



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA
CARRERA DE BIOLOGÍA**



**INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR
DIVISIÓN DE NEUROCIENCIAS
DEPARTAMENTO DE NEUROPATOLOGÍA MOLECULAR**

**“DETERMINACIÓN *IN VITRO* DEL POTENCIAL
DOPAMINÉRGICO DE UNA LÍNEA CELULAR TRONCAL
EMBRIONARIA QUE SOBRE-EXPRESA EL FACTOR
TRANSCRIPCIONAL LMX1A”.**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIOLOGO

PRESENTA:

MARÍA DE LOURDES CARDENAS HERRERA

Tutor de tesis: Dra. Magdalena Guerra Crespo.

Co-tutora: Biól. Marcela Palomero Rivero.

Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Estado de México, 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Este proyecto fue realizado en el laboratorio AL-201 de la División de Neurociencias en el Departamento de Neuropatología Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México bajo la tutoría de la Dra. Magdalena Guerra Crespo.

Y gracias al apoyo económico de:

DGAPA-PAPIIT IN207116

Otorgado a la Dra. Magdalena Guerra Crespo.

Y una beca que me fue otorgada por el Sistema Nacional de Investigadores.

AGRADECIMIENTOS

A ti Papá, gracias por darme todo tu apoyo y cariño a lo largo de mis primeros 24 años, por todas y cada una de tus palabras en los momentos más bonitos y difíciles, por ser mi gran ejemplo de fortaleza y por enseñarme que nunca es tarde para corregir los errores. Gracias por estar ahí, porque sin tus consejos y algunos regaños hoy no estaría poniendo en tus manos esta tesis para que te sientas orgulloso de mí.

Para ti Mamá, este trabajo es una pequeña muestra de mi amor hacia ti, de agradecimiento por todo tu apoyo, por caminar codo a codo conmigo en esta primer etapa tan bonita de mi vida, prometo no defraudarte.

A ti Emir, mi bebé, gran parte de este logro está echo para ti, por ser ese pequeño motor en nuestra familia, gracias por tus sonrisas y por todas tus ocurrencias que nos han alegrado. Espero que este proyecto te sirva como ejemplo para lograr todos tus sueños. Siempre estaré para ti.

Quiero agradecer al Dr. René Drucker por brindarme un espacio en su laboratorio para realizar este proyecto. Sin duda fue una experiencia increíble.

Para la Dra. Magdalena Guerra quien fue la primer persona en el laboratorio que creyó en mí, quien me dio la primera oportunidad de adentrarme en el mundo de las neurociencias y quien no me dejó rendir ante los obstáculos. Siento haberme tardado, pero gracias a ti el proyecto está terminado. Para ti Magda, mi respeto y total admiración.

A las Biólogas Marcela Palomero Rivero y Diana Millán Aldaco, les agradezco su paciencia para enseñarme todas las técnicas necesarias para este proyecto.

Agradezco también al biólogo Omar Collazo Navarrete por la dirección técnica en los experimentos utilizados en este trabajo, además por el apoyo en la estructuración y revisión de la tesis.

Un agradecimiento especial a la Mtra. Mónica Chávez, al Biól. Jose Luis Barajas, al Dr. Carlos Muñoz Garay y a la Mtra. Carmen Alvarez por aceptar ser parte de este proyecto y tomarse el tiempo de revisarlo.

Por último pero no menos importante, agradezco al Dr. David Hernández García de la unidad de transgénesis del Instituto de Biotecnología de la UNAM por su colaboración en la generación de la línea de CTEr usada en este proyecto.

A mi familia, hoy les digo que llegó el gran día, MI TITULO ES POR Y PARA USTEDES,
LOS AMO!

ÍNDICE

ABREVIATURAS	6
RESUMEN	7
I. INTRODUCCION	8
1. Desarrollo del sistema nervioso central	8
2. Las células troncales y su potencialidad durante el desarrollo del sistema nervioso central.....	11
2.1 Células troncales totipotentes.....	11
2.2 Células troncales pluripotentes.....	12
2.3 Células troncales multipotentes.....	12
3. Las células troncales embrionarias y su relación con la enfermedad de Parkinson.....	15
II. ANTECEDENTES	16
1. Las células troncales embrionarias y su potencial dopaminérgico mesencefálico.....	16
2. Microambientes permisivos a la diferenciación neuronal en el cerebro adulto: la sustancia nigra pars compacta.....	18
3. Generación de la línea NesE-Lmx1a.....	21
III. HIPÓTESIS	22
IV. OBJETIVO GENERAL	22
V. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
VI. METODOLOGÍA	22
1. Cultivo de CTE de la línea NesE-Lmx1a y R1B5.....	22
2. Procedimientos de cultivo celular.....	24
3. Inmunofluorescencia y conteo celular.....	26

VII. RESULTADOS	28
1. Comparación morfológica y de crecimiento entre la línea NesE-Lmx1a y R1B5 a lo largo del protocolo de diferenciación de 5 etapas.....	28
2. Expresión de Lmx1a asociada a la expresión de nestina (expresión del transgen).....	28
3. La sobreexpresión de Lmx1a aumenta el potencial dopaminérgico <i>in vitro</i> de la línea NesE-Lmx1a.....	31
VIII. DISCUSIÓN	32
1. CPN con identidad mesencéflica ventral.....	33
2. Lmx1a promueve la generación de neuronas TH+.....	34
IX. CONCLUSIONES	35
X. ANEXO 1	36
XI. ANEXO 2	39
XII. BIBLIOGRAFÍA	40

ABREVIATURAS

Células troncales embrionarias	CTE
Células troncales embrionarias de ratón	CTEr
Células troncales pluripotentes	CTP
Células troncales neurales	CTN
Corriente rostral migratoria	CRM
Cuerpo embrioide	CE
Días post-trasplante	dpt
Doblecortina	DCX
Dopaminérgicas	DA
Dopaminérgicasmesencéfálicas	DAm
Enfermedad de Parkinson	EP
Factor de crecimiento de fibroblastos	FGF
Factor inhibidor de leucemia (<i>Leukemia inhibitor factor</i>)	LIF
Mesencéfalo ventral	MV
Nestina	nes
Proteína verde fluorescente	GFP
Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa	RT-PCR
Sistema nervioso central	SNC
Sonic hedgehog	shh
Substancia nigrapars compacta	SNpc
Tirosina hidroxilasa	TH
Zona subventricular	ZSV

RESUMEN

La enfermedad de Parkinson (EP) se caracteriza por la pérdida progresiva de las neuronas dopaminérgicas (DA) que conforman uno de los principales núcleos dopaminérgicos del sistema nervioso central (SNC). Éste núcleo, conocido como sustancia nigra pars compacta (SNpc), se encarga de regular funciones motoras y cognitivas; por lo tanto, su degeneración se traduce en afectaciones de dichas funciones. La EP es considerada la segunda enfermedad neurodegenerativa más común a nivel mundial, para la cual no existe un tratamiento eficaz que permita revertir los síntomas. Actualmente, la Levo-Dopa, es el tratamiento más común, sin embargo, a largo plazo genera severos efectos secundarios que llegan a ser más incapacitantes que la propia enfermedad. Por ello, se continúan explorando terapias alternativas como la de reemplazo celular, con el fin de sustituir las neuronas perdidas en la EP. Hasta hoy, no se cuenta con una fuente celular óptima para trasplantar en la EP. Una fuente altamente promisorio para este propósito, son las células troncales embrionarias (CTE), sin embargo, estudios enfocados a determinar si el cerebro es un sitio permisivo a la diferenciación neuronal de estas células aún son escasos. Recientemente, nuestro grupo demostró que la SNpc es un sitio permisivo a la diferenciación neuronal de CTE pero no hacia neuronas DA, por lo que se plantearon dos posibilidades: 1) la SNpc no posee señales inductoras de ese fenotipo, o bien, 2) es represiva de la diferenciación DA. Para determinarlo, en el laboratorio se generó una línea de CTE de ratón (CTEr), NesE-Lmx1a, que sobreexpresa Lmx1a, un factor de transcripción importante en la especificación y diferenciación DA mesencefálica (DAm). El objetivo de este trabajo fue caracterizar *in vitro* el potencial de diferenciación dopaminérgico de la línea NesE-Lmx1a. Para ello, la línea fue sometida a un protocolo de diferenciación de 5 etapas: Expansión de CTE, formación de cuerpos embrioides, selección de precursores neurales, expansión de precursores neurales y diferenciación neuronal. Como control se usó la línea de origen R1B5. Pudimos determinar a través de inmunomarcaje, que la línea NesE-Lmx1a en la etapa 4 expresa Lmx1a en un porcentaje mayor que la línea control y que su expresión está asociada a células Nes+. Además, la evaluación al final de la 5ta etapa, nos permitió concluir que la línea NesE-Lmx1a tiene un mayor potencial de diferenciación DA como se ha reportado en otras líneas de CTE que sobreexpresan Lmx1a.

I. INTRODUCCIÓN

1. Desarrollo del sistema nervioso central

El sistema nervioso (SN) es el encargado de controlar y regular el funcionamiento de los órganos y sistemas a través de estructuras especializadas, además, el SN media la interrelación y relación del organismo con el medio externo. Éste se encuentra clasificado en dos grandes subsistemas: el sistema nervioso central (SNC) conformado por el encéfalo y médula espinal y el sistema nervioso periférico en el que se incluyen los tejidos nerviosos fuera del SNC. A su vez, el tejido nervioso consta de dos tipos celulares: las neuronas y la células gliales (Stern, 2004).

Las neuronas son las células responsables de las funciones atribuidas al SNC y existen distintos tipos de ellas, que varían en forma, tamaño y función. La función neuronal está determinada por el tipo de neurotransmisor que sintetiza y estará directamente relacionada con el circuito del cual forma parte; sin embargo, todas ellas tienen una estructura básica que consta de un cuerpo neuronal, dendritas y axones (Bustamante, 2000).

El SN en mamíferos se desarrolla en la tercera semana de gestación por un proceso llamado neurulación que ocurre en la parte dorsal del embrión (Silva, 2012). Al inicio, el mesodermo estimula al ectodermo que se encuentra por encima, este proceso de inducción hace que el ectodermo se engrose formando así la placa neural (Fig.1). Una vez completado el proceso inductivo, la placa neural se alarga y alrededor del día 19 de desarrollo los bordes laterales de la placa neural se elevan y forman los pliegues neurales. De la porción media de los pliegues neurales se forma el surco neural en forma de U que divide el lado derecho del izquierdo del embrión. Alrededor del día 21 de gestación los pliegues neurales se modifican aún más, se acercan y se fusionan formando el tubo neural por debajo del ectodermo que lo recubre (Fig.1).

Mientras los pliegues neurales se acercan a la línea media para fusionarse, un grupo de células neuroectodérmicas ubicadas en la cresta de cada pliegue (crestas neurales) migran activamente hacia el mesodermo adyacente transformando el neuroectodermo en una masa aplanada e irregular que rodea al tubo neural, de la cual se originarán otros tejidos de ran

importancia en los de la ra posterior en los aut nomos en los de los pares craneales células de c an las leptomenin es aracnoides piamadre melanocitos médula suprarrenal, odontoblastos, etc. (Gilbert, 2003).

En consecuencia el tubo neural se forma por diferenciación en el encéfalo y la médula espinal mientras que las crestas neurales forman la mayor parte del sistema nervioso periférico. Cuando el tubo neural se encuentra totalmente en desarrollo, el extremo cefálico da origen a las 3 vesículas encefálicas primarias: el prosencéfalo, mesencéfalo y rombencéfalo. Por su parte el tercio caudal del tubo neural se alarga para formar la médula espinal (Nieuwenhuys *et al.*, 2008). En general, la neurulación primaria se divide en 4 procesos distintos pero superpuestos en tiempo y espacio: en primer lugar se da la formación de la placa neural, posteriormente se realiza el modelado de la placa neural, enseguida se flexiona la placa neural para formar el surco neural y por último se cierra el surco neural para formar el tubo neural. Se cree que la neurulación primaria es un proceso similar en anfibios, reptiles, aves y mamíferos (Gilbert, 2003).

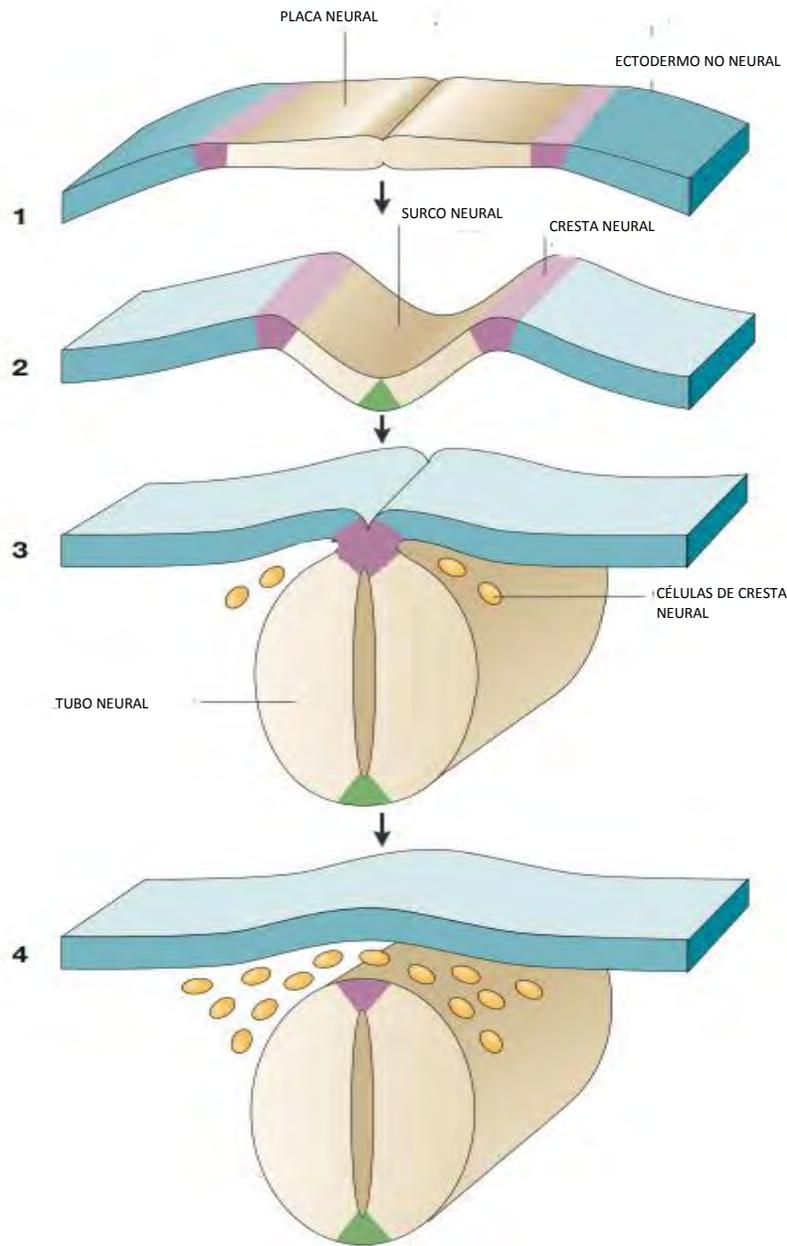


Figura 1. Formación del tubo neural en mamíferos. La neuralización ocurre en la parte dorsal del embrión y es un proceso inductivo mediado, en inicio, por la señalización del mesodermo. Este promueve el engrosamiento del ectodermo convirtiéndolo en el neuroectodermo formador de la placa neural (1). Más adelante, la placa neural presenta un alargamiento y se generan pliegues laterales o crestas neurales y al centro una hendidura conocida como surco neural (2). Posteriormente, los pliegues laterales se encuentran entre sí debido a la proliferación celular y dan pie a la formación del tubo neural en el centro (3). El tubo neural en esta etapa es una estructura “hueca”. Finalmente, el tubo neural se separa por completo del ectodermo no neural que en un principio flanqueaba a la placa neural y el espacio resultante es ocupado por células de la cresta neural que se caracterizan por ser multipotentes (4). Modificado de Liu y Niswander, 2005.

Posteriormente, la neurulación secundaria inicia cuando las regiones sacras comienzan a formar parte del tubo neural en la región más posterior, sin la participación de pliegues neurales. Durante la neurulación secundaria se produce un cordón medular a partir de la condensación de células mesenquimáticas que provienen de la línea primitiva. Este cordón se ahueca para así formar el tubo neural. El tubo medular se forma de un grupo de células indiferenciadas denominada eminencia caudal, las cuales se organizan de tal manera que dan origen a la luz del tubo neural secundario, la notocorda (Andrew *et al.*, 1990).

2. Las células troncales y su potencialidad durante el desarrollo del sistema nervioso central

Durante el desarrollo embrionario después de la formación del cigoto, las células troncales (CT) en un inicio totipotentes (Fig. 2), llevan a cabo procesos de diferenciación para derivar a todas las células que conforman un organismo, por ello, las células pierden de forma progresiva su potencialidad hasta derivar a una célula especializada con función específica (Rippon-Bishop, 2004), (por ejemplo una neurona o un cardiomiocito). Sin embargo, en el organismo adulto persisten poblaciones de CT multipotentes encargadas de mantener el recambio celular de un tejido específico y/o llevar a cabo procesos de regeneración (Beltramiet *al.*, 2003). Así, las CT se han clasificado de acuerdo al estadio en el que se encuentran, embrionarias o adultas, o bien por su potencialidad de diferenciación: totipotentes, pluripotentes o multipotentes.

2.1 Células troncales totipotentes

Las CT totipotentes (CTT) tienen la capacidad de generar un organismo después de un proceso finamente regulado de proliferación y diferenciación conocido como desarrollo embrionario. Además, son las únicas células en el embrión que dan origen a tejido extraembrionario (Ferraris y Muñoz, 2009). Otra de las capacidades únicas de las CTT es la autocomplementación, es decir, si el embrión llega a separarse en los primeros eventos de división, cada una de las partes puede generar un organismo independiente. La totipotencialidad se limita al estadio de 16 células (Fig. 2) (Guzman-Solís, 2006).

2.2 Células troncales pluripotentes

Las CT pluripotentes (CTP) son obtenidas de la masa celular interna del blastocisto de un embrión de mamífero entre el 4º al 7º día después de la fecundación dependiendo de la especie (Morata, 2004). *In vivo*, estas células tienen la capacidad de dar origen a cualquier célula especializada del cuerpo mediante un proceso de diferenciación. Sin embargo, no pueden contribuir a la formación de membranas extraembrionarias ni tejidos de sostén para el feto; por lo tanto, no son capaces de originar un individuo completo. Las CTP también son capaces de diferenciarse y ser expandidas bajo condiciones específicas *in vitro* por un periodo de tiempo largo (Takahashiet *al.*, 2007). Las CTP pueden diferenciar a cualquier célula especializada, esto se debe a su capacidad de derivar a células con identidad mesodérmica, endodérmica o ectodérmica (Kuijket *al.*, 2010) y entonces seguir con el proceso de diferenciación hacia un tipo celular específico (Fig. 2). Debido a su fácil obtención, manipulación *in vitro* y su potencial de diferenciación, las CTP embrionarias son una fuente celular promisorias en el establecimiento de terapias de reemplazo celular o medicina regenerativa (Fox *et al.*, 2008). Cabe mencionar que éstas se encuentran solo en el embrión.

2.3 Células troncales multipotentes

En el desarrollo, las primeras CT multipotentes (CTM) son las células que componen las capas germinales (Fig. 2) (Wolpert *et al.*, 2007). Cada una de estas capas dará origen a otras CTM consideradas precursoras de algún linaje celular específico. Se pueden encontrar poblaciones de CTM tanto en el embrión como en el organismo adulto. Sin embargo, las poblaciones de CTP en el adulto están confinadas solo a ciertos linajes celulares como el neural (Wolpert *et al.*, 2007) (Fig. 3).

Las células neurales (neuronas y glía) y las células epiteliales, derivan de la capa ectodérmica (Fig. 2) (Gotz y Huttner, 2005). Las células troncales neurales (CTN), un tipo de CTM encontrado en esa capa germinal embrionaria así como en el cerebro adulto, iniciarán en respuesta a las señales presentes en su entorno o nicho, un proceso de diferenciación hasta derivar en una neurona madura o bien en una célula glial; esto se conoce como

neurogénesis o gliogénesis, respectivamente. En el proceso neurogénico, las CTN son especificadas desde las primeras fases de diferenciación y antes de convertirse en neuroblastos, adquieren un compromiso a diferenciar hacia un tipo neuronal específico que es irreversible en condiciones fisiológicas, por ejemplo, neuronas gabaérgicas o neuronas dopaminérgicas (DA) (Hirabayashi-Gotoh, 2010).

El descubrimiento de las CTN en el cerebro adulto en la década de los sesenta por Joseph Altman, derribó el paradigma que sostenía que en el cerebro adulto no se producía regeneración celular (Altman 1965, 1969). Utilizando la técnica de autorradiografía con timidina tritiada que permite marcar células en división, se determinó que las CTN se encuentran y auto-renuevan en sitios específicos del cerebro durante toda la vida del individuo. Esta característica las diferencia de las CTT y CTP que sólo se encuentran en la etapa embrionaria (Altman, 1969; Seaberg-Van der Kooy, 2003).

Hasta el día de hoy se han identificado en el cerebro adulto de mamíferos dos sitios de neurogénesis activa: el giro dentado del hipocampo y la zona subventricular (ZSV) de los ventrículos laterales (Emsley *et al.*, 2005). Los estudios indican que estas poblaciones de CTN multipotentes encontradas en el organismo adulto, funcionan primordialmente como un reservorio para mantener el recambio celular de poblaciones más especializadas (Eynard *et al.*, 2008) y al parecer no tienen una función reparativa. A pesar de eso, actualmente se estudia la posibilidad de usar la neurogénesis endógena en pro de la reparación del tejido neuronal después de un daño o proceso degenerativo. Además, hay estudios que aportan evidencia de neurogénesis en otros sitios del cerebro adulto incluyendo la SNpc, aunque no se ha podido demostrar de forma contundente (Gould, 2007).

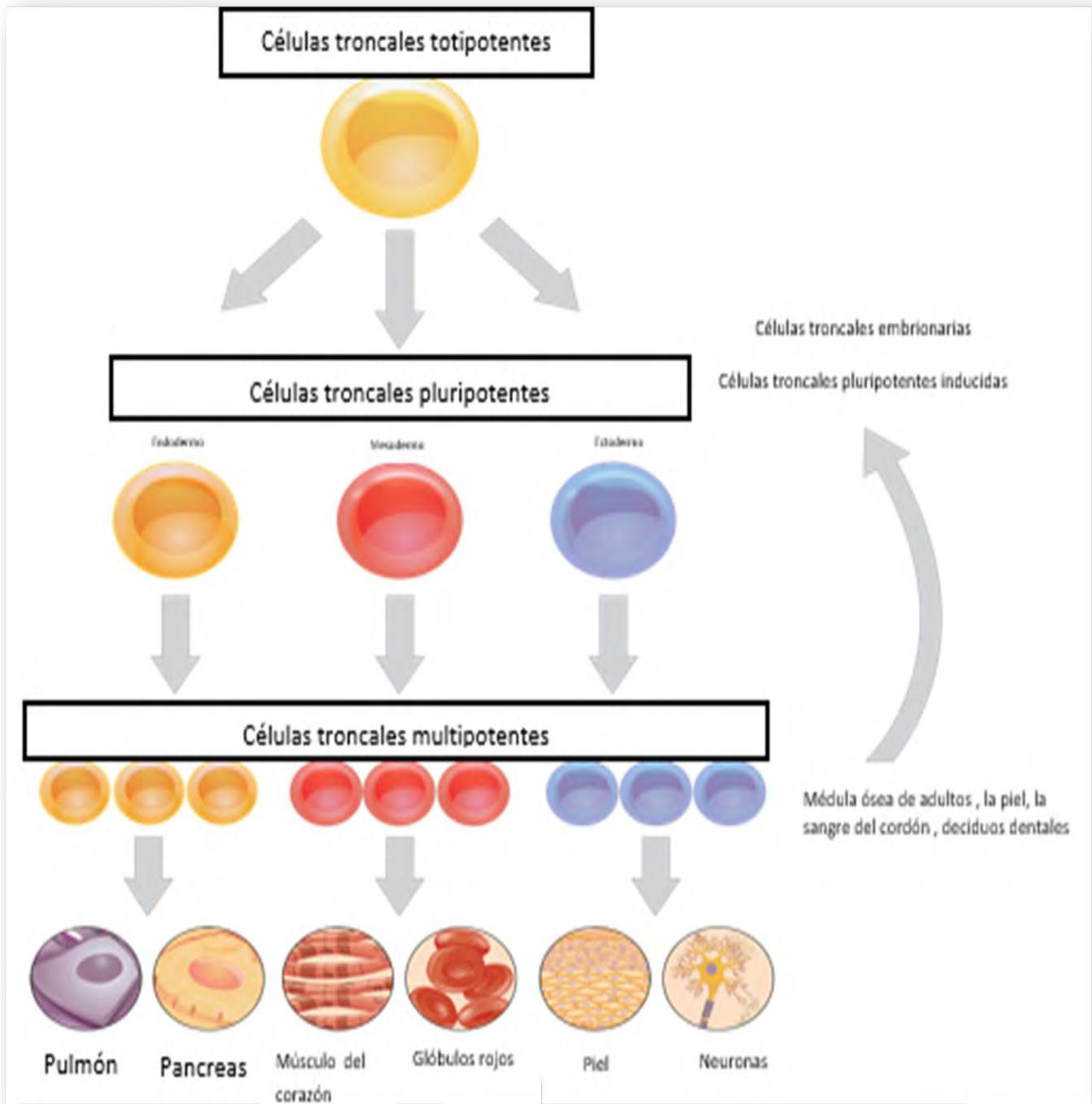


Figura 2. Clasificación de las CT por su potencialidad. La potencialidad se define como la capacidad de diferenciación de una CT para originar diferentes linajes celulares. Las CT primeramente se encuentran en un estado totipotente; sin embargo, este potencial lo pierden rápidamente convirtiéndose en CTP, las cuales forman parte de las tres capas germinales: mesodermo, endodermo y ectodermo, mismas que posteriormente darán origen a todas las células somáticas que conferirán un estado multipotente e irreversible (Kuijket *et al.*, 2010; Arias-Carrión *et al.*, 2007; Seaberg-Van der Kooy, 2003). Modificada de Institute of Cell Therapy, 2004-2013.

3. Las células troncales embrionarias y su relación con la enfermedad de Parkinson

El aislamiento de las CT embrionarias (CTE) ha representado un gran avance en el estudio de la biología del desarrollo ya que proporcionan un modelo para estudiar los procesos celulares y moleculares involucrados en la formación de un organismo. Al mismo tiempo, sus propiedades de auto-renovación y potencial de formar todos los tipos celulares encontrados en un organismo adulto les ha conferido a las CTE su relevancia hacia una aplicación prometedora en una amplia variedad de enfermedades humanas donde existe pérdida celular, como es el caso de la enfermedad de Parkinson (EP) (Dossset *al.*, 2004).

La EP se caracteriza por la continua y selectiva degeneración de las neuronas DA mesencefálicas (DAm) de la sustancia nigra pars compacta (SNpc), por lo que la muerte de estas neuronas se traduce en un déficit de dopamina (Dauer y Przedborski, 2003). La deficiencia de éste neurotransmisor genera distintas alteraciones que en conjunto producen los síntomas motores y cognitivos que caracterizan la EP (Bjorklund *et al.*, 2007). Según la OMS, uno de cada 100 habitantes mayores de 65 años en todo el mundo, padece la EP por lo que es considerada la segunda enfermedad neurodegenerativa con mayor prevalencia, sólo después del Alzheimer (Frenket *al.*, 2002). El Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía menciona que en el mundo, se ha incrementado la tasa de sobrevivencia y con ello el padecimiento de enfermedades neurodegenerativas ya que, actualmente, esta enfermedad afecta de 4.1 a 4.6 millones de personas mayores de 50 años y se calcula que para el año 2030 la cifra se duplicará, por lo que implica un problema de salud pública grave (www.cenetec.salud.gob.mx). En México, la incidencia se estima en 44 casos nuevos por cada 100 mil habitantes (Frenket *al.*, 2002).

Históricamente, la opción de tratamiento farmacológico más empleado es la Levo-Dopa, un precursor de dopamina que al restablecer de manera parcial la neurotransmisión DA ayuda a disminuir algunos de los síntomas motores de la enfermedad. Desafortunadamente, trae consigo efectos secundarios negativos después de 3 a 5 años de uso, como son fluctuaciones en la actividad motora, sedación, pesadillas durante el sueño y problemas neuro-psiquiátricos como alucinaciones, psicosis, manía e hipersexualidad. Por otro lado, la Levo-Dopa no ayuda a mejorar los síntomas como la rigidez, inestabilidad de la postura o demencia. Además de que no detiene la progresión de la enfermedad (Arpa y Vivancos,

2004) y sus beneficios se reducen con su administración crónica (Simola *et al.*, 2010). Por estas razones, el reemplazo de las células productoras de dopamina mediante trasplantes celulares se ha explorado activamente desde hace ya 3 décadas (Guerra-Crespo *et al.*, 2011). Sin embargo, a pesar de que en un inicio fueron obtenidas mejoras clínicas al trasplantar tejido fetal de la SNpc, los problemas de efectividad entre pacientes y principalmente las restricciones éticas, llevaron al continuo esfuerzo de desarrollar una fuente altamente enriquecida de neuronas DA con la identidad mesencefálica “correcta” es decir, las neuronas del subtipo A9 que son las que degeneran en la EP. La importancia de las CTE en la EP, radica en que bajo ciertos protocolos de cultivo son sometidas a especificar al fenotipo dopaminérgico mesencefálico. Para ello, se han realizado importantes esfuerzos aunque aún insuficientes para dirigir *in vitro* la diferenciación neuronal específica hacia ese fenotipo, con el fin último de trasplantar y así reestablecer la población DAM *in vivo*.

II. ANTECEDENTES

1. Las células troncales embrionarias y su potencial dopaminérgico mesencefálico

En el contexto embrionario es claro el potencial DAM de las CTE; sin embargo, este potencial no es eficientemente alcanzado *in vitro*. Uno de los protocolos de diferenciación neuronal DA más utilizado es el de 5 etapas, el cuál consiste en la amplificación de las CTE, la formación de cuerpos embrioides (CE), la selección de los precursores neurales, la expansión de precursores neurales seleccionados y la diferenciación terminal. Sin embargo, el porcentaje de diferenciación no sobrepasa el 11% del total de las neuronas obtenidas al final de la 5ta etapa, además de que el fenotipo generado no es mesencefálico.

Diversas estrategias se han implementado a nivel de cultivo para aumentar la eficiencia de diferenciación, por mencionar algunos: adición de factores solubles al cultivo, co-cultivo de CTE con células estromales y sobreexpresión constitutiva o temporal de factores de transcripción importantes en la neurogénesis DAM (Hynes *et al.*, 2005; Andersson *et al.*, 2006). Así, en el año 2006, Andersson y colaboradores (Andersson *et al.*, 2006) se enfocaron en determinar qué factores de transcripción son determinantes en la especificación y diferenciación de los precursores DAM en el embrión de pollo y ratón, encontrando que el factor de transcripción con homeodominio en LIM, Lmx1a, es un factor maestro involucrado en tal proceso (Fig. 3).

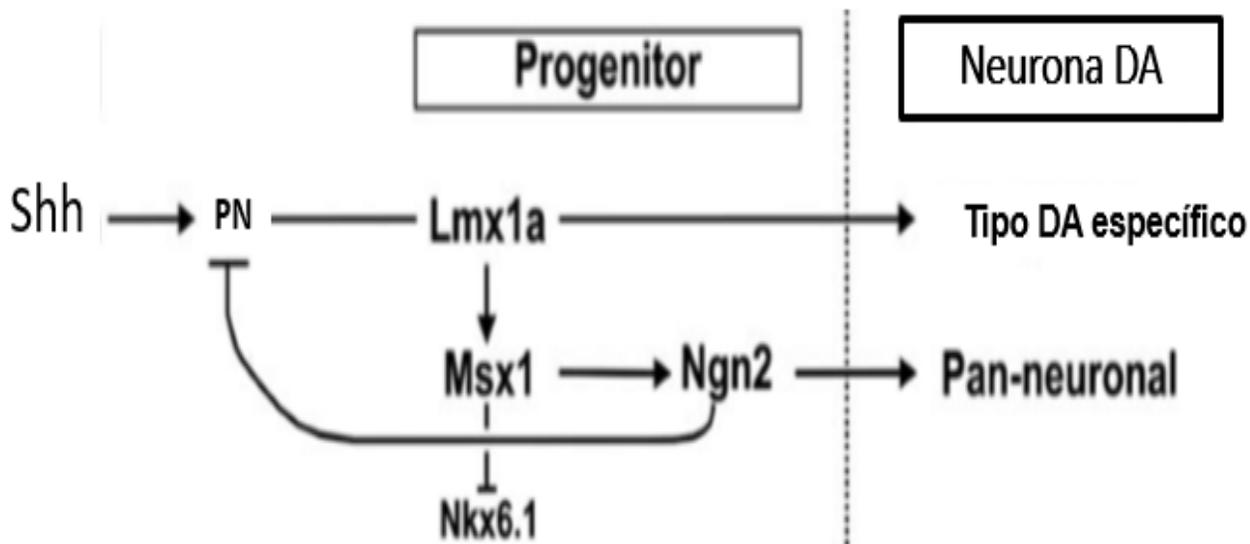


Figura 3. La placa de piso de la zona ventricular del cerebro medio da lugar a la formación de las neuronas DAM a partir de precursores neurales, que inicialmente son células neuroepiteliales y subsecuentemente glía radial. Shh es uno de los factores que determina la identidad ventral del cerebro medio y la especificación de las neuronas DA. Durante el proceso neurogénico, Shh induce la expresión del factor de transcripción Lmx1a, que a su vez media la expresión de Msx1. Este último favorecerá la expresión del factor proneuronal Ngn2 y es supresor de fenotipos alternativos al inhibir la expresión de Nkx6.1. Modificada de Andersson *et al.*, 2006.

Por otra parte, Frilling y colaboradores (Frilling *et al.*, 2009), caracterizaron en ratón, el potencial de diferenciación DA de células que sobre expresan Lmx1a bajo el promotor de nestina que se expresa de manera temporal exclusivamente en CPN. Observaron que las células modificadas se diferencian en un alto porcentaje, aproximadamente 60%, a células DA con identidad mesencefálica, es decir, que expresan además de tirosina hidroxilasa (TH, enzima limitante en la síntesis de dopamina), marcadores de ese fenotipo como Lmx1a, Vmat y DAT. Las células control por su parte, mantienen porcentajes bajos de diferenciación y no expresan marcadores mesencefálicos. Este hallazgo se ha replicado al sobreexpresar Lmx1a en células humanas y al utilizar Lmx1a como factor soluble. Cabe mencionar que el proceso sigue siendo dependiente de la señalización de Shh y del factor de crecimiento de fibroblastos 8 (Fgf8) (Sanchez-Danés *et al.*, 2012; Wu *et al.*, 2015).

2. Microambientes permisivos a la diferenciación neuronal en el cerebro adulto: la sustancia nigrapars compacta

Como he mencionado anteriormente, la neuroreparación a través del trasplante de CT es considerada como un tratamiento prometedor para tratar enfermedades del SN en las que existe pérdida neuronal. Sin embargo, estudios sistemáticos que demuestren que el cerebro es capaz de permitir la diferenciación neuronal de células trasplantadas, así como su integración funcional son escasos. En un estudio desarrollado por nuestro laboratorio se demostró que el cerebro adulto es capaz de soportar la diferenciación neuronal de células troncales embrionarias de ratón (CTEr) trasplantadas en etapa de CE, es decir, en estado pluripotente en el que por lo tanto no existe un compromiso hacia el destino neural (Maya-Espinosa *et al.*, 2015). Los CE de la línea R1B5 identificables fácilmente por la expresión constitutiva de la proteína verde fluorescente (GFP), fueron trasplantados en sitios conocidos como neurogénicos y no neurogénicos del cerebro de rata postnatal y adulta. En la zona neurogénica ya conocida, que se extiende entre la corriente rostral migratoria (CRM) y la corteza, se observó a los 6 días post-trasplante (dpt), que el 50% de las células eran CPN. Estas células expresaban Sox1, un factor de transcripción utilizado como marcador de células comprometidas con el destino neural (Pevny *et al.*, 1998). Al analizar tiempos posteriores, 21 dpt, el 70% de las células de CE adquirieron un fenotipo neuronal, el cuál fue

determinado a través de la expresión del marcador de neuronas maduras NeuN. De ellas, el 50% eran gabaérgicas y sólo algunas TH+. Posteriormente, para conocer si la diferenciación neuronal en el cerebro postnatal a partir de células de CE se producía dependiendo del microambiente, se trasplantaron las células de CE en el estriado, un área no neurogénica. Se encontró que esta área es poco permisiva a la diferenciación neuronal; sin embargo, si fue permisiva a la diferenciación astrocítica. Por otra parte, en el estriado de cerebro adulto a los 15 dpt, NeuN fue detectado solamente en algunas células derivadas de CE. De manera interesante, en esta misma estructura y a los mismos 15 dpt, observamos posterior a un evento vascular cerebral isquémico inducido mediante un modelo de lesión de la arteria media cerebral, que el 12% de células expresan NeuN. Este resultado proporcionó información de que la lesión promueve una condición que favorece la neurogénesis y que las células derivadas de CE pueden sentir ese cambio. Adicionalmente y tomando en consideración, la controversia actual de si la SNpc en el cerebro adulto es neurogénica, se exploró la capacidad de los CE para diferenciar en esa zona. De manera sorprendente, se observó que muchas células sobrevivieron y seguían un proceso de diferenciación, que fue identificado a través de la expresión secuencial de diferentes marcadores (Fig. 4). A 6 dpt, muy pocas células expresaban Sox1 (Fig. 4A) y alrededor del 32% eran positivas para doblecortina (DCX), un marcador de neuroblastos y neuronas jóvenes (Fig. 4B). Este último porcentaje aumentó significativamente hasta 64% a los 15 dpt (Fig. 4F), disminuyendo a los 30 dpt a menos del 10% (Fig. 4L). Se detectaron muy pocas neuronas (NeuN+) a 15 dpt (Fig. 4C, G), pero el número aumentó marcadamente hasta 43% a 30 dpt (Fig. 4L). De manera interesante, no se detectaron células GFAP+ a los 6 ó 15 dpt (Fig. 4D, H). Entre las neuronas diferenciadas en esta región, algunas eran positivas para calretinina (Fig. 4I) pero ninguna expresaba TH (Fig. 4K) o GAD67, una enzima indispensable en la síntesis de GABA (Fig. 4J). Todos estos resultados indican que, la SNpc de cerebro adulto se comporta como un nicho neurogénico pero de actividad muy baja, ya que las probables CPNs endógenas no se han detectado consistentemente en condiciones fisiológicas normales.

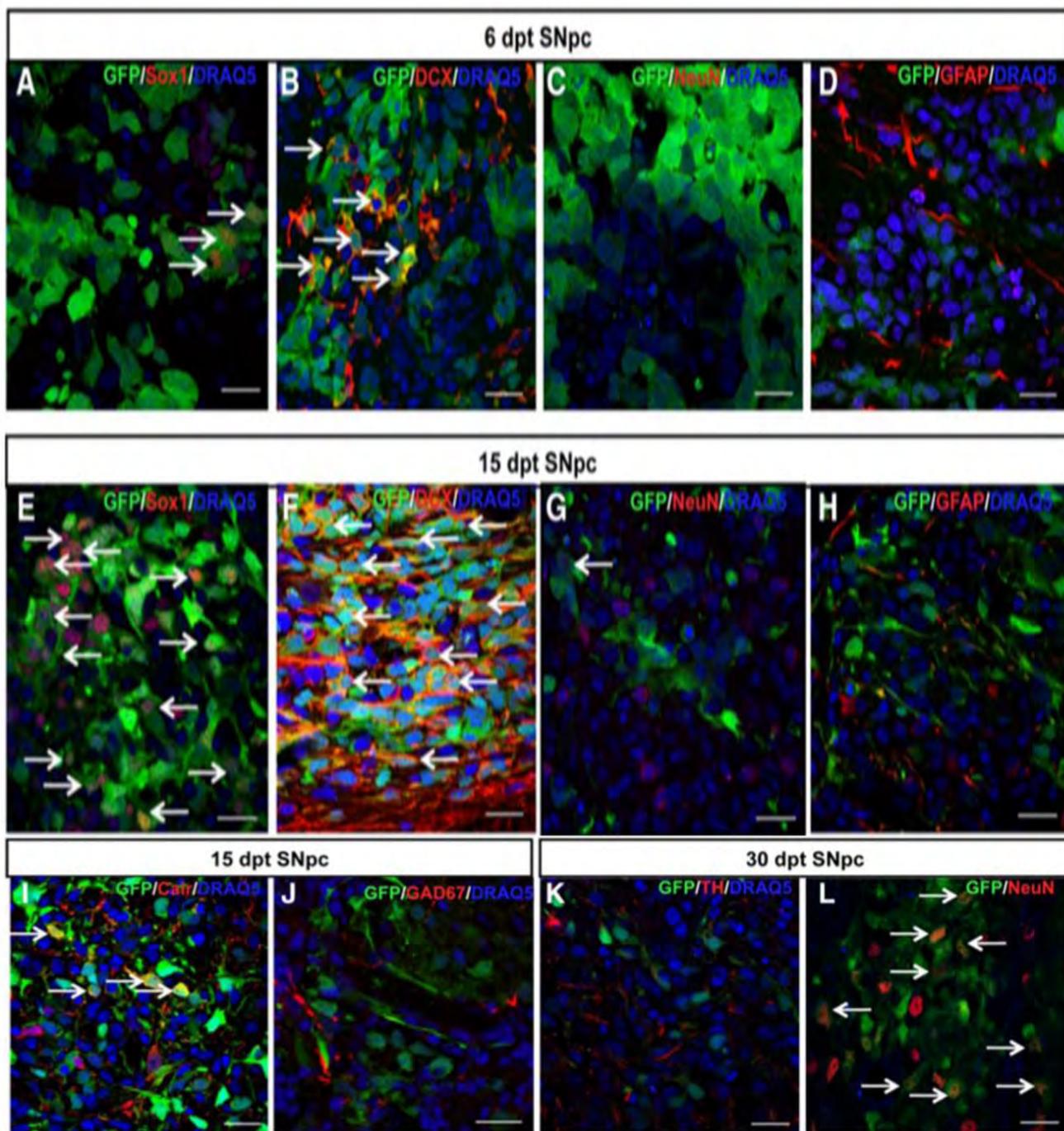


Figura 4. Diferenciación neuronal de los CE en la SNpc. Los CE se trasplantaron en la SNpc y se detectaron marcadores neurales a los 6,15 y 30 dpt. A los 6 dpt se encontraron pocas células Sox1+(A); sin embargo, ya se encontraban células DCX+ (B), aunque no se detectaron células NeuN+ (C) y tampoco diferenciación glial (D). A los 15 dpt, se observa ya la estimulación de la neurogénesis por la presencia de Sox1+ (E) y el incremento de DCX (F). Aunque se detectaron pocas células NeuN+ a 15 dpt (G), una proporción significativa tenía el marcador neuronal a 30 dpt (L), mientras que persistió la

falta de diferenciación glial (**H**). En estos 30 dpt analizados, se encontraron neuronas que expresaban calretinina (**I**) pero no GAD67 (**J**) o TH (**K**). Las flechas señalan a las células positivas. Barras de escala = 20 μ m. Tomada de Maya *et al.*, 2015.

Debido a que la diferenciación neuronal de las células de CE en la SNpc no fue dopaminérgico, nos preguntamos si esta estructura tiene señales represoras del fenotipo o sencillamente no existen señales que permitan la diferenciación DA. Para responder estas preguntas en torno al microambiente de la SNpc, una herramienta viable era contar con una línea comprometida al destino dopaminérgico mesencefálico.

3. Generación de la línea NesE-Lmx1a

El laboratorio generó en colaboración con el Dr. David Hernández en la unidad de transgénesis del Instituto de Biotecnología de la UNAM, una línea de CTEr que sobreexpresa el factor de transcripción Lmx1a bajo el promotor de nestina llamada NesE-Lmx1a (Collazo *et al.*, manuscrito en preparación). El vector que contiene el factor transcripcional Lmx1a fue donado por la Dra. Andersson (Andersson *et al.*, 2006) y fue introducido en la línea R1B5 que expresa de manera constitutiva la GFP y que se ha utilizado en estudios previos del grupo (Maya, *et al.*, 2015). Se seleccionaron varias colonias que fueron cultivadas siguiendo el protocolo de diferenciación DA de 5 etapas (Lee *et al.*, 2000) para determinar el nivel de expresión de Lmx1a. A través de la extracción de RNA y la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa (RT-PCR), se determinó que dos líneas sobreexpresaban Lmx1a (contenían el transgén) (Collazo *et al.*, manuscrito en preparación). La línea con mayor sobreexpresión de Lmx1a fue seleccionada para este estudio encaminado en caracterizar *in vitro* el potencial neurogénico y dopaminérgico de esa línea celular, para en trabajos posteriores, determinar su potencial hacia neuronas DAm *in vivo*.

III. HIPÓTESIS

- Las CTEr de la línea NesE-Lmx1a al expresar el factor de transcripción Lmx1a bajo el promotor de nestina tendrán un mayor potencial dopaminérgico *in vitro*.

IV. OBJETIVO GENERAL

- Evaluar *in vitro* el potencial neurogénico y dopaminérgico de la línea NesE-Lmx1a que sobreexpresa el factor de transcripción Lmx1a bajo el promotor de nestina.

V. OBJETIVOS PARTICULARES

1. Estandarizar el protocolo de diferenciación de 5 pasos en nuestro laboratorio.
2. Someter las líneas NesE-Lmx1a y R1B5 al protocolo de diferenciación.
3. Corroborar la expresión de Lmx1a en la línea NesE-Lmx1a.
4. Comparar el potencial de diferenciación neurogénico y DA de la línea NesE-Lmx1a con el potencial de la línea control R1B5.

VI. METODOLOGÍA

1. Cultivo de CTEr de la línea NesE-Lmx1a y R1B5

Empleamos el protocolo de diferenciación DA de 5 etapas, que permite diferenciar CTEr a neuronas DA (Lee *et al.*, 2000). Este consiste en la expansión de CTEr (etapa 1), la formación de CE (etapa 2), el uso de medio definido para la selección de CPN (etapa 3), expansión y especificación de las CPN (etapa 4) y por último la diferenciación neuronal (etapa 5).

A) Etapa 1: Expansión de CTEr

La expansión de las CTEr se realizó sobre una cama de células alimentadoras consistente de fibroblastos previamente sembrados, expandidos (80% de confluencia) y mitomizados (Anexo 1) en cajas de petri de 6 cm con gelatina de piel de porcino al 0.1% (Anexo 1). Una vez que los fibroblastos fueron mitomizados, se descongelaron y se sembraron 2×10^6 de CTEr de la línea NesE-Lmx1a o de la línea R1B5 utilizando el medio M15 (Anexo 1).

Las células se mantuvieron en estas condiciones con un cambio de medio cada 24 h hasta que las colonias ocuparon aproximadamente el 50% de la superficie (2 a 3 días). Al tercer día las células fueron subcultivadas en una caja petri de 10 cm gelatinizada y libre de células alimentadoras durante 3 días con cambio de medio cada 24 h y utilizando medio M15 suplementado con el factor inhibidor de leucemia (LIF) (Anexo 1), como factor que impide la diferenciación.

B) Etapa 2: Formación de cuerpos embrioides

Posterior a la expansión, las CTEr fueron subcultivadas en cajas bacteriológicas no adherentes a una densidad de 2×10^6 células en 10 ml de medio M15 sin LIF. Estas condiciones permiten que las células formen agregados que posteriormente formarán los CE. El cambio de medio en esta etapa se realizó a las 48 h.

C) Etapa 3: Selección de precursores neurales

Una vez que formamos los CE de 4 días, estos fueron sembrados en condiciones adherentes (cajas petri gelatinizadas) con medio M15. A las 24 h se realizó el cambio de medio M15 por medio de selección de precursores neurales (Anexo 1). En estas condiciones se mantuvieron por 7 días con cambio de medio cada 24 h.

D) Etapa 4: Expansión de precursores neurales

Concluida la etapa de selección, los precursores neuronales seleccionados fueron subcultivados en cajas de 24 pozos previamente tratadas con poli-ornitina y fibronectina (Anexo 1). Se sembraron 3×10^6 células en cada pozo. En esta etapa se utilizó medio de expansión de precursores neurales (Anexo 1). Se realizó un cambio de medio a las 48 h y posteriormente cada 24 h hasta el sexto día.

E) Etapa 5: Diferenciación neuronal

En la etapa final no fue necesario subcultivar las células. Se realizó el cambio de medio de expansión utilizando un medio de diferenciación neuronal (Anexo 1).

2. Procedimientos de cultivo celular

A) Lavado de cajas

Las cajas se lavaron con 1 ml de PBS (Anexo 1), previamente temperado a 37°C. El PBS se colocó en las cajas, éstas se agitaron gentilmente y después se aspiró el PBS.

B) Tratamiento adherente en cajas petri

Se pesó la gelatina de piel de porcino y se disolvió en agua desionizada caliente. Una vez disuelta se filtró con membrana de 0.22 μ m. Para gelatinizar las cajas se adicionaron 2 y 4 ml de gelatina de piel de porcino en cajas de 6cm y 10 cm, respectivamente, estas se incubaron a temperatura ambiente durante 2 h. Concluido el tiempo de gelatinización se aspiró la gelatina y las cajas se lavaron con PBS 2 veces.

Las cajas de 24 pozos se trataron por 24 h a 37°C con 250 μ l de poli-l-ornitina al 0.1% disuelta en agua desionizada. Después de retirar la poli-l-ornitina se agregaron 250 μ l de fibronectina (1 μ g/ml) disuelta en agua desionizada y se dejó incubar por 3 h a 37°C. Tanto la poli-l-ornitina como la fibronectina se filtraron antes de usarse con membrana de 0.22 μ m.

C) Cambio de medio

En condiciones adherentes, el cambio de medio se realizó aspirando el medio y agregando medio fresco a las cajas previamente temperado a 37°C.

Para el cambio de medio en la tercera etapa, los CE fueron transferidos a un tubo falcon de 50 ml con una pipeta de 25 ml (pipeta de boca ancha para no dañar los agregados) y se dejaron sedimentar durante 5 minutos. Transcurrido este tiempo, se retiró el sobrenadante y se agregó medio fresco previamente temperado.

D) Subcultivos

Para realizar los subcultivos se aspiró el medio de las cajas y se lavaron dos veces con PBS. Para desprender las células se adicionó tripsina al 0.25% (Anexo 1), 500 µl para cajas de 6 cm y 1 ml para cajas de 10 cm y se incubaron a 37°C durante 10 minutos. Posteriormente la tripsina se inactivó con 1ml de medio M15 por la acción del suero contenido en este medio y la suspensión celular se transfirió a un tubo falcon de 15 ml que se centrifugó a 1,000 rpm durante 3 minutos. Una vez formada la pastilla celular, se retiró el sobrenadante y las células se resuspendieron en medio M15 fresco previamente temperado para después ser sembradas en cajas nuevas.

Debido a que los precursores neurales son más susceptibles a la acción de la tripsina, para subcultivarlos se uso este reactivo al 0.05% (Anexo 1) y se inactivó inmediatamente después de observar un desprendimiento de la mayoría de las células adheridas a la superficie de la caja (aproximadamente 5 minutos). La suspensión celular se colocó en un tubo falcon de 15 ml y se dejaron sedimentar los agregados celulares durante 5 minutos. Transcurrido este tiempo, se transfirió el sobrenadante a un tubo falcon de 15 ml y se centrifugó durante 3 minutos a 1,000 rpm. El sobrenadante se desechó y las células se resuspendieron en medio M15 fresco.

E) Descongelación de células

El vial que contenía las células se descongeló en baño maría a 37°C y la suspensión se transfirió a un tubo falcon de 15 ml que contenía 1 ml de medio M15, que después fue centrifugado en las condiciones antes mencionadas. Se retiró el sobrenadante y las células se resuspendieron en medio M15 fresco para ser sembradas.

F) Conteo celular para la formación de CE y siembra de precursores neurales

De las suspensiones celulares previas al subcultivo se tomaron 10 µl que fueron mezclados con una parte igual de azul de tripano 1:1. De esta suspensión se tomaron 10 µl que fueron colocados en una cámara de conteo celular y se estimó la cantidad de células en la suspensión total.

3. Inmunofluorescencia y conteo celular

A) Inmunofluorescencia doble para nestina/Lmx1a

Para realizar todos los inmuno marcajes, las células de la 4ta y 5ta etapa fueron fijadas con paraformaldehído al 4% durante 10 minutos.

Las cajas se lavaron con PBS (Anexo 2) 3 veces por 5 minutos cada pozo y se dejaron incubar en solución de bloqueo (Anexo 2) 1 h, posteriormente, se dejaron incubar con anticuerpo primario anti-nestina hecho en ratón en una dilución 1:200, toda la noche a 4°C. Al día siguiente se lavaron en PBT (Anexo 2) 3 veces 5 minutos. Posteriormente se dejaron incubar en anticuerpo secundario anti-ratón hecho en cabra con emisión en rojo (Alexa 555), en una dilución 1:1,000 2 h a temperatura ambiente. Se lavó con PBS 3 veces 5 minutos cada pozo y se dejó incubar con el anticuerpo primario anti-Lmx1a hecho en conejo a una dilución 1:1,000, toda la noche a 4°C. Pasando este periodo, se lavó nuevamente con PBT (Anexo 2), 3 veces 5 minutos y se dejó incubar con el anticuerpo secundario de anti-conejo hecho en cabra con emisión en rojo lejano (Alexa 647). Finalmente, se lavaron con PBT 3 veces 5 minutos. Para la tinción de núcleos las muestras se incubaron 10 minutos con DAPI 1:10,000 (Anexo 2) durante 10 minutos y después se lavó 3 veces con PBS.

B) Inmunofluorescencia para TH

La caja de 24 pozos de las líneas NesE-Lmx1a y R1B5 en la 5ta etapa del protocolo de diferenciación fueron sometidas a un lavado con PBS 3 veces por 5 minutos con el fin de eliminar el medio de diferenciación. Posteriormente, se colocó solución de bloqueo por 2 h. Al término de este tiempo se adicionó anticuerpo primario de anti-TH hecho en conejo en dilución 1:2,000 y se dejó incubar toda la noche a 4°C. Al día siguiente se lavaron las cajas con PBS 3 veces por 10 minutos, después, se colocó el anticuerpo secundario anti-conejo hecho en cabra en dilución 1:1,000 (Alexa 549) por 2 h. Se lavaron las células con PBS 3 veces por 10 minutos, para finalmente agregar DAPI en una dilución de 1:10,000 por 5 minutos, el cual fue lavado con PBS 1X 3 veces. Para preservar la fluorescencia de los anticuerpos, se mantienen protegidos de la luz, cubriendo las cajas con papel aluminio.

C) Conteo de Células TH+, Nes+ y Lmx1a+

Para determinar la expresión de los distintos marcadores se utilizó un microscopio de epifluorescencia. En éste, se tomaron micrográficas que después fueron analizadas con FIJI, un programa especial de análisis de imágenes. Para los conteos se realizó primero una estimación del número de células tomando como referencia la marca nuclear, después se contaron las células que tenían la doble señal DAPI-Lmx1a-Nes (4ta etapa) o bien DAPI-TH (5ta etapa). De esta forma, se pudo calcular el porcentaje de células que además de tener marcaje para DAPI expresaban alguno de los marcadores. El conteo se realizó en dos cultivos capturando dos campos con el objetivo 20x.

VII. RESULTADOS

1. Comparación morfológica y de crecimiento entre la línea NesE-Lmx1a y la línea R1B5 a lo largo del protocolo de diferenciación de 5 etapas

In vitro, el protocolo de diferenciación de 5 etapas es uno de los más utilizados para derivar neuronas DA a partir de CTEr, sin embargo, la eficiencia es muy baja. Encontramos que tanto la línea NesE-Lmx1a como la línea control R1B5 se comportan de manera muy similar en cada una de las etapas del protocolo de diferenciación. Las células de cada línea forman colonias amorfas en la primer etapa y CE de tamaño adecuado (Fig. 5). Además, se pueden seleccionar precursores neurales Nes+ que se expanden en presencia de mitógenos y que diferencian a neuronas en la última etapa (Fig. 5). Sin embargo, una de las diferencias notorias fue la mayor capacidad proliferativa de la línea NesE-Lmx1a en prácticamente todas las etapas (excepto en la segunda) (Fig. 5). El mayor número de células puede deberse al crecimiento de esta línea por más de una generación en medio 2i (medio M15 con CHIR (CHIR99021) y PDO (PD03259010) empleado para mantener la pluripotencialidad).

2. Expresión de Lmx1a asociada a la expresión de nestina (expresión del transgen)

Los reportes indican que la sobreexpresión de Lmx1a bajo el promotor de nestina aumentan la eficiencia de diferenciación DA *in vitro*, además de favorecer el fenotipo mesencefálico. En este sentido, evaluamos primero si la sobreexpresión de dicho factor de transcripción en la etapa de precursores neurales, era capaz de aumentar la eficiencia de diferenciación DA de la línea NesE-Lmx1a. Específicamente, quisimos determinar si la expresión de Lmx1a en las células modificadas, estaba asociada con la expresión de nestina en la 4ta etapa (expansión de precursores neurales). Para ello, realizamos la fijación de las células al sexto día de la etapa de expansión y efectuamos un doble inmunomarcaje para detectar la co-expresión de nestina y Lmx1a. La expresión de nestina fue similar en las dos líneas, pero la expresión de Lmx1a mostró una marcada diferencia, siendo mucho mayor su expresión en la línea modificada (Fig. 6A y B). Aunque la expresión de Lmx1a estuvo presente en todos los agregados de precursores neurales de la línea R1B5, apenas el 8% (n=3) de las células co-

expresaban los dos marcadores, mientras que en la línea NesE-Lmx1a la expresión se observó en el 95% (n=3) de las células (Fig. 6A y B).

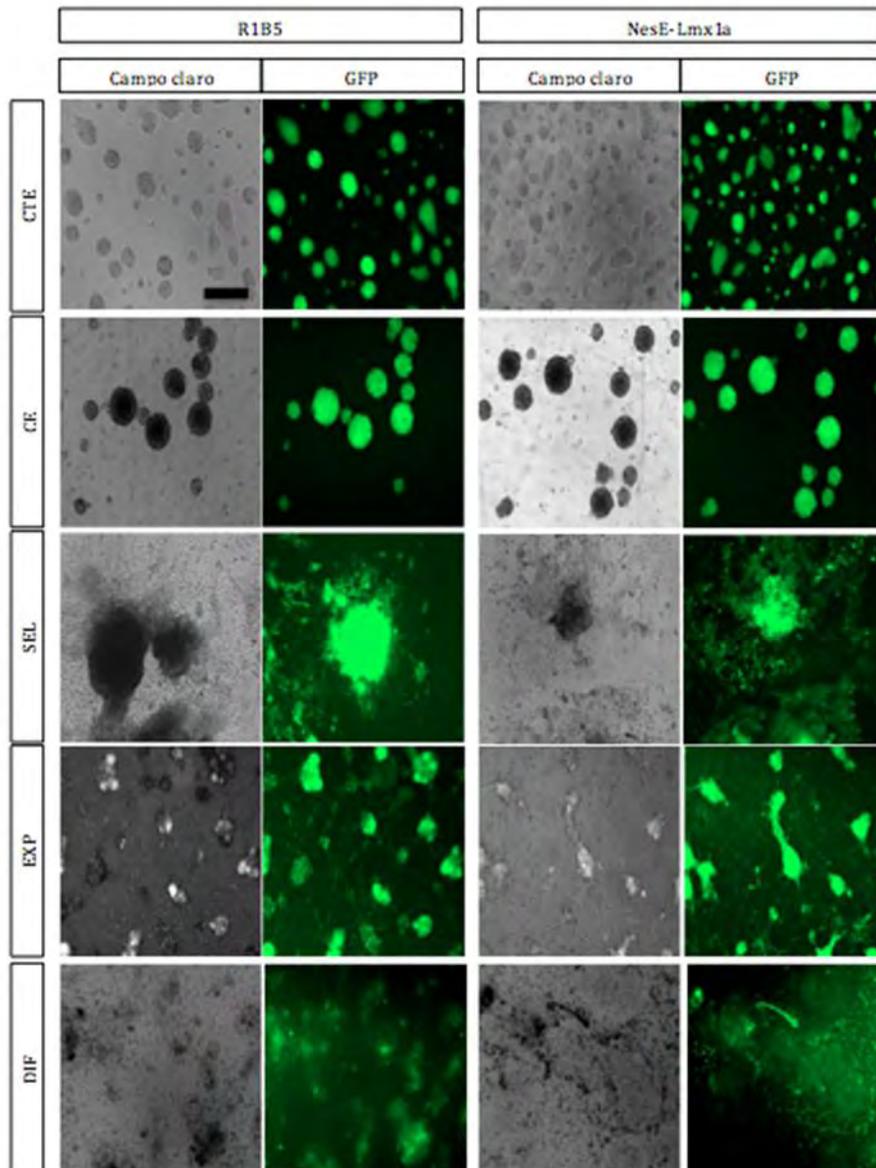


Figura 5. Etapas del protocolo de diferenciación. Comparación de las dos líneas de CTEr en las distintas etapas del protocolo de diferenciación en campo claro y emisión de la GFP. En la primera etapa (CTE), se pueden observar mayor número de colonias aunque de menor tamaño en la línea NesE-Lmx1a. Al parecer es debido a que tienen una tasa de proliferación distinta que la línea control. Micrografías tomadas en microscopía de fluorescencia. Barra de escala = 500 μm .

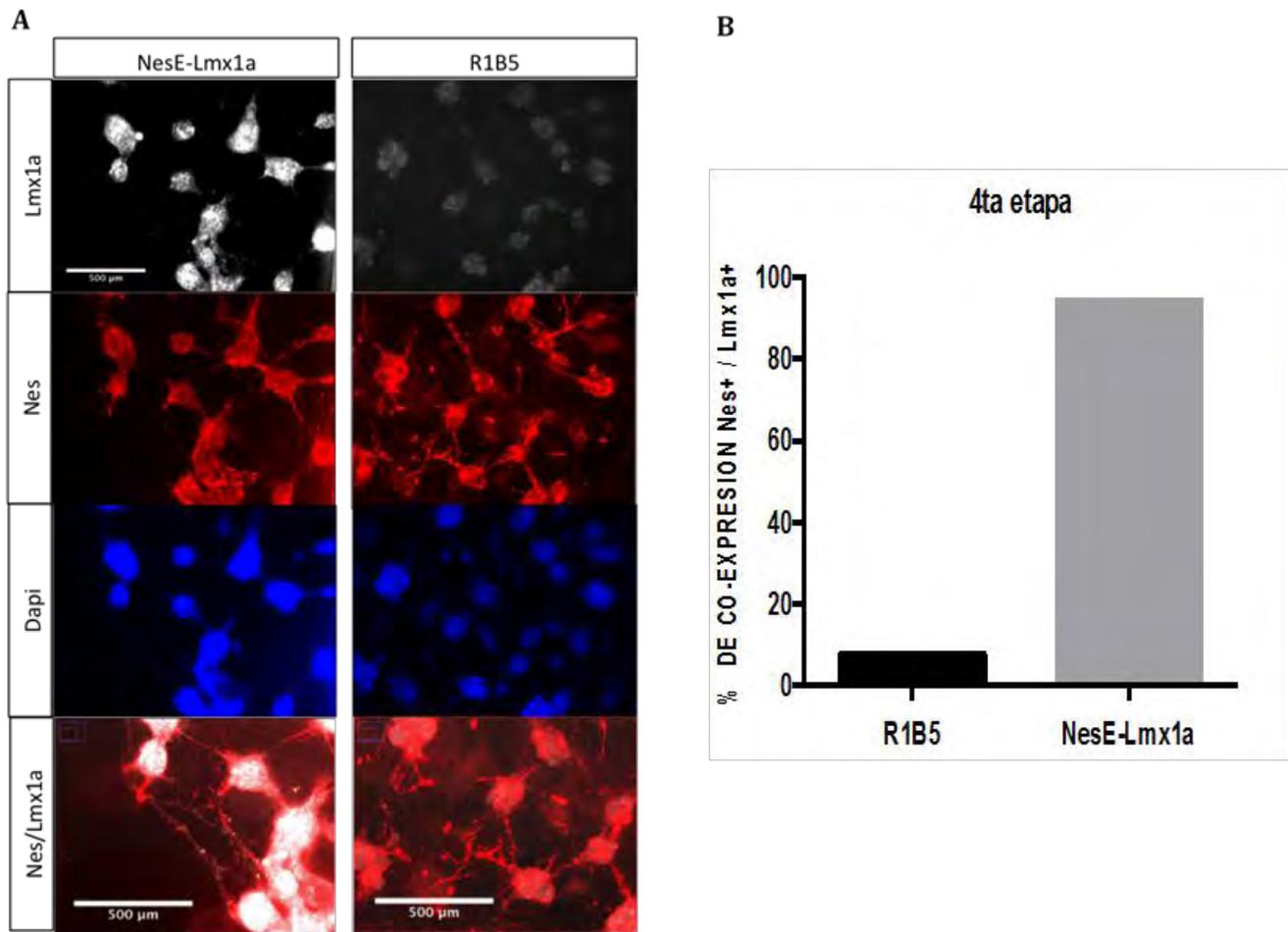


Figura 6. La línea NesE-Lmx1a expresa Lmx1a asociado a la expresión de nestina. (A) El doble inmunomarcaje en la 4ta etapa revela la expresión de Lmx1a (gris) y de nestina (rojo). Aunque la expresión de nestina es similar en las dos líneas (intensidad y número de células), la expresión de Lmx1a es mayor en la línea modificada. La expresión de Lmx1a asociada a la expresión de nestina en la línea control es de apenas el 8% de las células, mientras que en la línea NesE-Lmx1a la expresión se da en el 95% de las células. (B) Gráfica que resume el promedio del porcentaje de co-expresión Nes-Lmx1a de las dos líneas en tres cultivos diferentes. Micrografías tomadas en microscopía de epifluorescencia. Marcaje de núcleos con DAPI con emisión en azul, marcaje de nestina en rojo y Lmx1 en gris (pseudocolor). Barras de escala = 500 μm .

3. La sobreexpresión de Lmx1a aumenta el potencial DA *in vitro* en la línea NesE-Lmx1a

Experimentos realizados en nuestro laboratorio revelaron la capacidad de la SNpc para inducir neurogénesis, sin embargo, esta inducción no es hacia el fenotipo dopaminérgico. Contar con una línea con alto potencial dopaminérgico podría ayudar a contestar si la SNpc es un sitio permisivo a la diferenciación sitio específica. Así, para determinar si Lmx1a en nuestra línea aumentaba la eficiencia de diferenciación DA, fijamos células al término de la 5ta etapa del protocolo e hicimos inmunomarcajes para detectar la expresión de TH. Encontramos que el 38% (n=2) de los grupos celulares de la línea R1B5 contenían células TH+ (Fig. 7A y B), mientras que en la línea NesE-Lmx1a el porcentaje incrementó al 90% (n=2) (Fig. 7A y B). En la línea control el promedio de células TH+ de los grupos celulares cuantificados fue de menos del 4% (n=2) y en la línea modificada del 60% (n=2) (Fig. 7C).

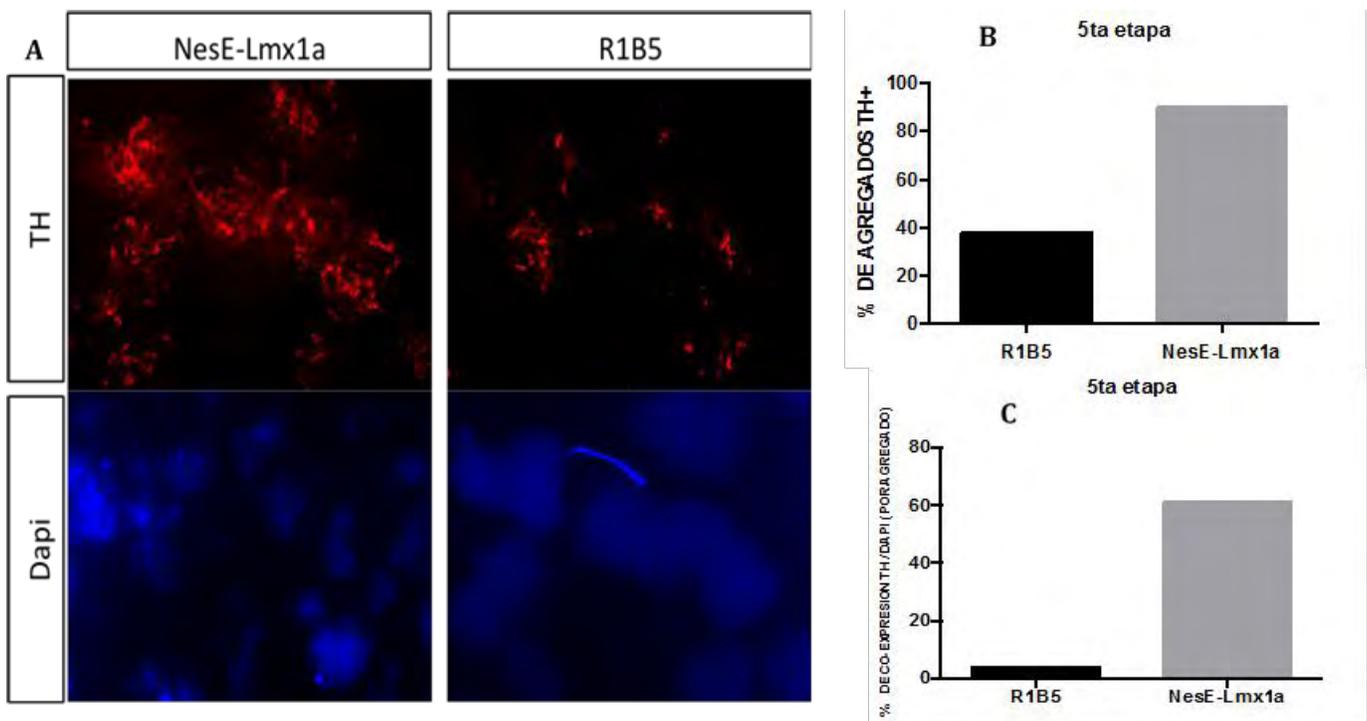


Figura 7. Lmx1a aumenta la eficiencia de diferenciación dopaminérgica *in vitro*. A) Inmunomarcaje en la 5ta etapa para detectar la expresión de TH en cada una de las líneas. Se pueden observar diferencias en la expresión de la enzima TH entre la línea NesE-Lmx1a y la línea R1B5. B) La expresión de TH se observa en el 90% de los grupos de células de la línea modificada mientras que en la línea control solamente se observa en el 38%. C) En la línea modificada, el 60% de las células que forman grupos son TH+ y solamente el 4% de las células en la línea control. Micrografías tomadas en

microscopía de fluorescencia. Marcaje de núcleos con DAPI en color azul, marcaje de TH en rojo. Barra de escala = 500 μm .

VIII. DISCUSIÓN

Debido a las complicaciones que representa el reemplazo farmacológico de la dopamina para tratar la EP, se ha intentado implementar la terapia de reemplazo celular y regenerativa con base en el trasplante de células que puedan servir como fuente del neurotransmisor faltante, o bien para regenerar la vía de neurotransmisión dopaminérgica nigroestriatal. En los primeros intentos de restablecer la neurotransmisión con trasplante celular, se utilizó como fuente tejido embrionario de productos no viables y se aportaron evidencias que colocaron a esta estrategia como prometedora para revertir los síntomas de la EP. Sin embargo, el uso de tejido fetal como fuente para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas tiene implicaciones éticas y problemas técnicos limitantes. Por esta razón, el éxito de la terapia de reemplazo celular para la EP dependerá al menos parcialmente de la estandarización de protocolos de diferenciación DA a partir de CTE que permitan la derivación *in vitro* de neuronas DA con identidad y función adecuadas (Ying *et al.*, 2003). Hasta ahora, los protocolos comúnmente utilizados para diferenciar CTE a neuronas DA tienen eficiencias menores al 10%, además, el fenotipo no es el adecuado (Lindvallet *et al.*, 2004). Una de las maneras en la que se ha intentado aumentar la eficiencia de diferenciación, es a través de la modificación genética de las células indiferenciadas que son sometidas a los protocolos de diferenciación. En este sentido, se han modificado líneas de CTE para la sobreexpresión de uno o más genes. Una de las modificaciones exitosas es la de dirigir la sobreexpresión de *Lmx1a* bajo un promotor temporal que se expresa en precursoras neurales, de esta manera la eficiencia de diferenciación dopaminérgica con identidad mesencefálica es mayor al 60%. A pesar de estos avances en cultivo, una de las preguntas que no se ha resuelto, es si la SNpc es permisiva a la diferenciación específica cuando se realiza un trasplante, o bien, si el SNC es permisivo a la terapia regenerativa utilizando CTE indiferenciadas. En el presente trabajo, evaluamos si la sobreexpresión de *Lmx1a* bajo el promotor de *nestina*, tenía un efecto positivo en el potencial de diferenciación dopaminérgico de una línea de CTEr que expresa de manera constitutiva la GFP. Lo

anterior, con el fin de generar una herramienta que permita evaluar a posteriori, la capacidad de la SNpc en el cerebro adulto de permitir o reprimir la diferenciación DAM.

1. CPN con identidad mesencéflica ventral

Encontramos que la línea que sobre expresa Lmx1a bajo el promotor de nestina se comporta de manera similar a la línea control a lo largo del protocolo de diferenciación de 5 pasos. Se generaron colonias con la misma morfología en la primera etapa, se formaron CE de tamaño similar, respondieron al medio de selección en la tercera etapa y a mitógenos durante la etapa de expansión, y finalmente, presentaron la capacidad de diferenciación a neuronas en la última etapa. Ya que la expresión del transgen es transitoria y se activa hasta la tercera etapa, es normal no encontrar diferencias morfológicas en las primeras dos etapas. Además, Lmx1a actúa mediando procesos de especificación y represión de fenotipos alternos y no debiera afectar el proceso de diferenciación neuronal. Esto explica el comportamiento similar de las dos líneas en las 3 etapas restantes. Aunque no fue evidente alguna diferencia fenotípica o en la capacidad de diferenciar entre las dos líneas, observamos que la tasa de proliferación fue ligeramente mayor en la línea modificada. Esta característica no puede ser relacionada con la expresión del transgén, ya que en la primera etapa éste no se expresa. Para generar la línea transgénica fue necesario amplificar las células por más de dos generaciones en medio adicionado con dos inhibidores de la diferenciación (medio 2i) (Andersson *et al.*, 2006), esto pudo haber modificado la tasa de proliferación de la línea incluso antes de ser transformada.

En teoría, la expresión de Lmx1a debiera ser detectable en los primeros días de la etapa de selección, en la cual las células adquieren la expresión de nestina y además son seleccionadas gracias a las condiciones de cultivo (adherencia y medio selectivo). Sin embargo, en esta etapa es muy difícil llevar a cabo el método de identificación de marcadores por medio de inmunomarcaje, debido al alto índice de muerte celular, heterogeneidad de cultivo y la densidad de los aglomerados celulares. Por ello, llevamos a cabo la detección del factor de transcripción asociado a la expresión de nestina durante la etapa de expansión, encontrando una expresión significativamente mayor en la línea Nes-Lmx1a en comparación con la línea control. Otros experimentos indican que la expresión de

Lmx1a no es resultado solamente de la expresión del transgén, sino que éste tiene la capacidad de activar indirectamente la expresión del gen endógeno y entonces aumentar los niveles de expresión de ese factor de transcripción (Collazo *et al.*, manuscrito en preparación); sin embargo, esto no se ha podido demostrar de forma contundente.

2. Lmx1a promueve la generación de neuronas TH+

El siguiente paso fue evaluar si la sobreexpresión del transgén efectivamente aumenta la eficiencia de diferenciación DA de la línea NesE-Lmx1a. Para esto, realizamos la detección de TH, uno de los marcadores más utilizados para identificar células DA. En la última etapa se forman grupos de neuronas muy bien definidos y que son producto tanto de la agregación celular como, posiblemente, de los últimos eventos de división que se dan antes de la diferenciación neuronal. El inmunomarcaje reveló que apenas el 38% de los agregados de la línea R1B5 tiene células TH+, mientras que en la línea transgénica el porcentaje es del 90%. Además, el promedio de células TH+ contenidas es apenas del 4% en la línea control y del 60% en la línea Nes-Lmx1a. Lmx1a es un factor de transcripción que puede promover la especificación y diferenciación DAm, además de suprimir fenotipos alternativos. Lo anterior no quiere decir que afecte el potencial de diferenciación neuronal. Se ha postulado que las células neuronales seleccionadas en cultivo pierden de manera progresiva su potencial de generar células DA y que la acción de Lmx1a está relacionada con el mantenimiento de este potencial y con la regulación del proceso de diferenciación, aumentando así el potencial dopaminérgico *in vitro*.

A la fecha no se ha podido establecer el reemplazo celular como tratamiento para la EP debido a factores asociados a la fuente celular utilizada, como son su identidad celular inadecuada y su interacción con el hospedero, lo que a su vez se traduce en baja sobrevivencia, heterogeneidad del trasplante y baja integración funcional. Lo anterior resalta la necesidad de estudios que determinen la capacidad de la SNpc para permitir la diferenciación e integración neuronal. Experimentos realizados en nuestro laboratorio revelaron la capacidad de inducir la diferenciación neuronal de la SNpc catalogándola como un sitio neurogénico silencioso, ya que promueve la diferenciación neuronal de CE (células pluripotentes). Estas células de CE en el cerebro adulto o en el embrión, sólo logran la

neuralización cuando se trasplantan en nichos con capacidades neurogénicas (ejemplo: la línea media del MV de embrión o la zona ZSV de los ventrículos laterales del cerebro postnatal), o bien cuando se promueve un ambiente neurogénico después de una lesión (estriado con daño isquémico) (Maya *et al.*, 2015). El presente estudio, ayudó a caracterizar una herramienta celular que permitirá, en experimentos posteriores, conocer si la SNpc es permisiva a la diferenciación neuronal específica de los precursores neurales con alto potencial dopaminérgico probados aquí *in vitro*; o bien, determinar si existen en esta región del mesencéfalo señales que repriman tal proceso. La respuesta a estos cuestionamientos ayudará a la planeación de estrategias más efectivas que ayuden a establecer la terapia de reemplazo celular en la EP.

IX. CONCLUSIONES

- 1) El protocolo de 5 etapas es eficiente para permitir la diferenciación de las CTEr a neuronas que expresan marcadores mesencéfalicos ventrales.
- 2) Durante el protocolo de diferenciación, la línea NesE-Lmx1a mostró similitud a la línea control en sus parámetros de crecimiento. Por lo menos hasta antes de la 4ta etapa del protocolo, como se esperaba ya que la expresión del transgen es transitoria y se activa hasta la tercera etapa.
- 3) La sobreexpresión de Lmx1a en una línea de CTEr permite la generación de neuronas DA *in vitro*.

X. ANEXO 1. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES PARA CULTIVO

1. Gelatina de porcino al 0.1%

- Se pesó 0.01 gr de gelatina de piel de porcino y aforó a 10 ml con agua desionizada en un tubo falcón.
- Se calentó 5 segundos en horno de microondas.
- Se filtró con membrana de 0.22 micras.

2. Mitomicina C

- La mitomicina es un inhibidor de la división celular muy potente, por lo tanto se usó guantes y cubre bocas para su manipulación.

Para preparar un stock 50X

- A un frasco con 2 mg de mitomicina se le inyectaron 0.5 ml de PBS empleando una jeringa de 1 ml.
- Se disolvió completamente y con una jeringa se tomó la mayor cantidad de líquido posible.
- Se agregó el contenido de la jeringa a 3.5 ml de PBS.

3. Medio M15

Para 500 ml:

- | | |
|---|--------|
| • DMEM | 405 ml |
| • Suero fetal de bovino inactivado (SFB) | 75 ml |
| • Beta-mercaptoetanol (B-MeOH) 100X | 5 ml |
| • Glutamax, penicilina, estreptomina (GPS) 100X | 5 ml |
| • Aminoácidos no esenciales 100X | 5 ml |

- Piruvato de sodio 100X 5 ml

4. Tripsina al 0.25%

- Se utilizó tripsina 10X (2.5%) diluida en verseno

5. Verseno (EDTA 0.02%)

- Se mezclaron 10 mg de EDTA 4Na en 50 ml de PBS. Se esterilizó por filtración con membrana de 0.22 μ m.

6. PBS pH 7.4

- Cloruro de sodio (NaCl) 8 gr
- Na_2HPO_4 1.44 gr
- Fosfato de potasio monobásico, cristal
(KH_2PO_4) 0.24 gr
- Cloruro de potasio (KCl) 0.2 gr
- Se aforó a 1 L con agua desionizada y se pasó por un papel filtro.
- Para obtener el pH deseado, se ajustó el pH con ácido clorhídrico (HCl) 1 N.

7. Factor inhibidor de leucemia (LIF)

- El LIF se diluyó en medio DMEM al 0.1% de albúmina bovina en relación 1:10. Se utilizaron 10 ml de esta solución por cada ml de medio.

8. Medio de selección de precursores ITSF (insulina, selenita de sodio y fibronectina)

Para 50 ml:

- Se utilizaron 5 ml de medio ITSFn de un stock al 100X diluido en DMEM/F12 sin HEPES.

9. Medio de expansión de las CPN

Para 25 ml:

•DMEM/F12 sin HEPES	23.961 ml
•N2 100X	250 µl
•GPS 100X	250 µl
•Fgf8 (factor de crecimiento de fibroblastos 8)1ng/ml	500 µl
•Fgf2 (factor de crecimiento de fibroblastos 2)1ng/ml	12.5 µl
•Sonic hedgehog 25 ng/ml	1.25 µl
•Laminina 0.85 µg	25 µl (se adicionó al último)

10. Medio de diferenciación de CPN a neuronas DA

Para 25 ml:

•DMEM F12 sin Hepes	24.220 ml
•N2 100X	250 µl
•GPS 100X	250 µl
•Laminina 0.85 µg/ul	29.41 µl
•Ácido ascórbico 10 mM250 µl	

XI. ANEXO 2. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES PARA INMUNOFLUORESCENCIA

1. Solución de bloqueo

- Suero fetal de burro (SFB) 1 ml
- Tritón X-100 0.3 ml

Se aforó con PBS a 10 ml

2. PBT (solución amortiguadora de fosfatos)

- PBS 100 ml
- Tritón X-100 0.3 ml

Se aforó a 100 ml de agua desionizada.

XII. BIBLIOGRAFÍA

1. Alonso, CM. (2008). Evolución del blastocisto del ratón. Mecanismos de especificación de los primeros linajes. Tesis de doctorado. Universidad Autónoma de Madrid. Madrid, España.
2. Altman, J. (1965). Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *Neurology* 124:319-35.
3. Altman, J. (1969). Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. 3. Dating the time of production and onset of differentiation of cerebellar microneurons in rats. *Neurology* 136:269-93.
4. Alves dos santos, MT., Smidt, M P. (1997). En1 and Wnt signaling in midbrain dopaminergic neuronal development. *Neural Development* 6:1-23.
5. Andersson, E., Tryggvason, U., Deng, Q., Friling, S., Alekseenko, Z., Robert, B., Perlmann, T., Ericson, J. (2006). Identification of intrinsic determinants of midbrain dopamine neurons. *Cell* 124:393-405.
6. Ang, S. (2006). Transcriptional control of midbrain dopaminergic neuron development. *Development* 133:3499-3506.
7. Arias-Carrión, O., Olivares-Bañuelos, T., Drucker-Colín, R. (2007). Neurogénesis en el cerebro adulto. *Neurology* 9:541-550.
8. Arpa Gutierrez, J., Vivancos Matellano, F. (2004). Tratamiento de la enfermedad de parkinson. *Informacion terapeutica del Sistema Nacional de Salud* 3:57-69.
9. Beltram, AP., Barlucchi, L., Torella, D., Baker, M., Limana, F., Chimenti, S., Kasahara, H., Rota, M., Musso, E., Urbanek, K., Leri, A., Kajstura, J., Nadal-Ginard, B., Anversa, P. (2003). Adult cardiac stem cells are multipotent and support my cardiac regeneration. *Cell*. 6:763-76.
10. Beltrami, A., Barucchi, L., Torella, D., Baker, M., Limana, F., Chimenti, S., Kasahara, Hideko. (2003). Adult Cardiac Stem Cells Are Multipotent and Support Myocardial Regeneration. *Cell* 114:763-776.

11. Björklund, A., Dunnett, S. (2007). Dopamine neuron systems in the brain: an update. *Science direct* 30:194-202.
12. Bolós, M., Yanling, H., Kaylene, M. Y., Lisa, F., David, H. (2014). Neurogenin 2 mediates amyloid- β precursor protein-simulated neurogenesis. *The journal of biological chemistry* 289:31253-31261.
13. Bustamante, E Z. (2000). El sistema nervioso. Colombia. Editorial Universidad de Antioquía. 36-49.
14. Cai, j., Donaldson, A., Yang, M., German, M., Enikolopov, G., Iacovitti, I. (2009). The role of *lmx1a* in the differentiation of human embryonic stem cells into midbrain dopamine neurons in culture and after transplantation into a parkinson's disease model. *Stem cells* 27:220-229.
15. Carballo-Molina, O A. (2011). Terapia de remplazo celular en ratas neonatas carentes de neuronas dopaminérgicas. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. D.F.
16. Chung, S., Sonntag, KC., Andersson, T., Bjorklund, LM., Park, J J., Kim, D W., Kang, UJ., Iacson, O., Kim, K S. (2002). Genetic engineering of mouse embryonic stem cells by *Nurr1* enhances differentiation and maturation into dopaminergic neurons. *Eur. J. Neurosci* 16:1829-1838.
17. Copp, A J., Brook, F A., Estibeiro, J P., Shum, AS., Cockroft, D L. (1990). The embryonic development of mammalian neural tube defects. Elsevier. 35:363-403.
18. Dauer, W., Przedborski, S. (2003). Parkinson's Disease, Mechanisms and models. *Cell Press* 39:889-909.
19. Diagnóstico y tratamiento de la enfermedad de parkinson inicial y avanzada en el tercer nivel de atención. (s.f). Recuperado el 20 de Enero de 2016. www.cenetec.salud.gob.mx.
20. Doss, MX., Koehler, C I., Gissel, C., Hescheler, J., Sachinidis, A. (2004). Embryonic stem cells: a promising tool for cell replacement therapy. *Cell Mol Med* 8:465-473.
21. Echelard, Y., Epstein, DJ., St-Jacques, B., Shen, L., Mohler, J., McMahon, J A., McMahon, A P. (1993). Sonic hedgehog, a member of a family of putative signaling molecules is implicated in the regulation of CNS polarity. *Cell* 7:1417-1430.

22. Elkabetz, Y., Panagiotakos, G., Al Shamy, G., Socci, N. D., Tabar, V., Studer, L. (2008). Human ES cell-derived neural rosettes reveal a functionally distinct early neural stem cell stage. *Genes Dev* 22:152-65.
23. Emsley, J G., Mitchell, B D., Kempermann, G., Macklis, J D. (2005). Adult neurogenesis and repair of the adult CNS with neural progenitors, precursors and stem cells. *Progress in neurobiology* 75:321-341.
24. Eynard, A., Valentich, M A., Robasio, R A. (2008). *Histología y embriología del ser humano / bases celulares y moleculares*. Buenos Aires. Médica Panamericana. Cuarta Edición. 331-340.
25. Fathi, A., Rasouli, H., Yeganeh, M., Salekdeh, G. H., Baharvand, H. (2014). Efficient Differentiation of Human Embryonic Stem Cells Toward Dopaminergic Neurons Using Recombinant LMX1A Factor. *Mol Biotechnol* 57:184-194.
26. Ferraris-Gomez, ME., Muñoz, C A. (2009). *Histología, embriología e ingeniería bucodental*. Madrid, España. Editorial panamericana. Tercera edición. 40-45.
27. Fox, I J., Daley, G Q., Goldman, S A., Huard, J., Kamp, T J., Trucco, M. (2014). Use of differentiated pluripotent stem cells in replacement therapy for treating disease. *Science* 345:419-425.
28. Friling, S., Andersson, E., Thompson, L H., Jönsson, ME., Hebsgaard, J B., Nanou, E., Alekseenko, Z., Marklund, U., Kjellander, S., Volakakis, N., Hovatta, O., El Manira A., Björklund, A., Perlmann, T., Ericson, J. (2009). Efficient production of mesencephalic dopamine neurons by Lmx1a expression in embryonic stem cells. *PNAS* 116:7613-7618.
29. Furlan, M M. (2004). *Diferenciación de células troncales embrionarias a neuronas dopaminérgicas*. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D. F.
30. Gilbert, SF. (2003). *Biología del desarrollo*. Montevideo, Uruguay. Editorial panamericana. Séptima edición. 421-424.
31. Gottlieb, D. (2002). Large-scale sources of neural stem cells. *Neuroscience* 25:381-407.
32. Gotz M y Huttner WB. (2005). The cell biology of neurogenesis. *Nature Rev. Mol. Cell Biol* 6:777-788.

33. Gould, E. (2007). How widespread is adult neurogenesis in mammals? *Neuroscience* 6:481-8.
34. Guerra-Crespo, M., De la Herrán-Arita, AK., Hernández-Cruz, A.,Bargas, J., Drucker-Colín, R. (2011). Cell Therapy for Parkinson's Disease: Failure or Success? *Stem Cells in Clinic and Research*. 297-328.
35. Guerrero, F G. (2009). Determinación del potencial de diferenciación neuronal de células troncales embrionicas en el telencéfalo y romboencéfalo embrionarios. Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México. Cuernavaca, Morelos.
36. Guzman, F F., Solís, P J. (2006). Las células madre totipotenciales. Recuperado de la gaceta Biomédicas 8:13-18.
37. Hirabayashi, Y., Gotoh, Y. (2010). Epigenetic control of neural precursor cell fate during development. *Neuroscience* 11:377-388.
38. Hynes, M., Porter, JA., Chiang, C., Chang, D., Tessier-Lavigne, M., Beachy, PA., Rosenthal, A. (1995). Induction of midbrain dopaminergic neurons by Sonic hedgehog. *Neuron* 15:33-44.
39. Hynes, M., Rosenthal, A. (1999). Specification of dopaminergic and serotonergic neurons in the vertebrate CNS. *Curr. Opin. Neurobiol* 9:26-36.
40. Jianrong,Li., Judith, C., Lin, Hong, Wang., James, W. Peterson.,Barbara, C. Furie., Bruce Furie, Sara. L. Booth, Joseph. J., Volpe, and Paul A. Rosenberg. (2003). Novel Role of Vitamin K in Preventing Oxidative Injury to Developing Oligodendrocytes and Neurons. *The Journal of Neuroscience* 13:5816-5826.
41. Kadkhodaei,B., Ito, T.,Joodmardi, E.,Mattsson,B., Rouillard,C.,Carta, M., Muramatsu, S., Sumi-Ichinose,C., Nomura, T., Metzger, D., Chambon, P., Lindqvist, E., Larsson, NG., Olson, L., Björklund, A., Ichinose, H., Perlmann, T. (2009). Nurr1 Is Required for Maintenance of Maturing and Adult Midbrain Dopamine Neurons. *The Journal of Neuroscience* 15923:15932-1592.
42. Kawasaki, H., Mizuseki, K., Kaneko, S., Kuwana, Y., Nakanishi, S., Nishikawa, S., Sasai, Y. (2000). Induction of Midbrain Dopaminergic Neurons from ES Cells by Stromal Cell-Derived Inducing Activity Cell press. *Neuron* 28:31-40.

43. Kele, J., Simplicio, A., Mira, H., Guillemot, F., Arenas, E., Ang, S. L. (2005). Neurogenin 2 is required for the development of ventral midbrain dopaminergic neurons. *Development* 133:495-505.
44. Kim, JH., Auerbach, J. M., Rodriguez-Gomez, JA., Velasco, I., Gavin, D., Lumelsky, N., Lee, S. H., Nguyen, J., Sanchez-Pernaute et al. (2002). Dopamine neurons derived from embryonic stem cells function in an animal model of Parkinson's disease. *Nature* 418:50-6.
45. Kim, D W., Chung, S H., Tsai, H., Park, J J., Chung., Nam, T., Kang, U J; Isacson, O. (2006). Stromal cell-derived inducing activity Nurr1 and signaling molecules synergistically induce dopaminergic neurons from mouse embryonic stem cells. *Stem Cells* 24:557-67.
46. Koike, M., Sakaki, S., Amano, Y., Kurosawa, H. (2007). Characterization of Embryoid Bodies of Mouse Embryonic Stem Cells Formed under Various Culture Conditions and Estimation of Differentiation Status of Such Bodies. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 4:294-9.
47. Kuijk, WE., Chuva de Sousa Lopes, S M., Geijsen, N., Macklon, N., Roelen, A J. (2010). The different shades of mammalian pluripotent stem cells. *Human reproduction update* 17: 254-271.
48. Lee, Sang-Hun., Lumelsky, N., Studer, L., Auerbach, M., McKay, R. D. (2000). Efficient generation of midbrain and hindbrain neurons from mouse embryonic stem cells. *Nat Biotech* 6:393-405.
49. Lindvall, O., Kokaia, Z., Martinez-Serrano, A. (2004). Stem cell therapy for human neurodegenerative disorders-how to make it work. *Nat Med* 10:42-50.
50. Liu, A., Niswander, LA. (2005). Bone morphogenetic protein signalling and vertebrate nervous system development. *Neurosci* 12:945-54.
51. Marti, E., Bumcrot, D. A., Takada, R., McMahon, A. P. (1995). Requirement of 19K form of Sonic hedgehog for induction of distinct ventral cell types in CNS explants. *Nature* 6529:322-325.

52. Maya, G E., Collazo, N O., Millan, A D., Palomero, R M., Guerrero, F G., Drucker C R., Covarrubias, L., Guerra, C. M. (2015). Cells Reveal Niches that Support Neuronal Differentiation in the Adult Rat Brain. *Stemcells*2:491-502.
53. Millonig, J H., Millen, K J., Hatten, M E. (2000). The mouse Dreher gene *Lmx1a* controls formation of the roof plate in the vertebrate CNS. *Nature* 403:764-9.
54. Nagy, A., Gocza, E., Diaz, E M., Prideaux, VR., Ivanyi, E., Marrkula, M., Rossant, J. (1990). Embryonic stem cells alone are able to support fetal development in the mouse. *Development* 3:815-21.
55. Nieuwenhuys, R., Voogd, J., Van Huijzen, C. (2008). The human central nervous system. Springer, Berlin. Editorial springer. Cuarta edición.177-246.
56. Pankratz, M T., Li, X J., Lavaute, T M., Lyons, E A., Chen, X., Zhang, SC. (2007). Directed neural differentiation of human embryonic stem cells via an obligated primitive anterior stage. *Stem cells* 25:1511-1520.
57. Prakash, N., Wurst, W.(2006). Genetic networks controlling the development of midbrain dopaminergic neurons. *J Physiol* 575:403-410.
58. Pevny, L., Sockanathan, S., Placzek, M., Badge, R. (1998). A role for SOX1 in neural determination. *Development* 125:1967-1978.
59. Pruszak, J., Sonntag, K C., Aung, M H., Sanchez-Pernaute, R., Isacson, O. (2007). Markers and methods for cell sorting of human embryonic stem cell-derived neural cell populations. *Stem cells* 25:2257-2268.
60. Ramón y Cajal S. (1928). Degeneration and regeneration of the nervous system. *J Neurol Psychopathol* 36: 378–379.
61. Rippon A. E. Bishop. (2004). Embryonic stem cells. *Cell Prolif* 37:23-34.
62. Roelink, H., Porter, J A., Chiang, C., Tanabe, Y., Chang, D T., Beachy, P A, Jessell, TM. (1995). Floor plate and motor neuron induction by different concentrations of the aminoterminal cleavage product of sonic hedgehog autoproteolysis. *Cell* 3:445-455.
63. Rosenthal, A., Hynes, M. (1999). Specification of dopaminergic and serotonergic neurons in the vertebrate CNS. *Current Opinion in Neurobiology* 9:26-36.

64. Sánchez-Danés, A., Consiglio, A., Richaud, Y., Rodríguez-Pizà, I., Dehay, B., Edel, M., Bové, J., Memo, M., Vila, M., Raya, A., Izpisua, Belmonte. (2012). Efficient generation of A9 midbrain dopaminergic neurons by entiviral delivery of LMX1A in human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells. *Human Gene Therapy* 1:56-69.
65. Seaberg, MR., Van der Kooy, D. (2003). Stem and progenitor cells: the premature desertion of rigorous definitions. *Trends in Neurosciences* 26:125-131.
66. Secretaría de salud. (2010). Diagnóstico y tratamiento en la enfermedad de parkinson inicial y avanzada en el tercer nivel de atención. México. Recuperado de http://www.cenetec.salud.gob.mx/descargas/gpc/CatalogoMaestro/305_ssa_10_parkinson_3er_nvl/eyr_parkinson.pdf.
67. Silva, P R. (2012). La señalización de angiopoyetinas a través de receptores tie estimula la diferenciación de células troncales neurales obtenidas desde médula espinal de ratón. Tesis de Maestría. Universidad de Chile. Santiago, Chile.
68. Simola, N., Pinna, A., Fenu, S. (2010). Pharmacological therapy of Parkinson's disease: current options and new avenues. *Recent Pat CNS Drug Discov* 3:221-38.
69. Smith, JL., Schoenwolf, G C. (1997). Neurulation: coming to closure. *Trends Neuroscience* 11:510-517.
70. Stern, D C. (2004). Gastrulation from cells to embryo. University College London. Madrid, España. 233-250.
71. Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., Yamanaka, S. (2007). Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell*131:861-872.
72. Thomson, J., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S. S., Waknitz, M., Swiergiel, J J., Marshall, SV., Jones, J. (1998). Embryonic stem cells lines derived from human blastocyst. *Science* 282:1145-1147.
73. Wolpert, L., Jessel, T., Lawrence, P., Meyerowitz, E., Robertson, E., Smith, J. (2007). Principles of development. Editorial panamericana. Tercera edición. Madrid, España. 520-530.

74. Wu, J., Sheng, C., Liu, Z., Jia, W., Wang, B., Li, M., Fu, L., Ren, Z., An, J., Sang, L., Song, G., Wu, Y., Xu, Y., Wang, S., Chen, Z., Zhou, Q., Zhang, YA. (2015). Lmx1a enhances the effect of iNSCs in a PD model. *Stem Cell Research* 1:1-9.
75. Yamanaka, Y., Ralston, A., Stephenson, RO., and Rossant, J. (2006). Cell and molecular regulation of the mouse blastocyst. *DevDyn* 235:2301-2314.
76. Ye, W., Shimamura, K., Rubenstein, J L., Hynes, MA., Rosenthal, A. (1998). FGF and shh singals control dopaminergic and serotonergic cell fate in the anterior neural plate. *Cell* 93:755-766.
77. Ying, QL., Stavridis, M., Griffiths, D., Li, M., Smith, A. (2003). Conversion of embryonic stem cells into neuroectodermal precursors in adherent monoculture. *Nat Biotechnol* 21:183-186.
78. Institute of Cell Therapy. (2004-2013). Recuperado de <http://www.stemcellclinic.com/main-en/klinika/kletochnaya-terapiya/?lang=en>.