	12.1 ± 0.7	2.2 ± 0.2	1.9 ± 0.3	7.2 ± 0.3	7.4 ± 0.3	3.8 ± 0.2	3.7 ± 0.3	14.1 ± 0.3	13.9 ± 0.3
DAN + ChABC	7	502 ± 19	582 ± 63	2.4 ± 0.2	4.7 ± 0.7*	12.6 ± 0.4	12.8 ± 0.5	2.1 ± 0.3	3.0 ± 0.6	7.1 ± 0.3	7.3 ± 0.4	3.4 ± 0.3	4.0 ± 0.4	14.1 ± 0.3	13.7 ± 0.4
Nigral graft plus Sema															
DAN	8	497 ± 40	733 ± 50	2.4 ± 0.4	2.2 ± 0.4	11.4 ± 0.3	13.1 ± 0.3	1.9 ± 0.4	1.6 ± 0.3	7.2 ± 0.2	7.1 ± 0.3	3.9 ± 0.7	3.3 ± 0.7	14.2 ± 0.6	13.9 ± 0.6
DAN + mock	8	460 ± 24	721 ± 22	2.4 ± 0.2	2.3 ± 0.2	10.9 ± 0.4	12.3 ± 0.2	1.7 ± 0.4	1.6 ± 0.4	7.4 ± 0.3	6.8 ± 0.3	3.4 ± 0.8	3.2 ± 0.6	14.5 ± 0.6	13.2 ± 0.6
Sema3A	4	477 ± 36	768 ± 41	2.3 ± 0.3	2.2 ± 0.4	10.7 ± 0.4	12.1 ± 0.4	1.8 ± 0.4	1.7 ± 0.4	7.1 ± 0.4	7.6 ± 0.2	3.6 ± 0.7	3.0 ± 0.8	14.2 ± 0.7	15.0 ± 0.6
Sema3C	7	498 ± 25	731 ± 18	2.4 ± 0.2	2.1 ± 0.3	11.0 ± 0.4	12.3 ± 0.2	1.7 ± 0.3	1.7 ± 0.5	7.2 ± 0.4	7.5 ± 0.4	3.4 ± 0.7	3.4 ± 0.9	14.1 ± 0.8	14.7 ± 0.6
DAN + Sema3A	5	551 ± 68	505 ± 35*	2.5 ± 0.4	4.8 ± 0.4*	11.5 ± 0.4	12.5 ± 0.4	2.7 ± 0.4	2.8 ± 0.5	7.1 ± 0.3	7.4 ± 0.4	5.0 ± 0.8	5.7 ± 1.0	14.3 ± 0.7	14.5 ± 0.7
DAN + Sema3C	15	535 ± 31	367 ± 20*	2.4 ± 0.2	6.1 ± 0.2*	11.4 ± 0.2	11.7 ± 0.2	1.9 ± 0.3	4.1 ± 0.2*	7.3 ± 0.3	7.1 ± 0.2	3.5 ± 0.5	8.0 ± 0.4*	14.5 ± 0.7	13.7 ± 0.5

The values are mean ± SEM for the number (n) of animals indicated.

DA, dopamine; DAN, DA neurons; ChABC, Chondroitinase ABC; Sema, Semaphorin; mock, mock-transfected HEK293 cells. *P < 0.05 relative to pregraft value.

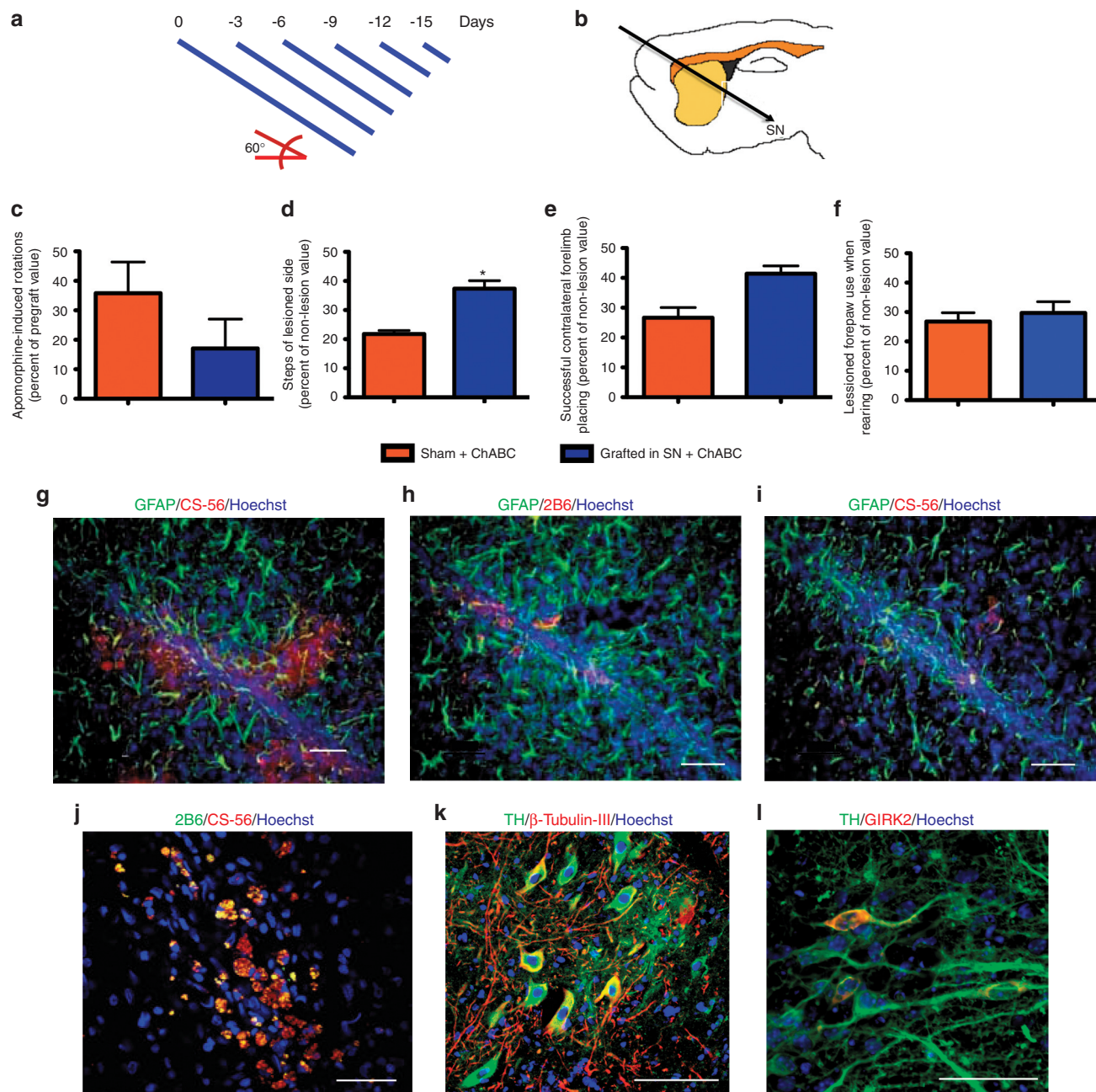


Figure 2 Partial degradation of chondroitin sulphate proteoglycans (CSPG) through a nigrostriatal trajectory does not provide functional recovery after dopamine (DA) neuron transplantation in the *substantia nigra* (SN). **(a)** Diagram of the stylets of decreasing length used for injection of Chondroitinase ABC (ChABC) at the indicated days. **(b)** Schematic representation of the trajectory for transplantation and further administration of ChABC. The head of animals was tilted 60° and grafting was performed with mouse ES cell-derived DA neurons in the SN. On days 0, 3, 6, 9, 12, and 15 after transplantation, 0.03 U of ChABC divided in six applications going towards the striatum at 0.5 mm intervals, were made. After grafting and ChABC treatment, animals did not recover when tested in the **(c)** rotational **(e)** forelimb placing, or **(f)** cylinder tests when compared with the control group. **(d)** A significant (* $P < 0.05$) recovery is observed in the adjusting step test. **(g)** As a control, injections of ChABC vehicle were made, and the brains of these animals were analyzed after 45 days. We found the presence of full forms of CSPG recognized by antibody CS-56 associated with Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP) immunoreactivity at the injection trajectory. In contrast, administration of ChABC in the described scheme caused partial digestion of CSPG, as evidenced by the appearance of labeling with the 2B6 antibody, that recognize **(h)** hydrolyzed CSPG forms, and **(i)** a parallel decrease in full-CSPG forms. Furthermore, in ChABC-treated animals, **(j)** full and partially hydrolyzed forms of CSPG are colocalized. Scale bar **(g–j)** = 50 μm . After 45 days of grafting, **(k)** tyrosine hydroxylase (TH)-positive neurons were present in the SN and **(l)** these neurons express the A9 dopaminergic marker Girk2. Nuclei were stained with Hoechst 33258. Scale bar **(k–l)** = 30 μm .

Animals that received ChABC, with or without graft, were sacrificed and their brains analyzed at 7 weeks after surgery. Administration of ChABC in the described scheme, regardless of DA neuron grafting, caused partial digestion of CSPG as evidenced

by the appearance of labeling with the 2B6 antibody that recognizes hydrolyzed CSPG forms (**Figure 2h**), and a parallel decrease in full-CSPG forms (**Figure 2i**). Furthermore, in ChABC-treated animals, full and partially hydrolyzed forms of CSPG are

colocalized, indicating that ChABC degraded CSPG, albeit not completely (**Figure 2j**). After 45 days of grafting, dopaminergic TH-positive neurons were present (**Figure 2k**) and express the specific marker for A9 DA neurons GIRK2 (**Figure 2l**). Although intranigral grafts contained DA neurons, and ChABC degraded CSPG, at least partially, no recovery was observed. We did not find any GIRK2-positive cells in the lesioned side of sham animals, ruling out a regenerative effect of ChABC on DA neurons.

Transfected HEK293 cells secrete Sema3 proteins when grafted in rat brains

A similar paradigm, but substituting ChABC treatment with grafts of HEK293 cells transfected with expression vectors for Sema3A or Sema3C,²⁴ according to National Institutes of Health guidelines for recombinant DNA, was then tested (**Figure 3a**). After intranigral grafting of DA neurons, HEK293 cells were transplanted in six deposits (7000 cells each) separated by 500 μm as shown in **Figure 3a**. To identify grafted HEK293 cells in the rodent brain, we used antihuman nuclei (HuNu) antibodies (**Figure 3b**), which also labeled cultured transfected HEK293 cells and untransfected control cells in the brain (**Supplementary Figure S1**). One week after cograftering transfected cells and DA neurons, specific immunostaining with antibodies for either Sema3A or Sema3C was apparent within HEK cells and in surrounding areas close to transfected cells (**Figure 3b–f**), whereas the brains of lesioned rats without transplantation (data not shown), or grafted with mock-transfected HEK293 cells were devoid of Sema3A and Sema3C staining (**Supplementary Figure S1**). Sema3C and Sema3A

detection with this punctate pattern is consistent with previous reports.^{28,29} Only a few transplanted dopaminergic neurons are shown in these images (**Figure 3d,f**).

Cograftering of transfected HEK cells with intranigral transplantation of DA neurons results in behavioral recovery of hemiparkinsonian rats

Behavioral and histological evaluations were performed on lesioned rats 45 days after intranigral transplantation of ES cell-derived DA neurons, either alone or in combination with Sema3- or mock-transfected HEK293 cells as shown in **Figure 3a**. DA neuron transplantation alone did not induce behavioral improvement, nor did the combination of mock-transfected HEK293 cells with DA neurons (**Figure 4a–d**; **Table 1**). In contrast, intranigral DA neuron grafting together with Sema3A, but especially with Sema3C, produced significant benefit in pharmacological and spontaneous motor tasks (**Figure 4a–d**; **Table 1**). Additional controls consisting of transplantation of HEK293 cells transfected with either Sema3A or Sema3C, in the absence of DA neurons, had no effect on the motor deficits of lesioned animals (**Supplementary Figure S2**; **Table 1**).

Cograftering of Sema3-expressing cells with intranigral DA neurons causes DA release in the dorsal striatum

Intrastriatal grafting of DA neurons into hemiparkinsonian rats causes depolarization-induced DA release in the dorsolateral striatum *in vivo*.⁴ We measured striatal extracellular DA concentrations by bilateral microdialysis in parkinsonian animals, after

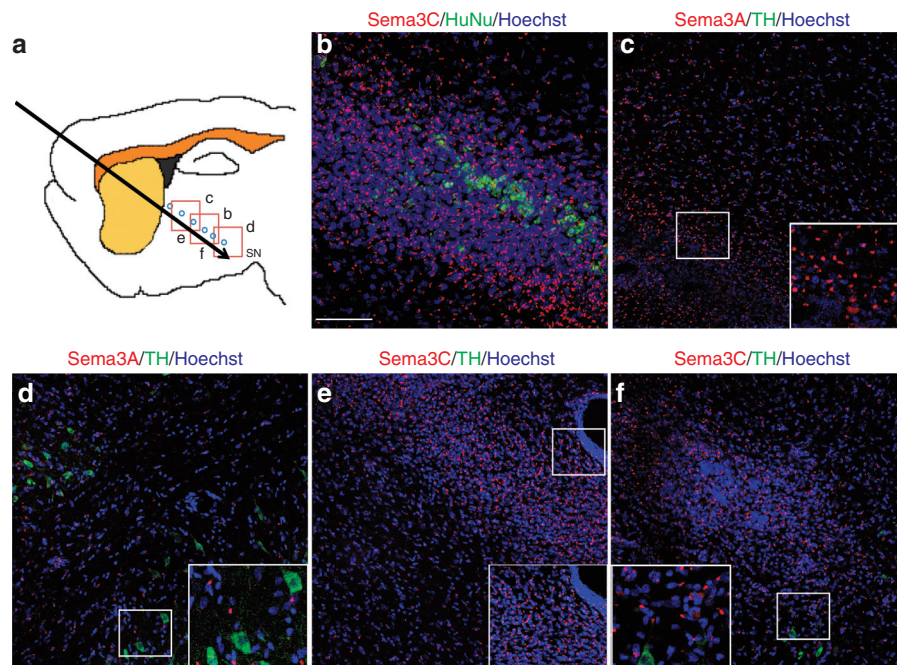


Figure 3 Transfected HEK293 cells secrete Sema3C or Sema3A *in vivo*. **(a)** Diagram showing the transplantation sites for HEK293 cells (blue circles) and the location of subsequent panels. **(b)** In animals that received Sema3C-transfected grafts, HEK293 cells were identified with the antihuman nuclei (HuNu) antibody, and Sema3C immunoreactivity was detected 1 week after grafting. **(c–f)** Detection of **(c,d)** Sema3A and **(e,f)** Sema3C in the **(c,e)** injection path, and close to the *substantia nigra* (SN), where **(d,f)** grafted TH-positive cells were present 1 week after transplantation. The non-transplanted contralateral hemispheres of these rats did not show any labeling with Sema 3A nor 3C antibodies (data not shown), and Sema3C was absent in rats grafted with mock-transfected HEK293 cells (**Supplementary Figure S1**). Nuclei were marked with Hoechst 33258. Scale bar in **b** applies to **b–f** = 50 μm .

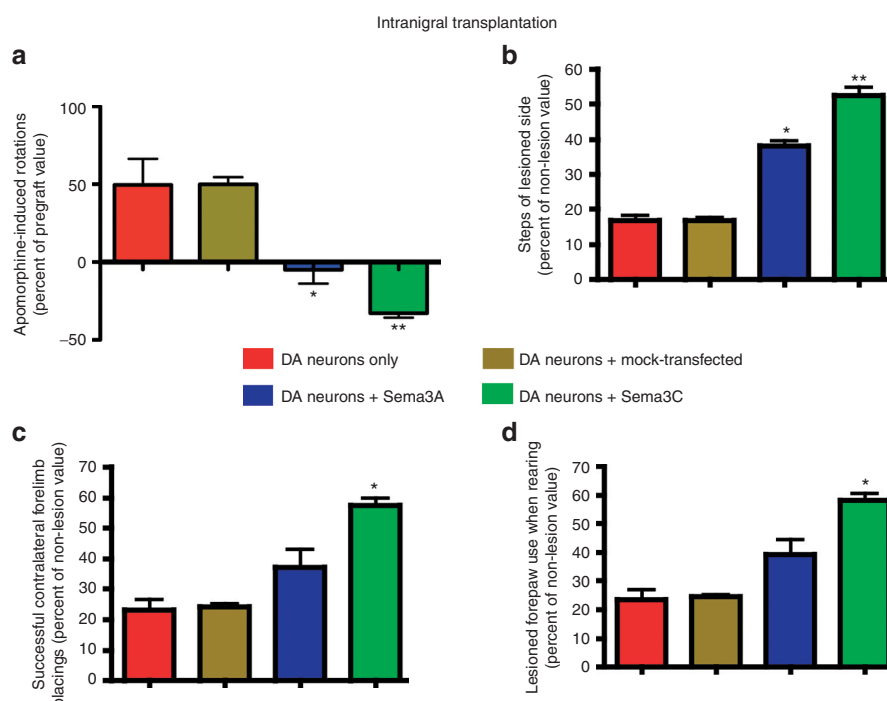


Figure 4 Cotransplantation of dopamine (DA) neurons with Semaphorin 3–expressing cells elicits functional recovery. **(a)** Cografts of DA neurons in the SN with transfected HEK293 cells caused significant behavioral recovery after apomorphine challenge. **(b)** In keeping with this, the adjusting step test showed significant improvement when either Sema3A or Sema3C were combined with intranigral DA neuron grafts. **(c)** Forelimb placing and **(d)** cylinder tests revealed that Sema3C, together with DA neurons, were effective in reverting motor deficits in hemiparkinsonian animals. * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ versus DA neurons only and also versus DA neurons plus mock-transfected HEK293 cells.

receiving striatal grafts of DA cells, or nigral cotransplants of DA neurons and HEK293 cells. The non-lesioned striatum of all animals showed a significant potassium-stimulated DA release when compared with basal levels (**Figure 5a**). Consistent with previous work,⁴ DA release was detected after striatal grafting of ES cell-derived DA neurons, albeit at significantly lower levels than those observed in non-lesioned conditions. Intranigral transplantation of DA cells together with Sema3A- or Sema3C-transfected cells resulted in DA release above basal concentrations, but below intrastriatal graft levels (**Figure 5a,b**). For the lesioned hemisphere that received intranigral DA neurons and mock-transfected HEK293 cells, depolarization-induced striatal DA release was undetectable (**Figure 5a**).

Establishment of new dopaminergic synaptic communication assessed by retrograde tracing in Sema3C-grafted animals

To observe DA processes, we performed TH staining in lesioned rats grafted intranigraly in combination with Sema3C-expressing cells, and compared them with the normal nigrostriatal pathway present in non-lesioned conditions and with control animals receiving intranigral grafts plus mock-transfected cells. In sagittal sections, the typical morphology of SN and the medial forebrain bundle was apparent (**Figure 5c**). In sharp contrast, lesioned rats that received DA neurons together with mock-transfected cells (**Figure 5d**) had some TH-positive neurons in the SN, but presented dramatic decreases of TH immunoreactivity in the striatal area, as well as in the medial forebrain bundle. After cografting of DA neurons and Sema3C-transfected cells,

we found dopaminergic somata in the SN and TH⁺ neuronal processes extending towards the striatal region (amplified in the superior inset of **Figure 5e**). The presence of TH in a straight line from the SN to the striatum in the Sema3C group strongly suggests re-innervation rather than regeneration or protection of the natural nigrostriatal pathway. This brain section is shown because re-innervation of the striatum was more evident, although at this plane of section there were fewer grafted dopaminergic somata in the SN (compare the graft region of **Figure 5e** with the density of DA neurons in **Figure 7b,c,e**). Importantly, the observed recovery after intranigral grafting with Sema3C-transfected cells was independent of the presence of dopaminergic somata in the striatum, ruling out migration of TH-positive neurons from the SN to the striatal area (**Figure 5e**). To estimate the degree of striatal re-innervation, we measured TH immunoreactivity in the groups represented by **Figure 5d,e** and related them to the non-lesioned control (**Figure 5c**), set arbitrarily as 100%. Following normalization, the intranigral graft combined with mock-transfected cells resulted in a significant decrease to $12.4 \pm 0.6\%$ of control (mean \pm SEM, $n = 3$; $P < 0.0001$). Intranigral transplantation of DA neurons and Sema3C-transfected cells resulted in a significant increase in TH reactivity in the striatum to $55.8 \pm 2.8\%$ of control (mean \pm SEM, $n = 3$; $P < 0.0001$ relative to intranigral grafting plus mock-transfected cells).

Synaptic contacts can be studied with retrograde tracers that are taken up by the axon and transported to the soma of the neuron. Fluoro-gold (FG) has been extensively used because is preserved after fixation and does not interfere with immunohistochemistry.³⁰ FG does not penetrate intact axons and has been used to detect

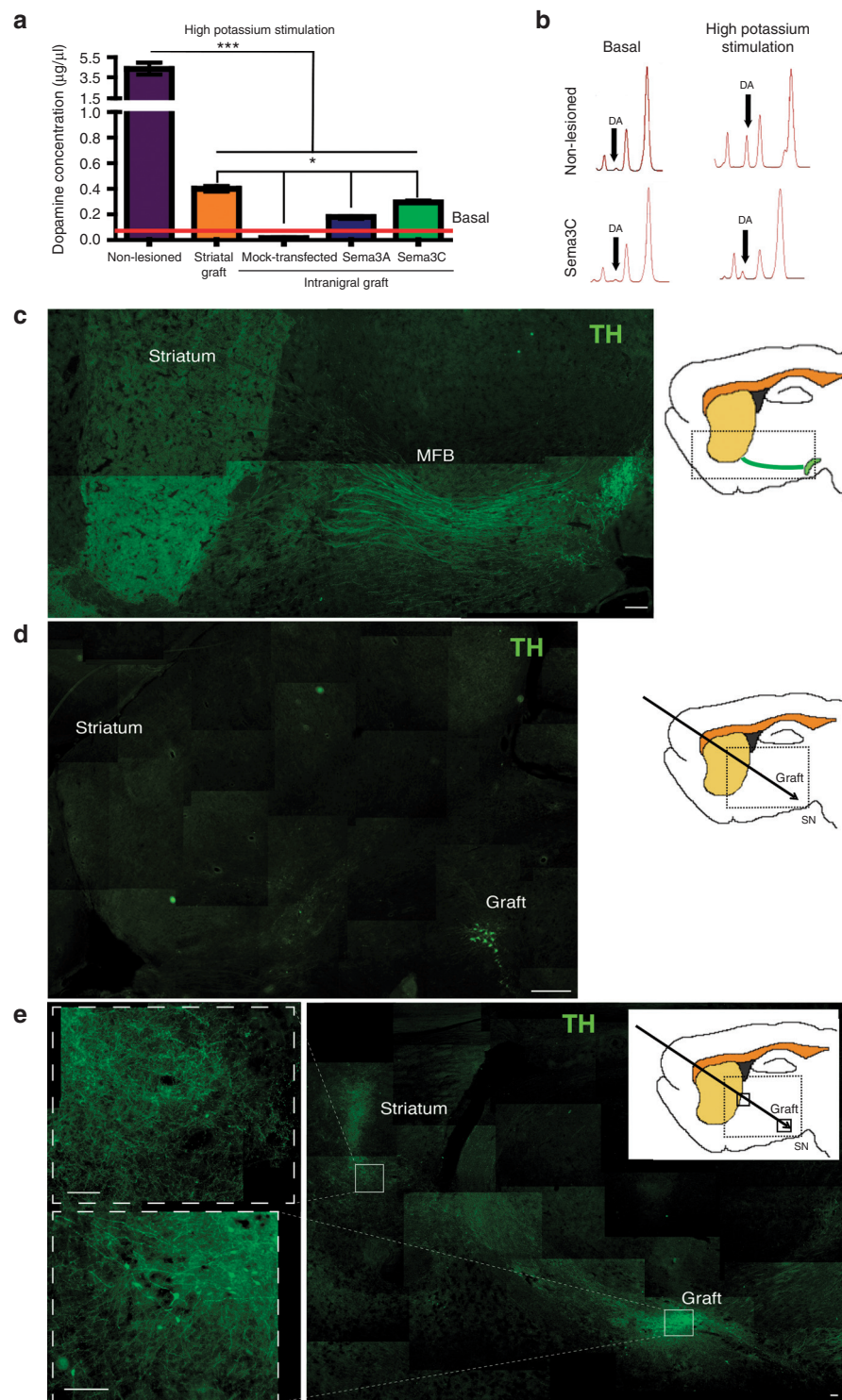


Figure 5 Striatal dopamine (DA) release and formation of a new dopaminergic pathway between the *substantia nigra* (SN) and the striatum after intranigral grafting combined with Sema3C-expressing cells. **(a)** *In vivo* DA release measured by microdialysis. Non-lesioned striatum presented DA concentrations significantly above baseline after stimulation with high potassium. Intrastratial grafts as well as intranigral DA neuron grafts combined with transfected cells (Sema3A or Sema3C) also showed DA release after depolarization. Grafts of DA neurons and DA neurons plus mock-transfected HEK293 cells did not release DA. **(b)** Representative electrofluorograms for basal and depolarization-induced levels in non-lesioned conditions, and after DA neuron + Sema3C-transfected HEK293 cografts. **(c)** Composition showing the intact nigrostriatal pathway, including the medial forebrain bundle (MFB). Scale bar = 100 µm. **(d)** Composite photograph showing a representative lesioned rat that received DA neurons in the SN and mock-transfected cells. Note the drastic decrease in tyrosine hydroxylase (TH) reactivity in the striatal area and the loss of staining in the MFB. Scale bar = 200 µm. **(e)** Low-power composition of a rat that received DA neurons and Sema3C-expressing cells, analyzed by TH staining 45 days after grafting. Dopaminergic somata are localized in the SN and absent from the striatal area. TH⁺ processes can be observed close to the striatum in the upper inset; this condition also increased striatal TH immunoreactivity. Scale bar = 50 µm. **P* < 0.05 and ****P* < 0.001.

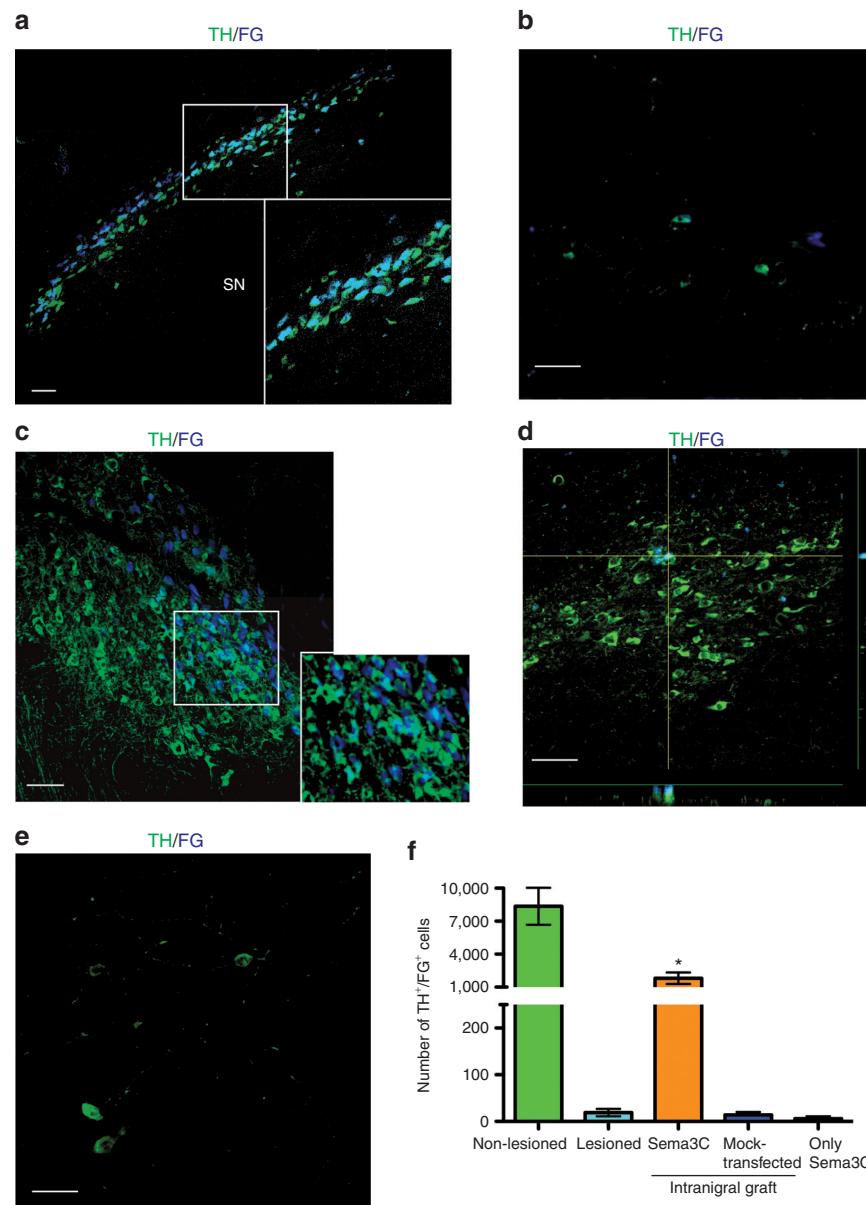


Figure 6 Establishment of synaptic contacts between the dopaminergic somata in the *substantia nigra* (SN) and the striatal region, assessed by Fluoro-gold (FG) injection in Sema3C animals. Two striatal injections were made 3 days before euthanasia, and FG/TH detection was performed. **(a)** Composition showing TH⁺ somata in SN after injection of FG in the non-lesioned striatum. The inset shows a magnification of dopaminergic cell bodies. **(b)** A lesioned non-grafted animal showed a significant decrease in numbers of TH/FG double-positive cells in the SN. **(c)** TH/FG detection 45 days after intranigral grafting combined with Sema3C-transfected cells. The inset shows a magnification of dopaminergic cell bodies positive for FG. The vast majority of FG-positive cells are also dopaminergic, although TH immunostaining marks preferentially the contours of cells. **(d)** Only a few neurons are double-positive in a rat that received intranigral transplantation + mock-transfected HEK cells. The orthogonal projections show colocalization of TH and FG. **(e)** Representative image of a rat that received Sema3C-transfected cells in the absence of dopamine (DA) neurons (only Sema3C). Note that the number of TH-positive neurons is smaller than in **c** and **d**. **(f)** Quantification of TH⁺/FG⁺ neurons in the SN of **(a)** non-lesioned, **(b)** lesioned, **(c)** intranigral graft of DA neurons + Sema3C-transfected cells, **(d)** intranigral grafting + mock-transfected, and **(e)** only Sema3C-transfected HEK groups. Scale bar **(a–e)** = 30 μ m. * P < 0.05 compared with remaining groups. TH, tyrosine hydroxylase.

monosynaptic contacts between the SN and striatum after DA neuron grafting.³¹ To establish whether intranigraly transplanted DA neurons extended axons to reach the dorsal striatum, we performed injections of FG in two striatal sites. In non-lesioned hemispheres of hemiparkinsonian rats, TH⁺ somata in the SN labeled with this retrograde marker were detected 3 days after injection (**Figure 6a**). In lesioned animals without grafted DA neurons, the number of TH⁺ cells that were also FG⁺ decreased notably (**Figure 6b**). In

animals with nigral grafts of DA neurons combined with Sema3C-transfected cells, we found a considerable number of TH⁺/FG⁺ neurons in the SN (**Figure 6c**), indicating that axons of transplanted DA neurons had projected to the dorsal striatum. The distribution of TH immunoreactivity in the neuronal soma is not homogeneous and stains preferentially the contours of the cells, but the vast majority of FG⁺ cells are dopaminergic, as shown in the inset of **Figure 6c**. In sharp contrast, animals that received DA neurons

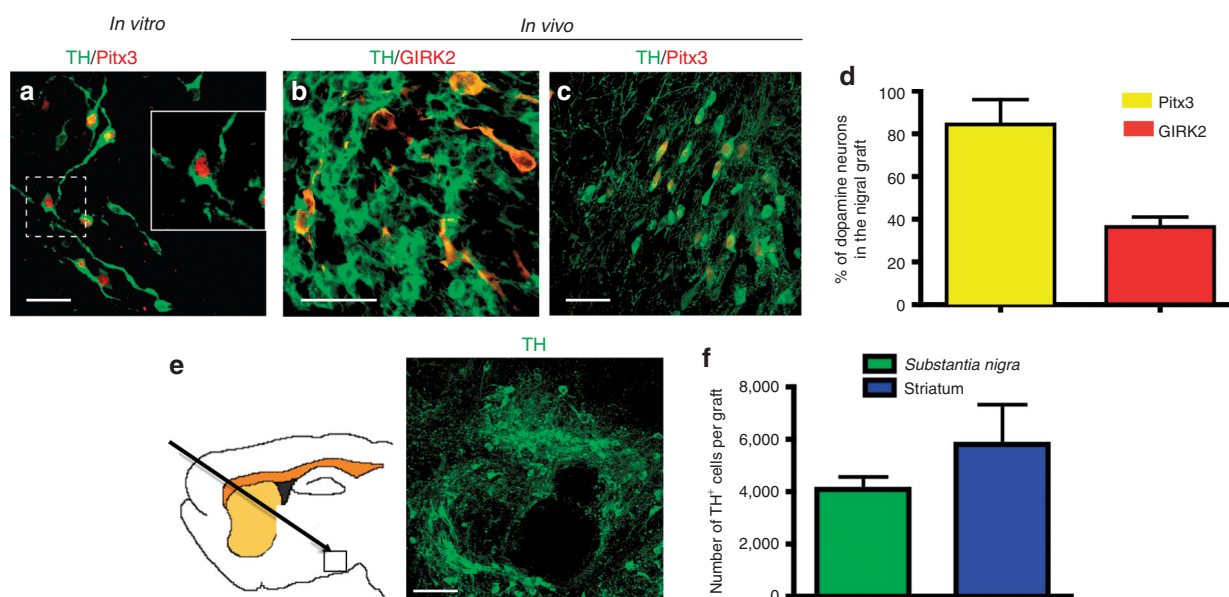


Figure 7 Expression of dopaminergic markers before and after intranigral transplantation, and quantification of surviving dopamine (DA) neurons in nigral and striatal grafts after 45 days. **(a)** DA neurons at day 6 of stage 5 express tyrosine hydroxylase (TH) and Pitx3. **(b)** Coexpression of TH and GIRK2 in DA neurons in the *substantia nigra* (SN) of a rat that received cografts of ES cell-derived neurons and Sema3C-transfected cells. **(c)** Intranigraly grafted TH-positive neurons also express Pitx3. Scale bar **(a–c)** = 30 μ m. **(d)** Quantification of the proportion of TH⁺ neurons that express Pitx3 or GIRK2 in the SN, 45 days after transplantation. **(e)** Localization and representative image of nigral grafts stained with TH. Scale bar = 50 μ m. **(f)** The number of surviving DA neurons after 45 days was quantified by stereological counting in the SN after intranigral grafts, or in the striatum after intrastriatal transplantation (see **Figure 1i**). No significant differences were found in intranigral dopaminergic transplantation combined with either Sema3A or Sema3C, and therefore these groups were pooled. Note that striatal grafts received 5×10^5 cells, whereas nigral grafts consisted of 3.3×10^5 cells, and therefore similar survival rates of DA neurons were found in both regions.

+ mock-transfected HEK cells (**Figure 6d**) or Sema3C-transfected HEK cells in the absence of DA neurons (**Figure 6e**) have very few TH⁺/FG⁺ neurons. Stereological quantification of TH⁺/FG⁺ cells in the SN revealed significant differences between the DA neuron + Sema3C condition, in comparison with the remaining experimental groups (**Figure 6f**). The number of FG⁺ DA neurons in the non-lesioned condition is in agreement with previous studies.³²

Intranigral grafts contain midbrain DA neurons and its survival rate is similar to that found in striatal grafts

To confirm the identity of DA neurons grafted in the SN, we detected the expression of mesencephalic (Pitx3) and A9 (GIRK2) DA neuron markers among the surviving TH⁺ cells in the SN. Differentiated DA neurons express Pitx3 *in vitro* (**Figure 7a**) and are positive for both Pitx3 and the potassium channel GIRK2 after intranigral grafting (**Figure 7b–d**). An example of surviving grafted dopaminergic neurons in the SN is shown in **Figure 7e**. Stereological counting of intranigraly or intrastrially grafted dopaminergic neurons was performed. The number of surviving TH⁺ neurons in the striatum (see **Figure 1i**) was 43% higher than that found in intranigral grafts (**Figure 7f**), consistent with the 51% higher number of implanted DA neurons in the former type of graft, showing similar survival rates in both regions. We did not find uncontrolled growth of HEK293 cells in agreement with previous work.³³ No teratomas were present in striatal or nigral DA neuron grafts, in line with previous studies, where animals that received ES cell-derived DA cells in the striatum were free of teratomas 32 weeks after grafting.⁴

DISCUSSION

Our results show that DA axon guidance can be achieved using class 3 Semaphorins in the lesioned adult mammalian brain, with behavioral improvement comparable with that of the current gold-standard, intrastriatal transplantation of DA cells. Intranigral transplantation of DA neurons combined with secreted Sema3 proteins caused significant recovery in pharmacological and spontaneous motor tests, a finding that correlated with DA release in the dorsal striatum and with anatomical connections of TH⁺ axons from the SN to the striatum in hemiparkinsonian rats. Recovery was observed only when DA neurons were cograftered with Sema3-expressing cells was made, as neither type of graft by itself was effective; DA neurons cograftered with mock-transfected cells did not elicit behavioral recovery, thus ruling out non-specific effects by HEK cells.

Our first approximation was to degrade CSPG by ChABC administration after nigral transplantation. Application of ChABC has been shown to promote plasticity and regeneration of axons²⁷ and functional restoration of respiration, when combined with a peripheral nerve auto graft, in the damaged spinal cord.²⁶ Unfortunately, axons of grafted DA neurons did not follow the path of hydrolyzed CSPG in hemiparkinsonian rats, although only partial degradation of CSPG was detected along the needle tract 45 days after grafting. No overt behavioral recovery was achieved by this combinatorial strategy but we found a significant recovery in the number of steps of the lesioned forelimb. It is noteworthy that systemic apomorphine by itself has been reported to improve the stepping test in lesioned rats.⁹ Although we do not know the reason for the aforementioned recovery, we speculate that repeated testing of apomorphine-induced

rotational behavior might be causing some benefit, but only when combining intranigral grafting with ChABC, because intranigral neurons alone did not improve the stepping test (**Figure 4b**).

Interestingly, interactions of Semaphorins with different components of extracellular matrix can have opposing effects: membrane-anchored Sema5A is attractive when interacting with heparan sulphate proteoglycans to guide diencephalic axons; in contrast, when Sema5A interacts with CSPG, a repulsive effect is observed. Repulsion of such axons by Sema3F is unaffected after Heparinase treatment, suggesting that interaction of soluble class 3 Sema with heparan sulphate is not required for repulsion.³⁴

In the combinatorial strategy described here, we did not find TH-positive somata in the striatum, and therefore the recovery cannot be ascribed to DA neuron migration from the SN. In agreement, DA neurons exposed to Sema3-transfected HEK293 aggregates *in vitro* did not migrate, and only showed axonal responses.²⁴ Sema3 proteins have been shown to influence migration of adult oligodendrocyte precursor cells: Sema3F attracted these cells *in vitro* and caused mobilization of precursors to the demyelinating areas caused by lysophosphatidylcholine administration in the spinal cord *in vivo*. Sema3A, on the other hand, was shown to be repulsive for pre-oligodendrocytes *in vivo* and Nrp1^{Sema} mice, which possess a modified Nrp1 receptor that cannot be activated by Sema3A, showed increased levels of precursors after demyelination, suggesting a negative role of Sema3A upon oligodendrocyte precursors recruitment. These effects were independent of cell proliferation and apoptotic cell death.³⁵ Regarding the effects of Sema3A on neuronal populations different from mesencephalic DA neurons, it has been reported that is repellent to several types of developing motor axons,³⁶ and interferes with regeneration of axons after adult spinal cord transection.³⁷

Recently, several groups described the regeneration of the nigrostriatal pathway in hemiparkinsonian rodents. Rats partially lesioned and treated with a D₃ DA receptor agonist had increased numbers of newborn TH⁺ neurons in the SN. Behavioral recovery in rotational and paw reaching tests were reported; although this treatment increased retrograde labeling from striatum to SN, no evidence of newborn TH⁺ neurons labeled with FG in the SN was provided.³⁸ In two similar articles, mice were injected unilaterally with 6-OHDA in the SN, and grafted in the same region with fetal mesencephalic tissue. These animals showed anatomical reconstitution of dopaminergic meso-striatal pathway, and recovery in drug-induced rotational tests,^{39,40} which are not as stringent as non-pharmacological evaluations. In one case, DA lesions were partial and the innervation was observed mostly in ventral striatum; furthermore, expression of GDNF enhanced TH⁺ outgrowth to the thalamus and sprouting to the globus pallidus, and it was only under such conditions that behavior was significantly improved.³⁸ The main differences between these studies and our results are that we used ES cells-derived DA neurons, evaluated both pharmacological and spontaneous motor test to monitor recovery, detected DA release in a large area of the striatum through microdialysis, and found synaptic connections by FG labeling. The evidence from all these tests reveals DA innervation of the striatum from the SN.

There are two major subgroups of midbrain dopaminergic neurons: A9 neurons in the SN *pars compacta* and A10 neurons

in the ventral tegmental area. In addition to their different anatomical localization, their axons project to distinct targets: A9 neurons innervate the dorsolateral striatum and A10 cells contact the ventral striatum, nucleus accumbens and cortical areas. *Pitx3* knockout mice lack A9 (*i.e.*, GIRK2⁺) DA neurons in the mesencephalon⁴¹ and suspensions of differentiated ES cells enriched in *Pitx3*-expressing neurons induce recovery of parkinsonian rats after intrastriatal grafting.⁴² Recent experiments show that A9 DA neurons are required to elicit behavioral improvement and efficient re-innervation of the dorsolateral striatum with TH⁺ fibers in hemiparkinsonian rats.⁴³ Interestingly, in animals that recovered after ectopic striatal transplantation, GIRK2⁺ neurons were found predominantly in the periphery of the grafts,⁴⁴ suggesting a higher ability of these DA neurons to establish synaptic contacts with the host tissue. Our results show the presence of DA neurons with mesencephalic (*Pitx3*-positive) and a lower proportion of A9 (GIRK2⁺) dopaminergic cells in the SN after transplantation; these DA neurons re-innervate the dorsolateral region of the lesioned striatum, the region normally innervated by endogenous DA neurons.

The use of mesencephalic fetal donor tissue has a fundamental limitation for the clinical use of DA neuron grafts in PD due to the scarcity of DA neurons from donors and to the inability of neural precursors from this brain area to preserve dopaminergic potential after expansion.⁴⁵ ES cells are regarded as promising in regenerative medicine as they overcome the limitations of cell number and stable DA differentiation potential. In addition, these cells have the important advantage of being more amenable to genetic manipulation. The clinical use of human ES cell-derived neurons, however, will require not only the optimization of DA neuron enrichment protocols and the complete elimination of teratoma-forming cells prior to grafting, but also the development of efficient strategies to guide axons of intranigraly grafted neurons to the striatum. Our study constitutes an important step in that direction although preferable protocols are expected to use cell-free systems to deliver the guidance cues to the grafted brain. Moreover, further studies involving different approaches to those used here, are required in this line of research to assess the effective integration of grafted DA neurons into functional circuits to ensure that they are also innervated correctly in the midbrain and are thus capable of physiologically regulated DA release.

In conclusion, we describe conditions to promote DA axonal growth after intranigral grafting that allowed the establishment of new terminals in the host striatum, resulting in behavioral recovery of adult hemiparkinsonian rats. Taken together, our results constitute proof-of-principle that directed long-distance axonal growth of grafted DA neurons, combined with neurotropic molecules is possible. These findings reinforce the idea that stem cell-based strategies can be effective to restore input to striatal neurons, normalizing information flow through a damaged motor circuit.

MATERIALS AND METHODS

In vitro differentiation of ES cells to DA neurons. We used R1 mouse ES cells, which have been proved to produce DA neurons.^{3,4,25} The differentiation procedure was performed as reported.⁴⁶ Briefly, undifferentiated ES cells expressing the pluripotent markers Oct4 and Sox2 (stage 1; **Figure 1a**) were cultured on gelatin-coated tissue culture plates in the presence of

[Q3] 1000 U/ml of leukemia inhibitory factor (Merck Millipore, Billerica, MA) in Knockout DMEM medium (Gibco) supplemented with 15% ES cell-tested fetal bovine serum (Wisent, Quebec, Canada). To induce formation of floating embryoid bodies (EB's, stage 2), cells were dissociated with Trypsin solution (Gibco) and plated onto bacterial dishes in the presence of leukemia inhibitory factor. EB's were cultured for 4 days and then seeded onto adherent tissue culture plates. Enrichment of Nestin-positive cells (stage 3) was initiated in serum-free Insulin-Transferrin-Selenite medium (Gibco) supplemented with 5 µg/ml Fibronectin (Invitrogen, Carlsbad, CA). After 9–11 days of culture, cells were dissociated with Trypsin and seeded on dishes or glass coverslips precoated with 15 µg/ml poly-L-ornithine (Sigma) and 1 µg/ml Fibronectin in N2 medium (Gibco) containing 10 ng/ml fibroblast growth factor 2, 100 ng/ml fibroblast growth factor 8 and 100 ng/ml of human Sonic Hedgehog (growth factors from R&D Systems, Minneapolis, MN) during 4 days to form DA precursors (stage 4). At this stage, a high proportion of cells (>93%) express the neural stem cell marker Nestin (Figure 1b). Differentiation (stage 5) was induced by growth factor withdrawal and feeding with N2 medium with 200 µmol/l ascorbic acid for 3 days for grafting or for 6–8 days for terminal differentiation analysis. The yield of DA neurons with this procedure was $27 \pm 3\%$, in agreement with previous work.^{25,46}

[Q4] **Immunocytochemistry and immunohistochemistry.** Standard immunocytochemical procedures were carried out using described protocols.²⁵ The procedure, antibody distributors, and used dilutions are listed in **Supplementary Materials and Methods**.

[Q5] **6-OHDA lesion, apomorphine-induced rotational test and striatal transplantation.** Lesion, striatal transplantation, and behavioral evaluations were made as described.^{3,4} Surgical procedures were approved by the local Animal Care and Use Committee and complied local (NOM-062-ZOO-1999) and international guidelines (Animal Welfare Assurance A5281-01). Adult female Wistar rats that were at least 2 months old (230–250 g) were housed with a 12-hour light–dark cycle and room temperature at $22 \pm 2^\circ\text{C}$ with free access to water and food. Briefly, rats were placed in an airtight anesthesia chamber supplied with 3% sevoflurane (Abbot Laboratories, Abbott Park, IL) in 95% O₂–5% CO₂ gas mixture. To minimize stress, rats were minimally handled and maintained with inhaled anesthetic (0.5–1.5% sevoflurane). Rats were injected with 8 µg of 6-hydroxyDA (6-OHDA; Sigma) in the left medial forebrain bundle with the following stereotactic coordinates relative to bregma: antero-posterior (AP), –1.0 mm; lateral (L), 1.5 mm; ventral (V), –7.5 mm. Fifteen days after injection, apomorphine (1 mg/kg, s.c.)-induced rotations were quantified over 60 minutes, and animals were classified as lesioned when they had more than seven contralateral turns per minutes. Lesioned animals that received sham surgery showed an increase in apomorphine-induced rotations after 45 days, in agreement with previous work.⁴⁷ Hemiparkinsonian rats were grafted in the dorsal striatum with mouse ES cells–derived TH-positive neurons differentiated as described above. At day 3 of stage 5, cells were trypsinized and resuspended at a density of 167,000 viable cells per µl. Three microliter of cell suspension containing 0.5×10^6 viable cells were grafted into the lesioned dorsolateral striatum with the following coordinates: AP, 0.0 mm; L, 3.0 mm; V, –5.5 mm. Cell suspension was injected in three deposits separated by 0.5 mm ($n = 12$). In sham animals ($n = 7$), 3 µl of N2 medium was injected with the same coordinates. All animals were immunosuppressed daily with cyclosporine A (10 mg/kg; Neoral, France) starting 24 hours before grafting. An experimenter blind to the treatment of each animal evaluated apomorphine-induced rotations every 2 weeks, although only results 45 days after grafting are shown. Results are represented as percentage of pregraft values in all rotational graphs. The mean values \pm SEM for the rotational test before normalization, are presented in **Table 1**.

[Q6] **Non-pharmacological behavioral tests.** To assess more natural behavior, we conducted the following tests; all these evaluations were made blinded to the experimental treatment of animals.

Adjusting step test: This evaluation was performed as described.¹⁰ The rat is held with one hand, holding and lifting the hindlimbs, and then moved laterally (0.9 m in 5 seconds) close to the surface of a table. Each forelimb was independently evaluated by counting the number of adjusting steps on the table surface. The value of the lesioned forelimb was normalized with the number of steps registered for the non-lesioned paw in these trials, and represented in the graphs as percent of non-lesion value for each group. **Table 1** includes the average number of steps for each forelimb before percentage calculation, before and after grafting.

Forelimb placing test: The rat was held in the air over a table, leaving the forelimbs free. The animal was then lowered allowing the tactile whiskers of each side independently to touch gently the table edge. The number of contacts of each upper limb with the table after the sensory stimulation was quantified in 10 trials, and these were considered successful responses. The percentage of successful contralateral (lesioned) use is represented relative to non-lesion side, which served as the baseline activity.⁴⁸ Pre- and postgraft mean values for both forelimbs are listed in **Table 1**.

Cylinder test: The exploratory activity was analyzed by filming each animal in a transparent acrylic cylinder (35 cm diameter by 40 cm high) for 7–10 minutes, depending on the frequency of vertical movements. Contacts of each forelimb with cylinder walls when rearing were recorded, and the percentage of lesioned side use, relative to the non-lesioned limb was calculated.³ The mean (\pm SEM) number of contacts for both forelimbs before and after grafting is summarized in **Table 1**.

Chondroitinase ABC administration in the trajectory from SN to the striatum. A strategy to avoid axonal growth inhibition was tested trying to promote DA axon extension from the SN to the striatum by transplanting DA neurons in the *nigra* and implanting a cannula in the skull of lesioned rats to sequentially perform injections of Chondroitinase ABC (ChABC) solution to degrade CSPG, with stylets of decreasing length (each one being smaller 0.5 mm from the previous) at days 0, 3, 6, 9, 12, and 15 after grafting. With this scheme, ChABC was applied closer to the striatum in the last injection. The heads of hemiparkinsonian rats were tilted 60° to graft 2 µl containing 0.33×10^6 differentiated ES cells per animal in the SN of the lesioned side, as represented in **Figure 2a**, using the following stereotactic coordinates relative to bregma: AP, 3.5 mm; L, 2.4 mm; V, –13 mm. These coordinates reached the SN *pars compacta*. In the same surgery, a stent was implanted in the skull to allow injections of ChABC on the following days. Seven control (Sham + ChABC) and 7 experimental (intranigral grafting + ChABC) rats were studied.

[Q7] **Cografting of DA neurons with cells expressing Sema3A or Sema3C.** To express Sema3A or Sema3C, HEK293 cells were transfected with FuGene reagent (Roche) with 1 µg/µl of expression vectors containing the mouse coding sequence of these Semaphorins; cells were then cultured for 24 hours, detached from the culture plate with Trypsin, counted and grafted alone or together with differentiated ES cells. DA neurons were dissociated at days 2–3 of stage 5 and resuspended at 1.67×10^5 cells/µl. HEK293 cells were loaded in the injection needle and then DA neurons were taken up separated from HEK cells by a small air bubble. A single deposit (2 µl) of 3.3×10^5 ES cell–derived DA neurons was made in the SN of the lesioned hemisphere of parkinsonian animals; DA cells were allowed to settle for 5 minutes and then six deposits of 7×10^3 HEK293 cells (0.5 µl each) were made, starting at –12.5 mm ventral, and retracting the needle 0.5 mm every time, covering 2.5 mm in direction to the striatum, as depicted by the blue circles in **Figure 3a**. We decided to use this number of HEK293 cells because we previously observed that such amount has optimal effects on DA axon outgrowth *in vitro*.²⁵ Consistent with previous work, grafts of up to 1×10^5 HEK cells in the brain did not produce adverse effects.³³ Functionality of these grafts was monitored by pharmacological and non-pharmacological tests. DA neurons alone in the SN, DA neurons plus mock-transfected HEK cells, or Sema-transfected HEK cells in the absence of ES cell–derived

neurons did not cause recovery (see **Figure 4** and **Supplementary Figure S2**). As shown in **Table 1**, pregraft values of lesioned animals did not differ between all analyzed groups. We analyzed the following number of animals: intranigral grafting without HEK293 cells ($n = 8$), DA neurons plus mock-transfected HEK cells ($n = 8$), Sema3A-transfected HEK cells without DA neurons ($n = 4$), Sema3C-transfected HEK without DA neurons ($n = 7$), DA neurons plus Sema3A-transfected cells ($n = 5$), and DA neurons plus Sema3C-transfected cells ($n = 15$).

Microdialysis and DA quantification. Microdialysis experiments were performed at 7 weeks after transplantation to measure DA release in the dorsal striatal region⁴ of animals grafted in the striatum or cografted with DA neurons in the SN and Sema-transfected cells. The sample was analyzed to calculate the concentration of DA, according to a standard of known concentration as described.⁴⁹ After 1 hour of probe stabilization with Hanks solution, three basal samples were collected and DA release was stimulated with isosmotic Hanks balanced salt solution containing 56 mmol/l KCl (high potassium) through a 4-mm microdialysis membrane. DA quantification was made using a capillary electrophoresis system (Beckman Coulter, P/ACE MDQ with laser-induced fluorescence; argon lamp of 488 nm and interference filters for 590 and 520 nm). The fluorogenic derivatization reagent, 3-(2-furoyl)quinoline-2-carboxaldehyde (FQ) was from Molecular probes (Eugene, OR). For storage, FQ (10 mmol/l) was dissolved in methanol, aliquots were dispensed, and solvent was then removed under vacuum for 1 hour at room temperature. The dried FQ was stored at -20°C and was directly used in the derivatization reaction without further treatment. This derivatized sample (5 μl) was injected and the resulting electropherogram was analyzed to calculate the concentration of DA. Basal levels in the groups did not differ and therefore, all of them were pooled to represent the baseline shown in **Figure 4a**.

Analysis of striatal TH expression. The intensity of TH immunoreactivity in the striatal area was quantified using Image J 1.40 software (Research Services Branch, National Institute of Mental Health, Bethesda, MD). The striata of 3 non-lesioned animals were used to establish the control value. Three rats that received intranigral dopaminergic neurons and mock-transfected cells were assessed and the results are expressed as percentage of control. A group of three animals that received intranigral grafts combined with Sema3C-transfected cells was also measured.

Stereological counting. Animals were perfused with 0.9% saline and then with 4% paraformaldehyde in phosphate-buffered saline. Brains were recovered and cryo-protected with 30% sucrose. Slices of 40 μm were obtained in a cryostat and immunostained with anti-TH antibodies for DA neuron counting. Every 5th section was quantified, and the total number of DA neurons was calculated by multiplying the number of TH⁺ neurons per slice by the number of slices that contained grafted cells.^{3,4,50}

Retrograde tracing. Animals received bilateral intrastriatal injections of the retrograde fluorescent tracer FG (Fluorochrome, Denver, CO) into two sites in the dorsolateral striatum (2% solution in 0.9% saline; 0.1 μl /site) at a rate of 0.1 μl /minute, with the aid of a quintessential stereotaxic injector (Stoelting, Wood Dale, IL). The coordinates were AP, 1.3 mm; L, 2.5 mm; V, -5.5 mm for site 1, and AP, -0.9 mm; L, 3.5 mm; V, -5.5 for the second injection spot. Three days later, the rats were euthanized and their brains recovered for TH immunohistochemistry and FG detection.

Statistical analysis. Results are expressed as mean \pm SEM. Statistical analysis was made by ANOVA followed by Fisher's test. GB-STAT Version 7.0 program (Dynamic Microsystems) was used for calculation of probability values.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Figure S1. HEK293 cells can be identified by expression of human nuclei (HuNu) antigen both *in vitro* and *in vivo*.

Figure S2. Transplantation of Sema3-transfected cells in the absence of DA neurons had no effect on behavioral recovery.

Materials and Methods.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the National Institutes of Health (NINDS/FIC, NS 057850 to I.V.), CONACYT-México (14285, 50715, and 131281 to I.V.; 101433 to A.V.-E.), and IMPULSA 02-Universidad Nacional Autónoma de México (Stem cell group to A.V.-E.). N.E.D.-M. and C.M.G.-P. received graduate fellowships from CONACYT. N.F.D. was supported by a postdoctoral fellowship from NIH. This study was performed in partial fulfillment of the requirements for the Ph.D. degree in Biomedical Sciences of N.E.D.-M. at Universidad Nacional Autónoma de México. We acknowledge technical support from Kioko Guzmán-Ramos, Federico Bermúdez-Rattoni, Anayansi Molina-Hernández, Teresa Neri, and personnel from the microscopy unit and animal housing at Instituto de Fisiología Celular. The anti-Pitx3 antibody was a kind donation from Marten Smidt. We thank Raja Kittappa for advice and suggestions. The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

1. Freed, CR, Greene, PE, Breeze, RE, Tsai, WY, DuMouchel, W, Kao, R *et al.* (2001). Transplantation of embryonic dopamine neurons for severe Parkinson's disease. *N Engl J Med* **344**: 710–719.
2. Olanow, CW, Goetz, CG, Kordower, JH, Stoessl, AJ, Sossi, V, Brin, MF *et al.* (2003). A double-blind controlled trial of bilateral fetal nigral transplantation in Parkinson's disease. *Ann Neurol* **54**: 403–414.
3. Kim, JH, Auerbach, JM, Rodríguez-Gómez, JA, Velasco, I, Gavin, D, Lumelsky, N *et al.* (2002). Dopamine neurons derived from embryonic stem cells function in an animal model of Parkinson's disease. *Nature* **418**: 50–56.
4. Rodríguez-Gómez, JA, Lu, JQ, Velasco, I, Rivera, S, Zoghbi, SS, Liow, JS *et al.* (2007). Persistent dopamine functions of neurons derived from embryonic stem cells in a rodent model of Parkinson disease. *Stem Cells* **25**: 918–928.
5. Roy, NS, Cleren, C, Singh, SK, Yang, L, Beal, MF and Goldman, SA (2006). Functional engraftment of human ES cell-derived dopaminergic neurons enriched by coculture with telomerase-immortalized midbrain astrocytes. *Nat Med* **12**: 1259–1268.
6. Wernig, M, Zhao, JP, Pruszak, J, Hedlund, E, Fu, D, Soldner, F *et al.* (2008). Neurons derived from reprogrammed fibroblasts functionally integrate into the fetal brain and improve symptoms of rats with Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* **105**: 5856–5861.
7. Mendez, I, Sadi, D and Hong, M (1996). Reconstruction of the nigrostriatal pathway by simultaneous intrastriatal and intranigral dopaminergic transplants. *J Neurosci* **16**: 7216–7227.
8. Mukhida, K, Baker, KA, Sadi, D and Mendez, I (2001). Enhancement of sensorimotor behavioral recovery in hemiparkinsonian rats with intrastriatal, intranigral, and intrasubthalamic nucleus dopaminergic transplants. *J Neurosci* **21**: 3521–3530.
9. Olsson, M, Nikkiah, G, Bentlage, C and Björklund, A (1995). Forelimb akinesia in the rat Parkinson model: differential effects of dopamine agonists and nigral transplants as assessed by a new stepping test. *J Neurosci* **15**(5 Pt 2): 3863–3875.
10. Giger, RJ, Hollis, ER 2nd and Tuszynski, MH (2010). Guidance molecules in axon regeneration. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2**: a001867.
11. Hernández-Montiel, HL, Tamariz, E, Sandoval-Minero, MT and Varela-Echavarría, A (2008). Semaphorins 3A, 3C, and 3F in mesencephalic dopaminergic axon pathfinding. *J Comp Neurol* **506**: 387–397.
12. Kolk, SM, Gunput, RA, Tran, TS, van den Heuvel, DM, Prasad, AA, Hellemons, AJ *et al.* (2009). Semaphorin 3F is a bifunctional guidance cue for dopaminergic axons and controls their fasciculation, channeling, rostral growth, and intracortical targeting. *J Neurosci* **29**: 12542–12557.
13. Torre, ER, Gutekunst, CA and Cross, RE (2010). Expression by midbrain dopamine neurons of Sema3A and 3F receptors is associated with chemorepulsion *in vitro* but a mild *in vivo* phenotype. *Mol Cell Neurosci* **44**: 135–153.
14. Yamauchi, K, Mizushima, S, Tamada, A, Yamamoto, N, Takashima, S and Murakami, F (2009). FGF8 signaling regulates growth of midbrain dopaminergic axons by inducing semaphorin 3F. *J Neurosci* **29**: 4044–4055.
15. Kolodkin, AL, Levengood, DV, Rowe, EG, Tai, YT, Giger, RJ and Ginty, DD (1997). Neurophilin is a semaphorin III receptor. *Cell* **90**: 753–762.
16. Takahashi, T, Fournier, A, Nakamura, F, Wang, LH, Murakami, Y, Kalb, RG *et al.* (1999). Plexin-neuropilin-1 complexes form functional semaphorin-3A receptors. *Cell* **99**: 59–69.
17. Luo, Y, Raible, D and Raper, JA (1993). Collapsin: a protein in brain that induces the collapse and paralysis of neuronal growth cones. *Cell* **75**: 217–227.
18. Messersmith, EK, Leonardo, ED, Shatz, CJ, Tessier-Lavigne, M, Goodman, CS and Kolodkin, AL (1995). Semaphorin III can function as a selective chemorepellent to pattern sensory projections in the spinal cord. *Neuron* **14**: 949–959.
19. Behar, O, Golden, JA, Mashimo, H, Schoen, FJ and Fishman, MC (1996). Semaphorin III is needed for normal patterning and growth of nerves, bones and heart. *Nature* **383**: 525–528.
20. Bagnard, D, Lohrum, M, Uziel, D, Püschel, AW and Bolz, J (1998). Semaphorins act as attractive and repulsive guidance signals during the development of cortical projections. *Development* **125**: 5043–5053.
21. Pilleux, F, Morrow, T and Ghosh, A (2000). Semaphorin 3A is a chemoattractant for cortical apical dendrites. *Nature* **404**: 567–573.

22. Wu, KY, Hengst, U, Cox, LJ, Macosko, EZ, Jeromin, A, Urquhart, ER *et al.* (2005). Local translation of RhoA regulates growth cone collapse. *Nature* **436**: 1020–1024.
23. Niquille, M, Garel, S, Mann, F, Hornung, JP, Otsmane, B, Chevalley, S *et al.* (2009). Transient neuronal populations are required to guide callosal axons: a role for semaphorin 3C. *PLoS Biol* **7**: e1000230.
24. Tamariz, E, Díaz-Martínez, NE, Díaz, NF, García-Peña, CM, Velasco, I and Varela-Echavarría, A (2010). Axon responses of embryonic stem cell-derived dopaminergic neurons to semaphorins 3A and 3C. *J Neurosci Res* **88**: 971–980.
25. Díaz, NF, Díaz-Martínez, NE, 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.
26. Alilain, WJ, Horn, KP, Hu, H, Dick, TE and Silver, J (2011). Functional regeneration of respiratory pathways after spinal cord injury. *Nature* **475**: 196–200.
27. Bradbury, EJ, Moon, LD, Popat, RJ, King, VR, Bennett, GS, Patel, PN *et al.* (2002). Chondroitinase ABC promotes functional recovery after spinal cord injury. *Nature* **416**: 636–640.
28. Minor, KH, Bournat, JC, Toscano, N, Giger, RJ and Davies, SJ (2011). Decorin, erythroblastic leukaemia viral oncogene homologue B4 and signal transducer and activator of transcription 3 regulation of semaphorin 3A in central nervous system scar tissue. *Brain* **134**(Pt 4): 1140–1155.
29. Rubio, SE, Martínez, A, Chauvet, S, Mann, F, Soriano, E and Pascual, M (2011). Semaphorin 3C is not required for the establishment and target specificity of the GABAergic septohippocampal pathway *in vitro*. *Eur J Neurosci* **34**: 1923–1933.
30. Schmued, LC and Fallon, JH (1986). Fluoro-Gold: a new fluorescent retrograde axonal tracer with numerous unique properties. *Brain Res* **377**: 147–154.
31. Mendez, I, Baker, KA and Hong, M (2000). Simultaneous intrastriatal and intranigral grafting (double grafts) in the rat model of Parkinson's disease. *Brain Res Brain Res Rev* **32**: 328–339.
32. Bukhatwa, S, Irvani, MM, Zeng, BY, Cooper, JD, Rose, S and Jenner, P (2009). An immunohistochemical and stereological analysis of PSI-induced nigral neuronal degeneration in the rat. *J Neurochem* **109**: 52–59.
33. Courtès, S, Vernerey, J, Pujadas, L, Magalon, K, Cremer, H, Soriano, E *et al.* (2011). Reelin controls progenitor cell migration in the healthy and pathological adult mouse brain. *PLoS ONE* **6**: e20430.
34. Kantor, DB, Chivatakarn, O, Peer, KL, Oster, SF, Inatani, M, Hansen, MJ *et al.* (2004). Semaphorin 5A is a bifunctional axon guidance cue regulated by heparan and chondroitin sulfate proteoglycans. *Neuron* **44**: 961–975.
35. Piaton, G, Aigrot, MS, Williams, A, Moyon, S, Tepavcevic, V, Moutkine, I *et al.* (2011). Class 3 semaphorins influence oligodendrocyte precursor recruitment and remyelination in adult central nervous system. *Brain* **134**(Pt 4): 1156–1167.
36. Varela-Echavarría, A, Tucker, A, Püschel, AW and Guthrie, S (1997). Motor axon subpopulations respond differentially to the chemorepellents netrin-1 and semaphorin D. *Neuron* **18**: 193–207.
37. Kaneko, S, Iwanami, A, Nakamura, M, Kishino, A, Kikuchi, K, Shibata, S *et al.* (2006). A selective Sema3A inhibitor enhances regenerative responses and functional recovery of the injured spinal cord. *Nat Med* **12**: 1380–1389.
38. Van Kampen, JM and Eckman, CB (2006). Dopamine D3 receptor agonist delivery to a model of Parkinson's disease restores the nigrostriatal pathway and improves locomotor behavior. *J Neurosci* **26**: 7272–7280.
39. Gaillard, A, Decressac, M, Frappé, I, Fernagut, PO, Prestoz, L, Besnard, S *et al.* (2009). Anatomical and functional reconstruction of the nigrostriatal pathway by intranigral transplants. *Neurobiol Dis* **35**: 477–488.
40. Thompson, LH, Grealish, S, Kirik, D and Björklund, A (2009). Reconstruction of the nigrostriatal dopamine pathway in the adult mouse brain. *Eur J Neurosci* **30**: 625–638.
41. Zhao, S, Maxwell, S, Jimenez-Beristain, A, Vives, J, Kuehner, E, Zhao, J *et al.* (2004). Generation of embryonic stem cells and transgenic mice expressing green fluorescence protein in midbrain dopaminergic neurons. *Eur J Neurosci* **19**: 1133–1140.
42. Hedlund, E, Pruszek, J, Lardaro, T, Ludwig, W, Viñuela, A, Kim, KS *et al.* (2008). Embryonic stem cell-derived Pitx3-enhanced green fluorescent protein midbrain dopamine neurons survive enrichment by fluorescence-activated cell sorting and function in an animal model of Parkinson's disease. *Stem Cells* **26**: 1526–1536.
43. Grealish, S, Jönsson, ME, Li, M, Kirik, D, Björklund, A and Thompson, LH (2010). The A9 dopamine neuron component in grafts of ventral mesencephalon is an important determinant for recovery of motor function in a rat model of Parkinson's disease. *Brain* **133**(Pt 2): 482–495.
44. O'Keefe, FE, Scott, SA, Tyers, P, O'Keefe, GW, Dalley, JW, Zufferey, R *et al.* (2008). Induction of A9 dopaminergic neurons from neural stem cells improves motor function in an animal model of Parkinson's disease. *Brain* **131**(Pt 3): 630–641.
45. Studer, L, Tabar, V and McKay, RD (1998). Transplantation of expanded mesencephalic precursors leads to recovery in parkinsonian rats. *Nat Neurosci* **1**: 290–295.
46. Lee, SH, Lumelsky, N, Studer, L, Auerbach, JM and McKay, RD (2000). Efficient generation of midbrain and hindbrain neurons from mouse embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* **18**: 675–679.
47. Liu, CQ, Hu, DN, Liu, FX, Chen, Z and Luo, JH (2008). Apomorphine-induced turning behavior in 6-hydroxydopamine lesioned rats is increased by histidine and decreased by histidine decarboxylase, histamine H1 and H2 receptor antagonists, and an H3 receptor agonist. *Pharmacol Biochem Behav* **90**: 325–330.
48. Schallert, T, Fleming, SM, Leasure, JL, Tillerson, JL and Bland, ST (2000). CNS plasticity and assessment of forelimb sensorimotor outcome in unilateral rat models of stroke, cortical ablation, parkinsonism and spinal cord injury. *Neuropharmacology* **39**: 777–787.
49. Guzmán-Ramos, K, Osorio-Gómez, D, Moreno-Castilla, P and Bermúdez-Rattoni, F (2010). Off-line concomitant release of dopamine and glutamate involvement in taste memory consolidation. *J Neurochem* **114**: 226–236.
50. Coggeshall, RE and Lekan, HA (1996). Methods for determining numbers of cells and synapses: a case for more uniform standards of review. *J Comp Neurol* **364**: 6–15.

[Q10]