



## UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

Caracterización del potencial dopaminérgico de una línea troncal embrionaria humana en un modelo de la enfermedad de Parkinson

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

I.B.Q. Carmen Alejandra Morato Torres

TUTOR PRINCIPAL

Dra. Magdalena Guerra Crespo  
IFC

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dr. Iván Velasco Velásquez  
IFC

Dr. Jesús Santa Olalla Tapia  
UAEM

Ciudad de México. Mayo, 2018

---



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.

Esta tesis fue realizada en el laboratorio AL-201 del Instituto de Fisiología Celular, División de Neurociencias, UNAM, bajo la tutoría de la Dra. Magdalena Guerra Crespo. El autor recibió la beca de maestría CONACYT No. 699541. Para la realización de este trabajo se contó con el donativo de DGAPA-PAPIIT IN207116. Con el apoyo del Programa de Apoyo a los Estudios del Posgrado (PAEP) para la realización de una estancia y un congreso internacional.

# Agradecimientos

A la Dra. Magdalena Guerra que me aceptó y confió en mi aun cuando tenía el tiempo en contra. Que siempre me ofreció consejo, guía, paciencia y conocimiento para poder tomar decisiones en cada paso de la realización de este proyecto...No pude haber tenido una mejor guía.

A la Dra. Herminia Pasantes cuyo sabio consejo me supo indicar el camino adecuado.

A la Bióloga Marcela Palomero Rivero por toda su ayuda, paciencia, esmero y compromiso en la enseñanza de todas las técnicas necesarias para la elaboración de este proyecto.

A la Bióloga Diana Millán Aldaco por la ayuda y compromiso al enseñarme las técnicas de análisis por inmunofluorescencia y técnicas in vitro.

Un agradecimiento especial a Sandra Daniela Rodríguez Montaña de la unidad de histología IFC, UNAM que brindo su ayuda en todas las circunstancias.

A mi mamá que siempre ha estado conmigo, caminando a mi lado toda mi vida. Todo lo que soy y lo que he logrado ha sido gracias a su apoyo, dedicación y paciencia. No tengo palabras para agradecer todo lo que ha hecho por mí.

Al Doctor Antonio Arista Viveros que siempre ha velado por mi salud en todos los aspectos, y me ayudado a recuperarme de todos los problemas que he enfrentado. Sembrando también desde pequeña el gusto por la investigación y ciencias médicas.

A mi tío Alfonso, que siempre me incentivo a seguir y me apoyo todo el camino que he recorrido.

A Joss que ha sido un apoyo incondicional en cada parte de este proceso escuchándome, aconsejándome y preocupándose por mi.

A Emma que se ha convertido en una amiga sincera y permanente en la que siempre podré confiar.

A Paloma y Aura por tantos años de amistad y apoyo en los que siempre han logrado dibujarme una sonrisa en el rostro hasta en los peores momentos.

A Rodrigo y Daniel que más que compañeros de laboratorio los considero mis amigos.

# Índice

Abreviaturas .....	6
Resumen .....	8
Abstract .....	9
<b>1. Introducción .....</b>	<b>10</b>
1.1. La enfermedad de Parkinson. ....	10
1.2. Tratamientos para la (EP). ....	10
1.3. Terapia de reemplazo celular como tratamiento para la EP.....	11
1.4. Las células troncales embrionarias.....	11
1.5. Diferenciación dopaminérgica (DAm) durante el desarrollo embrionario en ratón.....	12
<b>2. Antecedentes .....</b>	<b>15</b>
2.1. Diferenciación de las células troncales embrionarias humanas (CTEh) a neuronas DAm <i>in vitro</i> .....	15
2.2. Generación de las líneas troncales embrionarias H9-LFO y H9-PC .....	17
2.3. La sustancia nigra pars compacta (SNpc) como sitio alternativo de trasplante celular en la EP.....	19
<b>3. Justificación.....</b>	<b>22</b>
<b>4. Objetivos.....</b>	<b>23</b>
4.1. Objetivo general.....	23
4.2. Objetivos particulares.....	23
<b>5. Estrategia experimental.....</b>	<b>24</b>
<b>6. Materiales y Métodos.....</b>	<b>24</b>
6.1. Cultivo celular de CTEh .....	25
6.2. Extracción de fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs) .....	25
6.3. Preparación de células alimentadoras para sembrado de CTEh.....	26
6.4. Descongelación de CTEh en monocapa de células alimentadoras.....	26
6.5. Animales .....	27
6.6. Grupos de estudio .....	27
6.7. Lesión del sistema nigro-estriatal con 6-OHDA.....	27
6.8. Prueba de giro inducida con amfetamina.....	27
6.9. Protocolo de inmunosupresión .....	28
6.10. Trasplante de CTEh en etapa decuerpo embrioide (CE) .....	28
6.11. Obtención y fijación de tejido cerebral .....	28
6.12. Inmunofluorescencia de CE.....	29
6.13. Inmunofluorescencia de tejido cerebral.....	29
6.14. Tinción Fontana-Masson.....	30
6.15. Microscopía de CE y tejido cerebral. ....	30
<b>7. Resultados.....</b>	<b>31</b>
7.1. Estandarización de la técnica manual para cultivo de CTEh .....	31
7.2. Pluripotencia de las colonias H9-LFO y H9-PC.....	33
7.3. Formación de CE. ....	34
7.4. Caracterización de los CE. ....	34
7.5. Comprobación de potencialidad del CE para la formación de diferentes linajes germinales. ....	35
7.6. Trasplante de H9-LOF y H9-PC en la SNpc.....	37
7.7. Formación de rosetas neurales en la SNpc de ratas trasplantadas con la línea H9-LFO .....	38
7.8. Expresión de Otx2 y Lmx1a en trasplantes de H9-LFO. ....	40
7.9. Expresión de doblecortina (DCX) en trasplantes de H9-LFO.....	45
7.10. Diferenciación neuronal a 30 dpt. ....	47

<b>8. Discusión .....</b>	<b>49</b>
<b>8.1. Estandarización del protocolo de cultivo de CTEh. ....</b>	<b>49</b>
<b>8.2. Diferenciación neuronal y DA de la línea H9-LFO implantada en la SNpc. ....</b>	<b>51</b>
<b>9. Conclusiones .....</b>	<b>54</b>
<b>10. Perspectivas .....</b>	<b>55</b>
<b>Apéndice A. Preparación de medios y reactivos.....</b>	<b>56</b>
<b>I. Medio para células alimentadoras.....</b>	<b>56</b>
<b>II. Medio para CTEh .....</b>	<b>56</b>
<b>III. Medio E8.....</b>	<b>56</b>
<b>IV.Preparación de la solución de gelatina al 0.1% .....</b>	<b>56</b>
<b>V. Preparación de mitomicina .....</b>	<b>57</b>
<b>VI. Preparación de bFGF .....</b>	<b>58</b>
<b>VII. Preparación de soluciones de PBS 0.2 y 0.1 M (1L) .....</b>	<b>58</b>
<b>VIII. Paraformaldehído al 4% p/v (1L) .....</b>	<b>58</b>
<b>IX. Soluciones de sacarosa 10, 20, 30% p/v en PBS 0.1 M (1L) .....</b>	<b>58</b>
<b>X. Preparación de PBS para inmunofluorescencia (PBSi, 1L).....</b>	<b>58</b>
<b>Bibliografía.....</b>	<b>60</b>

## Abreviaturas

---

1. 6-OHDA	6-hidroxidopamina
2. A/P	Antero/posterior
3. AADC	Descarboxilasa aromática de L-aminas
4. CA	Células alimentadoras
5. CE	Cuerpo embrioide
6. CP	Cerebro posterior
7. CTE	Células troncales embrionarias
8. CTEh	Células troncales embrionarias humanas
9. CTEr	Células troncales embrionarias de ratón
10. D/V	Dorso/Ventral
11. DA	Dopaminérgicas
12. DAM	Dopaminérgicas mesencefálicas
13. DAT	Transportador de dopamina
14. DCX	Doblecortina
15. Dpp	Días post-pasaje
16. Dpt	Días post-trasplante
17. EN1	Proteína de homodominio Engrail-1
18. EP	Enfermedad de Parkinson
19. FGF2	Factor de crecimiento de fibroblastos 2
20. FoxA2	Caja de horquilla A2
21. FT	Factor de transcripción
22. GAD67	Glutamato descarboxilasa 67
23. Gbx2	Proteína de homodominio GBX-2
24. GFP	Proteína verde fluorescente
25. Lmx1a	Factor de transcripción de Homocaja LIM alfa
26. MAO	Monoamina oxidasa
27. mCA	Medio de células alimentadoras
28. mCherryFP	Proteína fluorescente rojo cereza
29. MCI	Masa celular interna
30. MES	Mesencéfalo
31. Mpt	Meses post-trasplante
32. Msx1	Homeocaja Msh
33. MV	Mesencéfalo ventral
34. NeuN	Proteína específica para neuronas
35. NM	Neuromelanina
36. Nurr1	Receptor nuclear asociado 1
37. Otx2	Homeocaja de Ortodénticulo 2
38. P	Pase celular
39. Pitx3	Proteína de homodominio pituitario 3
40. rLMX1a	LMX1a recombinante
41. SHH	Sonic Hedgehog
42. SNpc	Sustancia nigra pars compacta
43. tFVM	Tejido fetal ventral mesencefálico
44. TH	Tirosina Hidroxilasa
45. VMAT	Transportador vesicular de monoaminas

46.VTA

Área Ventral Tegmental

## Resumen

---

La enfermedad de Parkinson se caracteriza por la degeneración progresiva de las neuronas dopaminérgicas mesencefálicas de la sustancia *nigra pars compacta*, lo que conlleva a la pérdida del neurotransmisor dopamina y con ello a la aparición de los síntomas motores característicos de la enfermedad como temblor en reposo, inestabilidad postural y bradicinesia. Aunque existen diversos tratamientos, el más empleado es la administración del precursor metabólico de la dopamina, la L-DOPA. Sin embargo, su administración crónica produce discinesias, un efecto secundario motor altamente incapacitante. Es por esto que se ha propuesto el reemplazo de estas neuronas como una opción de tratamiento a largo plazo. Una fuente prometedora de neuronas dopaminérgicas mesencefálicas es la de células troncales embrionarias humanas, que *in vitro* poseen la capacidad de auto-renovación y de diferenciación hacia ese linaje entre muchos otros. A partir de las células troncales embrionarias es posible iniciar el proceso de diferenciación a través de la formación de cuerpos embrioides, agregados celulares pluripotentes que recapitulan la formación del embrión *in vitro*. Un trabajo previo de nuestro grupo permitió determinar que células provenientes de cuerpos embrioides de células troncales embrionarias de ratón al ser trasplantadas en la SNpc de ratas adultas, tienen la capacidad de responder a la señalización del microambiente y de diferenciarse a neuronas maduras, indicando así que la sustancia *nigra pars compacta*, es permisiva a la diferenciación neuronal, más no a la dopaminérgica. Simultáneamente a este hallazgo, nuestra colaboradora Birgitt Schuele generó la línea de células troncales embrionarias humanas H9-LFO que sobre-expresa 3 factores de transcripción clave en la diferenciación dopaminérgica mesencefálica: Lmx1a, FoxA2 y Otx2, logrando con ello incrementar la eficiencia de generación de neuronas dopaminérgicas mesencefálicas en cultivo. Con estos antecedentes se plantea la cuestión de si estas células trasplantadas en la sustancia *nigra pars compacta* en etapa de cuerpo embriode podrían diferenciarse a neuronas dopaminérgicas mesencefálicas.

En este estudio estandarizamos en el laboratorio el cultivo de la línea H9-LFO y su control H9-PC (no sobre-expresa ningún factor de transcripción) y caracterizamos su diferenciación *in vivo*. Observamos que las células derivadas de cuerpos embrioides (CE) de la línea H9-LFO trasplantadas en la sustancia *nigra pars compacta* de ratas lesionadas con 6-hidroxidopamina, sobreviven e inician un proceso de diferenciación neural. A 7 y 15 días post-trasplante se observó la formación de rosetas neurales que expresan los factores de transcripción Otx2 y Lmx1a, además de doblecortina, marcador de neuroblastos y neuronas jóvenes en migración. El decremento en la expresión temporal de Otx2 y el incremento simultáneo de doblecortina de 7 a 15 días post trasplante señalan un proceso progresivo de diferenciación. Este continúa a 30 días post trasplante donde persiste un aumento en la expresión de doblecortina. Además, el número de rosetas neurales disminuye y se observan mayormente células con morfología de diferenciación. Estas células expresan tirosina hidroxilasa, la enzima limitante en la síntesis de dopamina y, sorprendentemente, también neuromelanina. En contraste, los trasplantes de las células provenientes de la línea H9-PC no sobrevivieron. Estos resultados permiten concluir que la sobre expresión de los tres factores, Lmx1a, FoxA2 y Otx2 en CE derivados de células troncales embrionarias humanas permitió el inicio de la diferenciación DA en la sustancia *nigra pars compacta*.

## Abstract

---

Parkinson's disease (PD) is characterized by the progressive degeneration of the mesencephalic dopaminergic (mDA) neurons located in the substantia nigra pars compacta (SNpc) leading to a loss of the neurotransmitter dopamine, causing the cognitive and motor symptoms typically associated with the disease such as resting tremor, postural instability, and bradykinesia. Although there are different treatment options, the most used is the administration of its metabolic precursor L-Dopa. Nevertheless, its chronic administration produces dyskinesias, a secondary motor effect highly disabling. Therefore, it has been proposed that the replacement of the lost neurons as a long-term option. A promising source of DA mesencephalic neurons are the human embryonic stem cells (hESC) due to its capability of self-renewal and differentiation to this lineage among others *in vitro*. Using hESC it is possible to initiate the differentiation process through the embryoid body (EB) formation, pluripotent aggregates that recapitulate the embryo formation *in vitro*.

Previously, the work of our group allowed to determine that the transplantation of EBs derivate from mouse embryonic stem cells (mESC) in the SNpc of adult rats has the capacity of answering to microenvironmental cues and to differentiate into mature neurons. This indicated that de SNpc is a permissive niche for neuronal differentiation but no to mDA. Simultaneously with this finding, our colleague Birgitt Schuele generated a human embryonic stem cell line (hESC) H9-LFO that overexpress 3 transcriptional factors (TF) keys in the mDA differentiation process: Lmx1a, FoxA2, and Otx2. This genetic modification achieved to increase the generation of mDA neurons efficiency in culture. Thus, we ask if the transplant of EBs can differentiate into mDA neurons in the SNpc.

In this study, we standardized the cell culture technique of the H9-LFO line and its control line H9-PC (with no overexpression of the TF) in our lab and we characterized its differentiation process *in vivo*. We observed that the EB derivate cells of the H9-LFO cell line transplanted in the SNpc of 6-hydroxydopamine (6-OHDA) lesioned rats survive and initiate a differentiation neural process. We appreciate formation of neural rosettes (NR) at 7 and 15 dpt that express the TF Lmx1a and Otx2 furthermore of the neuroblast and young marker doublecortin (DCX). The expression decrement of Otx2 and the simultaneous increase of DCX at 7 to 15 dpt point to a progressive differentiation process. This process continued at 30 dpt when we observed an increase of DCX expression. Furthermore, the NR number decreased and there were mostly cells with morphology of differentiation, and this cell expressed tyrosine hydroxylase (TH), a limited enzyme in the dopamine synthesis and surprisingly, neuromelanin. In contrast, the transplant derived from the EBs of the H9-PC control line did not survive, consequently, we concluded that the overexpression of the 3 TF; Lmx1a, FoxA2, and Otx2 in the EBs derivate from hESC allowed to start the DA differentiation process in the SNpc.

# 1. Introducción

---

## 1.1. La enfermedad de Parkinson.

La enfermedad de Parkinson (EP) es un trastorno neurodegenerativo del sistema nervioso central (SNC), que se caracteriza por la muerte de las neuronas dopaminérgicas (DA) mesencefálicas (DAm) de la Sustancia Nigra *pars compacta* (SNpc) (Kobl B., Whishaw 2006). Como consecuencia se presentan los síntomas motores característicos de la EP como temblor en reposo, rigidez, bradicinesia e inestabilidad postural y los no motores como alteraciones sensoriales, trastornos de sueño, somnolencia diurna, disfunciones gastrointestinales y dificultad para realizar tareas finas (Kobl, B., Whishaw 2006).

En México, la EP tiene una incidencia anual de entre 40 y 50 casos por cada 100,000 habitantes (Cervantes-Arriaga *et al.*, 2013), lo que la coloca como la cuarta causa de consulta en el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía en México. A nivel mundial, se estima una prevalencia de entre 4.1 a 4.6 millones en personas mayores de 50 años. Asimismo, se calcula que para el año 2030, debido al incremento en la tasa de sobrevivencia, esta cifra será duplicada, por lo cual la EP se considera un problema de salud pública (Cervantes-Arriaga *et al.*, 2013).

## 1.2. Tratamientos para la EP.

Los tratamientos actuales tienen como objetivo mejorar la capacidad funcional motora del paciente. Sin embargo, no modifican la historia natural de la enfermedad. Estos tratamientos se clasifican en farmacológico y quirúrgico, siendo la administración de Levo 3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA) el más empleado como tratamiento farmacológico (Rangel-barajas, y Claudia Flóran-Garduño 2005).

La L-DOPA es un precursor de la dopamina que se convierte en dopamina mediante la acción de la enzima L-DOPA descarboxilasa. Al igual que la dopamina endógena, esta ejerce su efecto activando los receptores D1 y D2 en el estriado, por lo que constituye un mecanismo de acción por reemplazo. Para evitar su degradación antes de alcanzar el SNC, la L-DOPA se administra con inhibidores de la L-DOPA-descarboxilasa como la carbidopa

(Rangel-Barajas y Claudia Flóran-Garduño 2005). Desafortunadamente, el uso crónico de L-DOPA da como resultado numerosos efectos adversos, de entre los cuales, las discinesias (movimientos involuntarios exacerbados) son los más incapacitantes (Rangel-Barajas, y Claudia Flóran-Garduño 2005). Esto ha expuesto la necesidad de encontrar un tratamiento que disminuya o anule los síntomas motores a largo plazo sin los efectos secundarios derivados del reemplazo farmacológico.

### **1.3. Terapia de reemplazo celular como tratamiento para la EP.**

La terapia celular en el contexto de la EP tiene como fundamento brindar a los pacientes un alivio sintomático a largo plazo, al trasplantar células liberadoras de dopamina para que puedan restablecer los niveles de este neurotransmisor. En sus inicios se experimentó con diferentes fuentes celulares como la medula adrenal, el epitelio de retina, las células ganglionares y el tejido fetal ventral mesencefálico (tFVM). Las células provenientes del tFVM lograron disminuir en un 70% las alteraciones motoras (Perlow *et al.*, 1979) en un modelo murino de la EP establecido por Ungerstedt 1968 (Ungerstedt 1968). Por otra parte, en los ensayos clínicos en los cuales se trasplantó tFVM en el estriado de pacientes con EP, se observó sobrevivencia, proyección axonal en el estriado y mejoras motoras en algunos pacientes por más de una década después de la intervención (Freed *et al.*, 2001). Sin embargo, los resultados obtenidos carecían de reproducibilidad (Freed *et al.*, 2001; Olanow *et al.*, 2003), además de que algunos pacientes (12.5 %) presentaban efectos adversos (ej. discinesias) (Politis y Lindvall 2012). Si bien se ha avanzado en el conocimiento para lograr trasplantes más eficientes empleando este tejido, su utilización clínica de rutina en la EP impondría dilemas éticos, de accesibilidad a la fuente y heterogeneidad en las células trasplantadas (Gaillard y Jaber 2011), por lo que uno de los objetivos actuales en la terapia de reemplazo celular es encontrar otra fuente celular tan efectiva como el tFVM sin las problemáticas que este conlleva.

### **1.4. Las células troncales embrionarias**

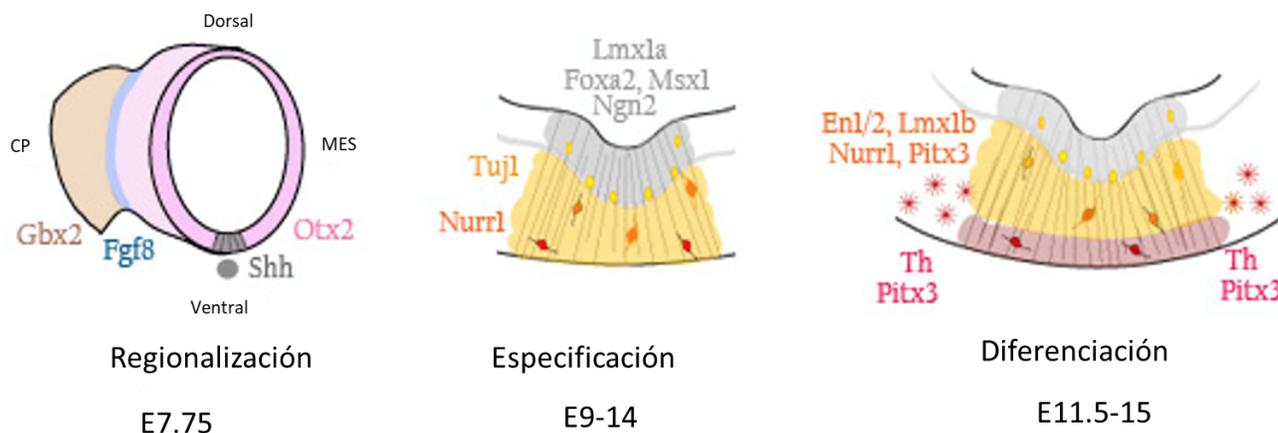
Desde su obtención por primera vez en 1998, las células troncales embrionarias humanas (CTEh) se han considerado una fuente promisorias para la terapia de reemplazo celular en el contexto de la EP debido su capacidad de auto-renovación y potencial de diferenciación (Thomson *et al.*, 1998). Las CTEh pueden llevar a cabo una proliferación

celular sin pérdida de potencial de diferenciación ni senescencia (Chaddah *et al.*, 2012) y así constituir una fuente celular ilimitada (Freed, Zhou, y Breeze 2011), además, de tener la capacidad de diferenciarse hacia un linaje dopaminérgico mesencefálico *in vitro* (Kriks *et al.*, 2011). Estas células son aisladas de la masa celular interna (MCI) del blastocisto y tienen capacidad de pluripotencia lo que implica que pueden contribuir a las tres capas germinales (mesodermo, endodermo y ectodermo), que se forman durante el desarrollo a través del proceso denominado gastrulación, en el que las células en proliferación se distribuyen en capas donde cada una formará determinados órganos y tejidos del organismo en desarrollo (Jargin 2010), entre ellos el sistema nervioso.

La producción de neuronas dopaminérgicas del cerebro medio (DAm) a partir de CTEh en cultivo, ha sido un área de continua mejora, siempre tratando de obtener una mayor eficiencia de diferenciación. Aunque existen diversas metodologías para este fin, todas se apoyan en investigaciones en torno al desarrollo embrionario y las señalizaciones que regulan la conversión de las CTEh desde el epiblasto hasta la formación de las estructuras cerebrales y el establecimiento de las poblaciones neuronales DAm (Arenas, Denham, y Villaescusa 2015).

### 1.5. Diferenciación de neuronas DAm durante el desarrollo embrionario en ratón

Las neuronas DAm nacen de la región anterior del istmo organizador y su diferenciación depende de la integración de señales anteroposteriores (AP) y dorsoventrales del istmo (DV) (Hegarty, Sullivan, y O’Keeffe 2013).



**Figura 1. Esquema de la formación de neuronas DAm durante el desarrollo embrionario de ratón.** Regionalización del tubo neural, proceso en el que se establece la identidad tisular mediante señales instructivas de SHH (Sonic Hedgehog) y

Fgf8 (Factor de crecimiento fibroblastoide 8), que dan lugar a la notocorda (circulo gris) y a la frontera rombo-mesencefálica (azul) mediante la expresión de Otx2 (Homeocaja de Ortodentículo 2) y Gbx2 (Proteína de homodominio GBX-2); rombo encéfalo (CP, cerebro posterior) en café, mesencéfalo (MES en rosa. Esta interacción facilita la respuesta de las células de la línea rombo-mesencefálica para la posterior expresión de genes determinantes de la identidad DAM como Lmx1a (Factor de transcripción de Homeocaja LIM alfa). Especificación, esta ocurre en la zona proliferativa (gris) de la línea ventral medial. Aquí, Msx1(Homeocaja Msh) y FoxA2 (Caja de horquilla A2) promueven la neurogénesis mediante la regulación de Ngn2 (Neurogenina 2) mientras que Lmx1a especifica a un linaje DAM. Mientras que estos progenitores DAM se vuelven post-mitóticos y entran en la zona intermedia (amarillo), empiezan a expresar el marcador neuronal TUJ1 (beta tubulina 3) y subsecuentemente, el regulador del neurotransmisor dopamina Nurr1. y Lmx1b (Factor de transcripción de Homeocaja LIM beta) controlan positivamente la expresión temprana de Pitx3 (Proteína de homodominio pituitario 3) en células Nurr1+ (Receptor nuclear asociado 1). La última etapa en el desarrollo neuronal de neuronas DAM procede mientras las células Pitx3+ y las TH+ migran ventralmente a la zona periférica (roja). Imagen modificada de Gale & Li, 2008 (Gale y Li 2008).

El istmo se forma alrededor del día embrionario (E) 7.5 entre los límites del mesencéfalo y el metencéfalo debido a la acción complementaria entre Otx2 y Gbx2 en el epiblasto anterior y posterior respectivamente (Figura 1) (Wurst y Bally-Cuif 2001; Gale y Li 2008). La proteína Wnt, miembro de una familia de proteínas de señalización (involucradas en las vías transducción de señales que poseen un rol en el desarrollo y diferenciación de las neuronas DAM) (Mulligan y Cheyette 2012) comienza a expresarse del lado Otx2+ (anterior) y Fgf8 del lado Gbx2+ (posterior) formando una imagen en espejo. El Fgf8 (Figura 1 y 2) y Wnt1 (Figura 2) tienen una función directa en el desarrollo de las neuronas DAM estableciendo la identidad y comprometiendo a las células precursoras neurales (CPN) a diferenciar a neuronas DAM (Matsunaga, Katahira, y Nakamura 2002).

A la par de la formación del istmo, SHH es secretado por la notocorda lo que induce la formación de la placa de piso a lo largo del tubo neural (Gale y Li 2008). SHH activa la expresión de FoxA2 (Figura 2, recuadro negro) en la placa de piso y este último a su vez, induce la expresión de SHH en el dominio ventral del mesencéfalo donde actúa como factor de especificación de las CPN (Jeong 2003).

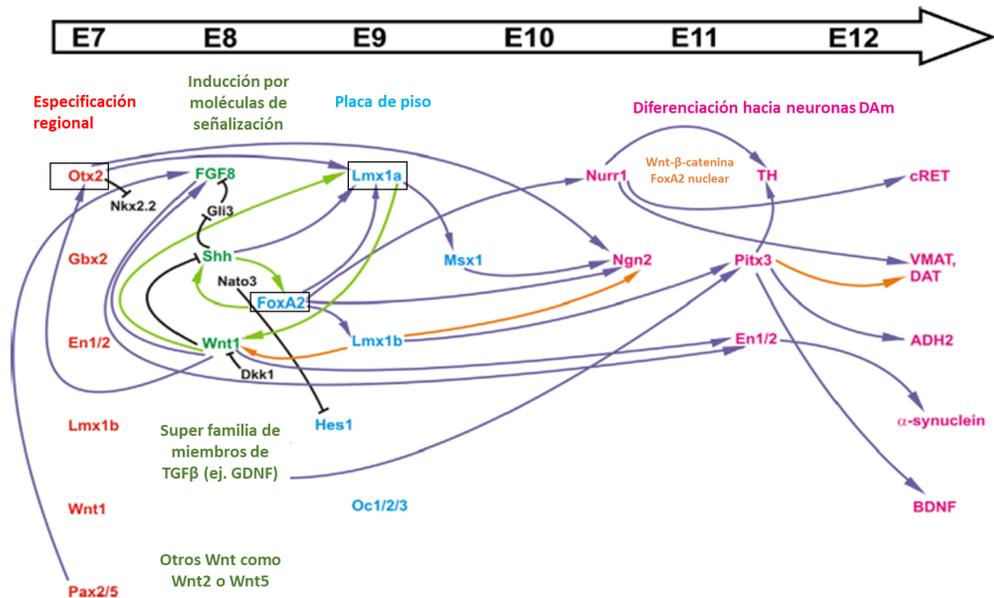
Una característica única de las neuronas DAM es que las CPN se originan en la placa de piso, mientras que en otras regiones del tubo neural, la placa de piso no tiene propiedades neurogénicas (Ono *et al.*, 2007). La generación de las neuronas DAM debe coordinarse con la conversión de células con identidad de placa de piso a progenitores neurales; esta transición esta mediada por la acción de Wnt y activada por Otx2 en el cerebro medio (Ono *et al.*, 2007).

Los factores de transcripción (FT) Lmx1a/Lmx1b (Figura 2) están entre los primeros marcadores que identifican a un precursor DAM y son reguladores clave en su diferenciación. Lmx1a comienza a expresarse alrededor del día E9 y su ausencia causa una reducción en el

número de neuronas DAm (Ono *et al.*, 2007). Por su parte, Otx2 es necesario para la expresión de Lmx1a en la placa de piso (Omodei *et al.*, 2008). FoxA2/1 también es requerido para la inducción y el mantenimiento de la expresión de Lmx1a (Ferri *et al.*, 2007). FoxA2 y Otx2 podrían cooperar para definir la expresión de Lmx1a en los precursores neurales del cerebro medio, mientras que FoxA2 también se encarga de inhibir marcadores fenotípicos alternos (como Nkx2 y Helt) (W. Lin *et al.*, 2009).

Alrededor del día E10.5, Wnt regula a la baja los niveles de SHH, lo que provoca la inducción de Ngn2 (Figura 2), un gen neural cuya expresión marca el inicio de la neurogénesis DAm (Kele *et al.*, 2006). Aparentemente, FoxA1/2 también contribuye a la activación de Ngn2 (Ferri *et al.*, 2007), lo que refuerza esta vía de regulación en la diferenciación DAm.

La neurogénesis es precedida por la expresión de Nurr1 y Pitx3 (Figura 1 y 2), genes que codifican para los FT de neuronas DAm involucrados en la expresión subsecuente de proteínas del fenotipo dopaminérgico como tirosina hidroxilasa (TH; enzima limitante de la síntesis de catecolaminas incluida la dopamina) y DAT (del inglés “dopamine active transporter”) (Smits *et al.*, 2003). Lmx1a y Lmx1b regulan directamente la expresión de Nurr1, Pitx3 y TH. FoxA1/2, en conjunto con Lmx1a también se encarga de regular la expresión de Nurr1 en las neuronas inmaduras, además de activar indirectamente la expresión de TH en las neuronas maduras (Ferri *et al.*, 2007).



**Figura 2. Factores moleculares relacionados con el desarrollo de las neuronas DAM en ratón.** Se muestra la secuencia de aparición (denotada por la flecha temporal) de los diferentes factores de desarrollo dopaminérgico mesencefálico y las interacciones entre ellos (los factores en letras negras están exentos de temporalidad). Las flechas representan el efecto producido: morado = regulación positiva, verde = lazo auto regulatorio, naranja = regulación cooperativa y negro = regulación negativa. Otx2, Gbx2, En1/2, Lmx1b, Wnt1 y Pax2/5 juegan un rol de vital importancia en el establecimiento de las regiones mesencefálicas/rombo encefálicas, así como el organizador del istmo y la placa de piso a través de la inducción de la expresión de FoxA2, Lmx1a/b y Msx1. Dos lazos auto-regulatorios, Shh-FoxA2 y Wnt-Lmx1a, contribuyen a este proceso relacionándose con Hes1 y Lmx1b funcionando cooperativamente con Lmx1a. La expresión de Nurr1 y Otx2 promueven la diferenciación de las CPN a neuronas post-mitóticas. Nurr1 induce la expresión de proteínas que son clave para originar el fenotipo de neuronas DAM. Imagen modificada de Hegarty *et al.*, 2013.

## 2. Antecedentes

### 2.1. Diferenciación de las CTEh a neuronas DAM *in vitro*.

La caracterización de la señalización molecular que controla la generación de neuronas DAM en el desarrollo embrionario ha permitido establecer diversos protocolos de cultivo que tratan de simular la señalización en el ambiente embrionario con el fin de llevar a cabo una diferenciación guiada que permita obtener linajes específicos con alta eficiencia. En torno a esto, se han derivado dos posibilidades generales; la primera, dirigir el proceso de diferenciación mediante moléculas clave en el medio que promuevan la especificación celular hacia un linaje específico usando morfógenos y medios químicamente definidos (Arenas, Denham, y Villaescusa 2015) o sobre-expresar un factor de transcripción determinante para la diferenciación, por ejemplo hacia el linaje de neuronas DAM (Andersson *et al.*, 2006). Con respecto a los medios químicamente definidos, estos usualmente contienen factores de señalización extrínsecos como SHH y Fgf8 que pudieran lograr imitar el ambiente embrionario en el cual las neuronas DAM son generadas. Sin embargo, su mayor

desventaja es que estos mismos son la base para la especificación regional de otros tipos celulares generados en el mesencéfalo y metencéfalo durante el desarrollo del SNC y, por ende además de producir neuronas DAm, los cultivos comúnmente producen en alto porcentaje otros subtipos de neuronas como las GABAérgicas o las serotoninérgicas (Yiping *et al.*, 2009). La presencia de otros tipos celulares en terapia celular causa efectos secundarios severos posteriores al trasplante (Freed *et al.*, 2001). Por lo tanto, una fuente celular heterogénea complica la aplicación terapéutica con CTEh y enfatiza la necesidad de desarrollar nuevos métodos que puedan generar cultivos puros de neuronas DAm.

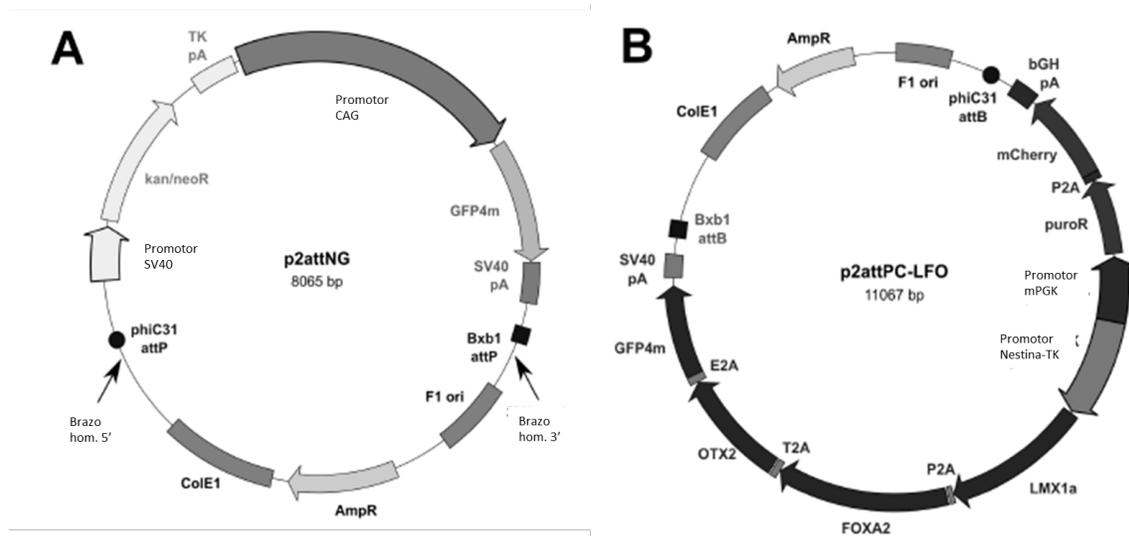
Estudios de ganancia y pérdida de función realizados en embriones de ratón y de pollo determinaron que *Lmx1a* es un FT fundamental en la especificación DAm durante el desarrollo embrionario (Andersson *et al.*, 2006). Además, este estudio demostró que la sobreexpresión de *Lmx1a* inducía la diferenciación DAm *in vitro*. En el año 2006, Andersson y su grupo transfectaron en CTE de ratón (CTEr) un vector de expresión en el que la expresión de *Lmx1a* dependía de la expresión de *nestina* (ya que contenía la secuencia potenciadora “enhancer” para esta), lo que implica su expresión en células troncales neurales (CTN). La expresión de *Lmx1a* en CTN indujo la generación extensiva de neuronas *Msx1/2+*, que expresaban el marcador de linaje neuronal TUJ1 y co-expresaban TH en etapas maduras de diferenciación DAm. Este estudio concluyó que, *Lmx1a* en CTN resulta en la generación de neuronas DAm con una identidad mesencefálica correcta. Años más tarde, empleando un vector de expresión lentiviral similar al de Andersson (dirigido bajo el potenciador de *Nestina*, pero empleando el promotor constitutivamente activo de la fosfoglicerato cinasa (PGK) Friling y su grupo (Friling *et al.*, 2009) demostraron que la sobreexpresión de este mismo FT promovía la generación de neuronas DAm a partir de CTEh, logrando una eficiencia de 50% *in vitro*. Posteriormente, en el año 2012 Sánchez-Danés y su grupo generaron otra línea de CTEh con este mismo FT (*Lmx1a*) transducido por medio de un vector lentiviral empleando el promotor de timidina cinasa (TK) y el potenciador de *nestina*, que posteriormente fue trasplantada en el estriado de ratas adultas. Observaron que algunas células sobrevivieron hasta 5 meses y presentaban expresión de marcadores de neuronas DAm (Sánchez-Danés *et al.*, 2012). Estos resultados reforzaron la idea de dirigir la diferenciación DA por medio de la inserción de un factor de transcripción e indicaron que algunas células DA podían sobrevivir al ser trasplantadas en el estriado. Sin embargo, el nivel de diferenciación DAm obtenido a través de la utilización de un FT es insuficiente para

una terapia de reemplazo celular. Además, la introducción del FT a través de vectores virales imposibilita su aplicación clínica.

## 2.2. Generación de las líneas troncales embrionarias H9-LFO y H9-PC

Con la finalidad de mejorar la eficiencia de diferenciación DAM *in vitro*, la Dra. Birgitt Schuele generó una línea de CTEh que sobre-expresa 3 FT determinantes en la generación del linaje DAM: Lmx1a, Otx2 y FoxA2. Para ello, realizó una modificación más precisa y eficiente de CTEh empleando una estrategia de inserción genética de intercambio dual de casetes mediados por integrasas denominada “DICE” (por sus siglas en inglés “Dual Integrase Casete Exchange”;) (Zhu *et al.*, 2014). Como primer paso se requirió insertar mediante recombinación homóloga espontánea, un plásmido con un “tren de aterrizaje” en el locus H11, localizado en un sitio seguro (región de elementos repetidos no codificantes) intergénico y transcripcionalmente activo en el cromosoma 22, con el fin de generar una expresión robusta y constitutiva de los genes a insertar. Este vector contenía el gen de resistencia a la neomicina para seleccionar las clonas que pudieron integrar este “tren de aterrizaje” y la proteína verde fluorescente (GFP, por sus siglas en inglés), como gen reportero de la expresión en el locus. La construcción estaba flanqueada por sitios attP que proveen los sitios de corte para las integrasas phiC31 y Bxb1, y dos brazos de homología para el reconocimiento e integración del plásmido (Zhu *et al.*, 2014). Por lo que el segundo paso, consistió en el intercambio de este vector a través de “DICE” con el vector donador, que contenía los genes de interés (Otx2, FoxA2 y Lmx1a). Para dirigir la expresión de los FT, se empleó un promotor artificial constituido por el potenciador (“enhancer”) de nestina unido al promotor mínimo de timidina cinasa (TK, Figura 4B) (Arcot, Flemingtons, y Deiningerj 1989). Con este diseño esperaban que los FT se sobre expresaran en la etapa de CPN (nestina +) e identificar su expresión a través de la GFP expresada río abajo de los FT. Para fines de selección y aislamiento, el vector también expresaba constitutivamente los genes de resistencia a la puomicina y de la proteína rojo cereza fluorescente (mCherryFP por sus siglas en inglés) a partir del promotor fuerte (Fosfo-glicerato cinasa (PGK).

A la par de la línea H9-LFO generaron la línea control H9-PC (Figura 4 A) usando la misma estrategia y a partir de los mismos vectores, excepto que el plásmido no contiene los 3 FT y tampoco la GFP. Sin embargo, es posible reconocer a las células a través de la expresión constitutiva de mCherryFP.



**Figura 3. Mapas de los plásmidos del tren de aterrizaje y donador.** **A)** Plásmido p2attNG que incluye un “tren de aterrizaje”, fragmentos attP de phi C31 y Bxb1 donde se unirán los brazos de homología para realizar el intercambio de los plásmidos, también se insertan genes de resistencia a la kanamicina y neomicina para su aislamiento y selección. Una vez llevado el primer paso, se procede a seleccionar las clonas las cuales serán sometidas al intercambio de cassettes. **B)** Plásmido p2attPC-LFO o vector donador que incluye los tres FT Lmx1a-FoxA2-Otx2. El gen GFP4m es una variante de EGFP (mut4EGFP) que exhibe mejor doblamiento a 37°C. E2A, péptido del virus de rinitis equina; P2A péptido del tecovirus porcino-1 2<sup>a</sup>; T2A, péptido del virus *Thosea asigna* 2<sup>a</sup>. Modificado de Zhu *et al.*, 2014.

Como parte de este mismo estudio, se efectuó una comparación del “potencial” de diferenciación DAM entre la línea H9-LFO y su control H9-PC. Como estrategia de diferenciación espontánea emplearon la formación de cuerpos embrioides (CE). Los CE son agregados tridimensionales formados a partir del cultivo de células troncales en suspensión y en ausencia de factores de diferenciación (Gibco 2012). Los CE tienen la capacidad de recapitular el proceso de gastrulación (Sathananthan 2011) que ocurre en el desarrollo embrionario. En consecuencia, este modelo ha sido empleado para inducir el proceso de diferenciación para posteriormente especificar y diferenciar hacia el linaje deseado mediante moléculas de señalización externas. En este caso, la formación de CE se emplea para establecer las características de diferenciación derivada de la inserción de los FT sin el uso de factores de señalización externos que pudieran modificar el destino celular de ambas líneas (Pettinato, Wen, y Zhang 2014).

Como resultado encontraron que los CE derivados de la línea H9-LFO presentaban una expresión del 100% de  $\beta$ III Tubulina oTUU1 en comparación a un 75% de la línea H9-PC. Posteriormente al analizar los CE sembrados y diferenciados durante 15 días en un medio sin factores de diferenciación (E6), observaron una expresión robusta de Lmx1a, FoxA2 y Otx2, mayor a la encontrada en el control. Asimismo, al efectuar el análisis de la TH,

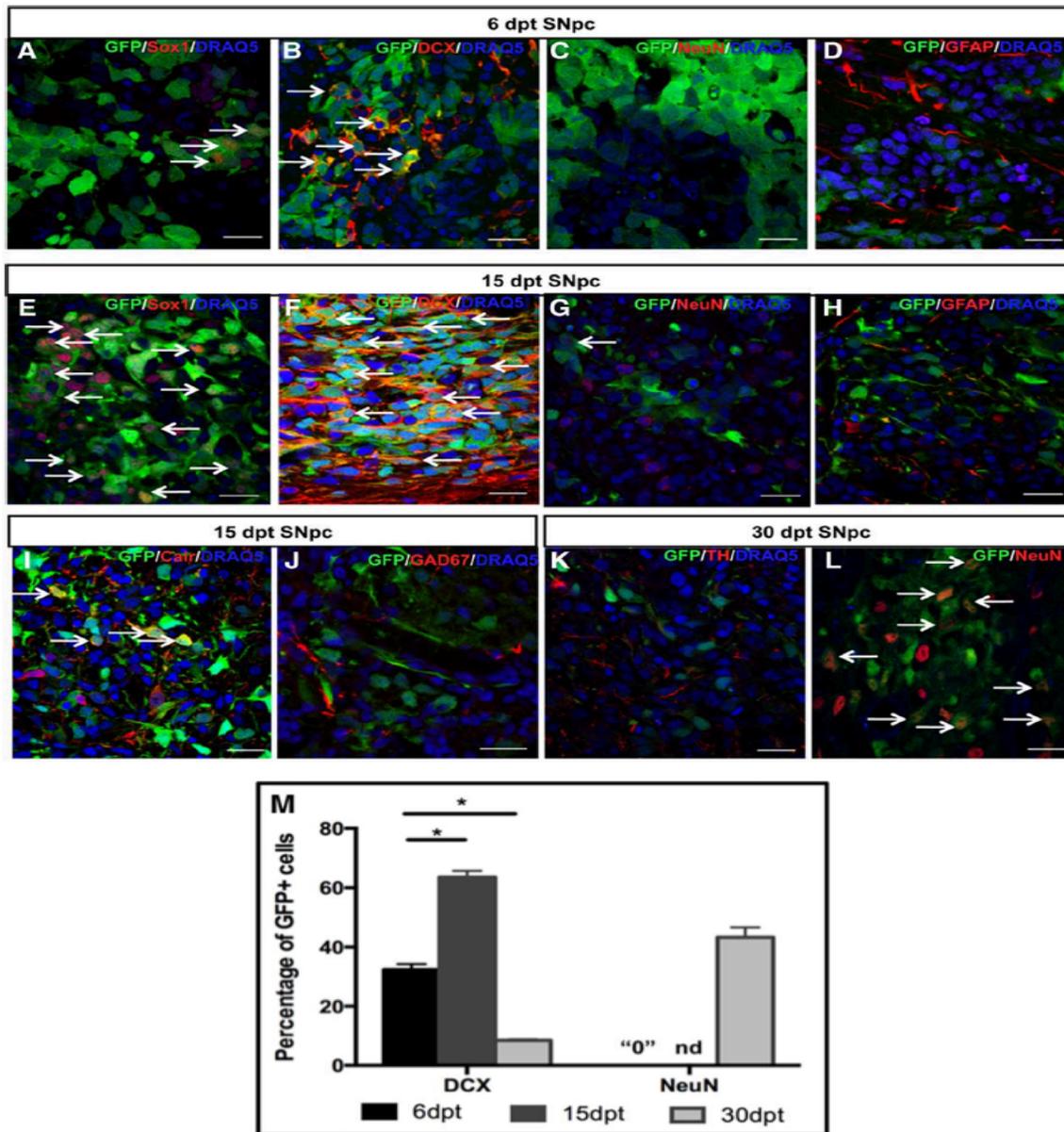
marcador del linaje DAm, observaron mayor expresión de esta enzima en la línea H9-LFO comparada a su control. Paralelamente, encontraron mayor expresión de otros marcadores del fenotipo DAm (PitX3, Calbidina, Girk2 y DAT). En conjunto, estos resultados sugieren una mayor capacidad de diferenciación de la línea experimental hacia un linaje DAm *in vitro* con respecto a su control, lo que representa para nosotros una buena oportunidad para explorar su capacidad de diferenciación *in vivo* en la SNpc, el nicho DAm adulto.

### **2.3. La SNpc como sitio alternativo de trasplante celular en la EP.**

Pese a que en la EP existe una pérdida progresiva de las neuronas DAm de la SNpc, la mayor parte de los esfuerzos hasta la fecha se han concentrado en el trasplante de neuronas DA en el estriado, más específicamente en el núcleo putamen, debido a que esta es la estructura inervada por la SNpc, donde se encuentran los receptores dopaminérgicos D1 y D2, involucrados en la vía motora, que se encuentra espacialmente más cercana a la corteza motora (Freed, Zhou, y Breeze 2011). Ya que, el trasplante en la SNpc requiere la proyección axonal de las neuronas DAm hacia el estriado, esta no parecía ser una buena opción de acuerdo a los resultados obtenidos en algunos estudios (Boronat-García, Guerra-Crespo, y Drucker-Colín 2017). Sin embargo, en el año 2014, Grealish *et al.*, evaluaron la capacidad de restauración de la función motora, proyección axonal y fenotipo de neuronas derivadas de CTEh al ser trasplantadas en la SNpc. Como resultado obtuvieron que estas células desarrollaran proyecciones de hasta 10 mm fuera del núcleo del trasplante del mesencéfalo hacia el prosencéfalo. Esto indicó el potencial de la SNpc para promover el crecimiento axónico (Grealish *et al.*, 2014). Con esta base, nuestro grupo de investigación propuso que la SNpc puede ser un sitio blanco de trasplante en la EP. Para explorar la capacidad de neurogénesis del cerebro adulto se trasplantaron células disgregadas de CE generados a partir de CTEr (Maya-Espinosa *et al.*, 2015) en una zona neurogénica y la SNpc, considerada no neurogénica, y observamos que las células derivadas de los CE eran capaces de sobrevivir y diferenciarse con alta eficiencia a neuronas al ser trasplantados en sitios considerados como neurogénicos (corriente rostral migratoria) pero sorprendentemente, también en sitios considerados no neurogénicos como la SNpc. El análisis de distintos marcadores (en el área rostral migratoria, SNpc y estriado) a 6, 15 y 30 dpt indicó la progresión de la diferenciación hacia el linaje neuronal de la mayoría de las células de CE trasplantadas (Figura 4). De 6 a 15 dpt se observó el incremento de Sox1, marcador de CPN (Figura 4A y E), así como de DCX, marcador de neuroblastos y neuronas

jóvenes (Figura 4B y F) y NeuN, marcador neuronal (Figura 4C y G), Asimismo se observó una minoría de células gliales (GFAP+) (Figura 4D y H) y neuronas GABAérgicas (GAD67+, glutamato descarboxilasa) (Figura 4J) y calretinina+ (interneuronas) (Figura 4I). A 30 dpt se observó un incremento significativo en el número de células NeuN+ (Figura. 4L y M); sin embargo, no se observaron células positivas para TH (Figura 4K). En conjunto, estos resultados indicaron que la SNpc provee un microambiente permisivo a la sobrevivencia y diferenciación neuronal de células derivadas de CE, sin embargo, no al fenotipo dopaminérgico.

Con base en estos resultados, el objetivo del presente proyecto fue determinar si la SNpc era permisiva a la diferenciación DAM de una línea de CTEh con la capacidad de especificarse a ese linaje neuronal por la sobreexpresión de Lmx1a, FoxA2 y Otx2.



**Figura 4. Diferenciación neuronal de CTEr en la SNpc de adulto.** Las células disgregadas de CE fueron trasplantadas en la SNpc de ratas adultas y posteriormente, se evaluó la presencia de marcadores neurales a los 6, 15 y 30 días post-trasplante (dpt). A los 6 dpt pocas células derivadas de CE mostraron expresión de Sox1 (**A**), aunque se encontraron algunos cúmulos de células DCX+ (**B**). No se detectaron células positivas para NeuN (**C**) y no se encontró una diferenciación hacia el linaje glial (**D**). La inducción a la neurogénesis fue percibida a los 15 dpt, etapa en la que muchas células trasplantadas fueron positivas para Sox1 (**E**), aunado a un marcado incremento de células DCX+ (**F**). De acuerdo con una actividad neurogénica en la SNpc, células NeuN+ se detectaron a los 15 dpt (**G**), cantidad que se incrementó considerablemente a los 30 dpt (**L**), mientras que, la diferenciación glial se mantenía ausente (**H**). Se encontraron neuronas positivas para calretina (Calr) (**I**), pero ninguna expresaba GAD67 (**J**) o tirosina hidroxilasa (TH) (**K**). **M.** Cuantificación de las células trasplantadas expresando el marcador DCX a 6, 15 y 30 dpt. Las barras de error representan la desviación estándar (SD) ( $p < 0.001$ ). No se encontraron células NeuN+ a los 6 dpt (0) y el número de las que se encontraron a 15 dpt no fueron determinadas (nd). Las flechas indican células positivas. Barras de escala = 20  $\mu$ m. Abreviaturas: DCX, doblecortina; GFP, proteína verde fluorescente; SNpc, Sustancia Nigra pars compacta. Tomado de Maya-Espinosa *et al.*, 2015

### 3. Justificación

---

Debido a la condición neurodegenerativa crónica en la EP los tratamientos farmacológicos sólo pueden tratar de forma transitoria los síntomas motores de los pacientes, y aun empeorándola en ocasiones. Por su parte y hasta el momento, la terapia de reemplazo celular que ha empleado trasplantes de tFVM ha logrado disminuir las afectaciones motoras en algunos pacientes trasplantados (Freed *et al.*, 2001). Sin embargo, las restricciones éticas del uso de tejido fetal, así como la falta de mejoría en algunos pacientes (Politis y Lindvall 2012) han generado la necesidad de explorar nuevas fuentes celulares y, más recientemente, el estudio de la etapa de diferenciación a la cual son trasplantadas, así como la permisividad del encéfalo para albergar células exógenas. Las CTEh poseen ventajas sobre las fuentes celulares usadas anteriormente tanto para la realización de estos estudios, como para su posible uso en reemplazo celular en la EP.

Hemos mostrado anteriormente que la SNpc cuenta con la señalización microambiental necesaria para permitir la diferenciación neuronal de CE provenientes de CTE, aunque no al linaje DAm. Además, nuestras evidencias también sugieren que el trasplante de células inmaduras pueda presentar mayores posibilidades de sobrevivencia e integración que el implante de células totalmente diferenciadas. Con estos antecedentes, el presente estudio plantea el uso de células en etapa de CE derivadas de CTEh con la capacidad de sobre-expresar 3 FT DAm: Lmx1a, FoxA2 y Otx2, para determinar su diferenciación hacia el fenotipo DAm en la SNpc de ratas adultas lesionadas con 6-OHDA. La hipótesis que se plantea es que la expresión de los factores facilitará el proceso de diferenciación DAm en un microambiente que consideramos permisivo a la diferenciación dirigida como lo fue para la diferenciación neuronal. Este estudio permitirá sentar las bases para proponer mejores enfoques en la terapia celular de la EP y proponer a la SNpc como sitio blanco en dicha terapia.

## 4. Objetivos

---

### 4.1. Objetivo general.

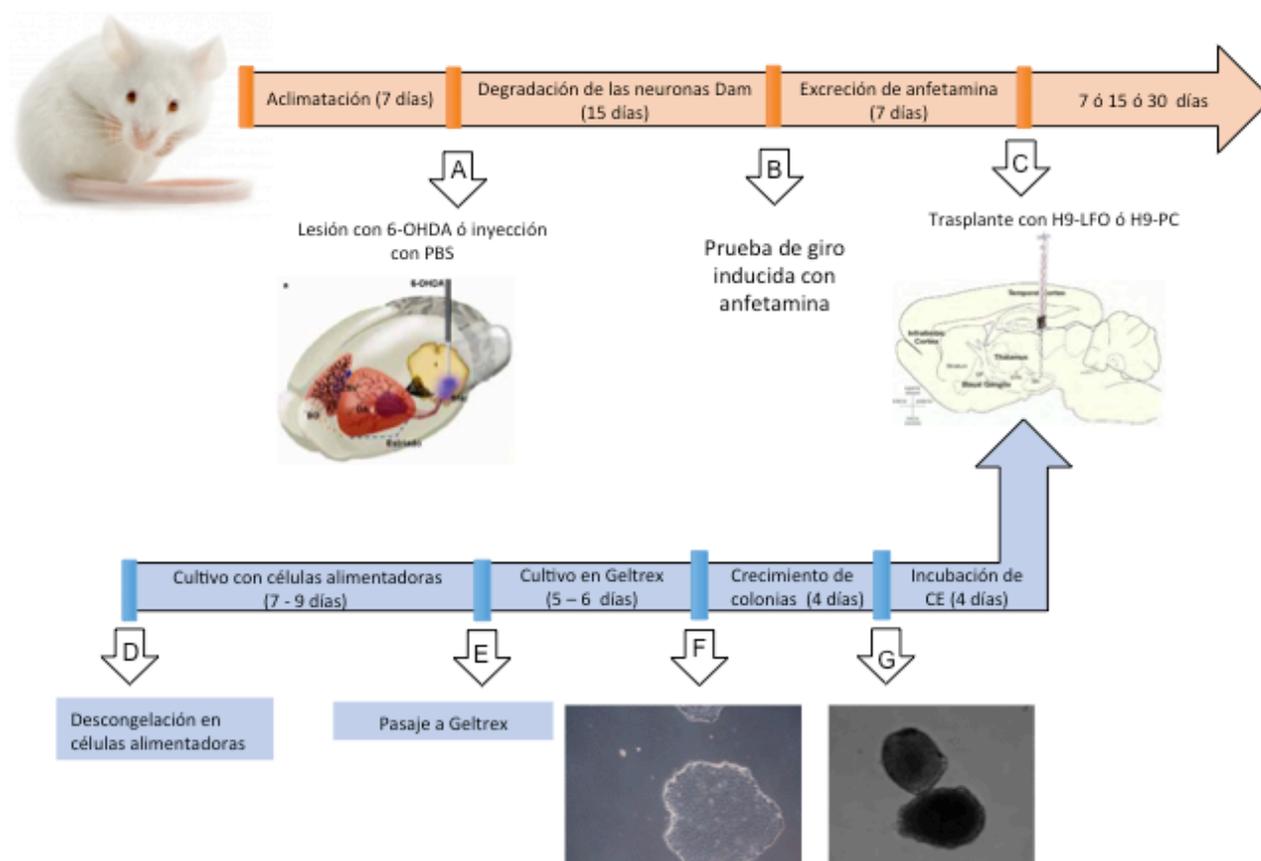
Establecer un sistema de trasplante que favorezca la especificación y diferenciación de CTEh a neuronas DAm *in vivo*, con lo cual se facilite su supervivencia e integración.

### 4.2. Objetivos particulares.

- Determinar si la línea H9-LFO trasplantada en etapa de CE en la SNpc es capaz de especificarse al fenotipo DAm a corto y mediano plazo.
- Determinar si la línea H9-LFO trasplantada en etapa de CE en la SNpc es capaz de diferenciarse al fenotipo DAm.

## 5. Estrategia experimental

La estrategia experimental (Figura 5) se dividió en dos partes fundamentales: una parte *in vivo* (Figura 5A, B y C) y otra *in vitro* (Figura 5D-G) que se desarrollan a la par. El tiempo para el desarrollo del cultivo es en promedio 29 días hasta el momento del trasplante (Figura 5C). Por otro lado, la parte *in vivo* (recepción y aclimatación de los animales, inyección con 6-OHDA, prueba de giro) hasta el trasplante fue de 20-23 días. Para la obtención de los tiempos óptimos *in vitro*, fue necesario llevar a cabo la estandarización del tiempo posterior al pasaje de las colonias y del tiempo de incubación del CE (ver la sección de resultados).



**Figura 5. Estrategia experimental.** **A.** Ratas Wistar fueron administradas estereotáxicamente con 6-OHDA (Lesión) o PBS (Sham) en la SNpc. Un grupo fue mantenido sin lesión (intactas). **B.** 15 días después de la cirugía los animales fueron sometidos a una prueba de giro con anfetamina para determinar si se encontraban lesionados. **C.** Los que presentaron más de 500 giros/h fueron trasplantados 7 días después con CE provenientes de CTEh. **D.** Descongelación de las líneas en células alimentadoras. **E.** Pasaje de cultivo con células alimentadoras a Geltrex. **F.** Las colonias pluripotentes de H9-LFO y H9-PC fueron mantenidas 4 días post-pasaje. **G.** Después fueron inducidas a la formación de CE durante 4 días. **C.** Posteriormente, los CE fueron disgregados enzimáticamente y se inyectaron estereotáxicamente 60,000 células en la SNpc.

## 6. Materiales y Métodos

---

### 6.1. Cultivo celular de CTEh

La estandarización de la técnica manual de CTEh y formación de CE realizada en el laboratorio se encuentra descrita en la sección de resultados. A continuación, describo los métodos de cultivo que ya se encontraban estandarizados por nuestra colaboradora (Zhu *et al.*, 2014).

### 6.2. Extracción de fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs)

Los fibroblastos embrionarios de ratón (“MEFs” por sus siglas en inglés) reciben este nombre hasta que se inhibe la replicación celular; después de eso, se denominan células alimentadoras. En nuestro caso se emplearon ratonas preñadas de la cepa CD1 de 12.5 días de gestación.

Para la extracción de fibroblastos se sacrificó a la ratona por dislocación y se realizó un corte en el vientre bajo, exponiendo y retirando el tejido epidermal y conjuntivo. Una vez expuestos los cuernos uterinos, estos se removieron para su posterior colocación en una caja de Petri de 6 cm con medio DMEM/F12/HEPES (Thermo Fisher, 15630080). Una vez concluido este paso todos los procedimientos consecuentes se realizaron bajo un microscopio de disección en una campana de flujo laminar para evitar una posible contaminación. Se removieron los fetos de los cuernos uterinos y se colocaron en otra caja de Petri de 6 cm con el mismo medio mencionado anteriormente. Se separaron los fetos y a cada uno se le removieron las extremidades superiores e inferiores, así como los órganos internos, dejando solo la piel la cual se coloca en otra caja de Petri de 3 cm con el mismo medio. La piel aislada fue seccionada y homogenizada con una pipeta de 1000  $\mu$ l y después de 200  $\mu$ l hasta eliminar cúmulos tisulares. Se efectuó la cuenta y se sembraron de  $5-7 \times 10^6$  células en cada caja Petri de 10 cm previamente gelatinizada con medio para células alimentadoras compuesto principalmente por medio DMEM alto en glucosa (Apéndice A. I). Se realizaron uno o dos pasajes empleando tripsina al 0.25% para eliminar cualquier otro tipo celular. Se sembraron 300,000 células en cada pozo de 6 pozos para realizar la inactivación con mitomicina C (Apéndice A. V) y los restantes fueron congelados para su uso posterior.

### **6.3. Preparación de células alimentadoras para sembrado de CTEh**

Para cada pozo de la caja de 6 multipozos se cubrió con 1 ml de gelatina al 0.1% (Apéndice A. III) durante 15 min, se obtuvo un criovial con 600,000 células alimentadoras del tanque de nitrógeno y se descongeló en un baño a 37°C hasta que solo quedara un botón de hielo para posteriormente adicionar 1 ml de medio de células alimentadoras al criovial y se pasaron estos 2 ml totales a un tubo falcón de 15 ml conteniendo 4 ml más del medio mencionado anteriormente. Se centrifugó durante 4 min a 1000 rpm a temperatura ambiente (TA). Una vez concluida la centrifugación se procedió a remover el sobrenadante y sembrar aproximadamente 500,000 células alimentadoras por pozo de 35 mm de diámetro interior. Se incubó a 37°C durante mínimo 2 h.

Cuando no se cuenta con células alimentadoras: se emplearon MEFs de pase 1 - 5 (P1 – P5), se descongelaron mediante la técnica previamente descrita y se esperó a que se alcanzara una confluencia del 60% (misma que la descrita anteriormente). Una vez alcanzada la confluencia deseada se trataron con mitomicina C (40  $\mu$ l de a 960  $\mu$ l de medio de células alimentadoras) por 2 horas, después se procedió a dar 3 lavados con PBS y adicionar el medio anteriormente mencionado. Como paso preventivo se esperó una noche para comprobar la interrupción del ciclo celular.

### **6.4. Descongelación de CTEh en monocapa de células alimentadoras**

Antes de la descongelación de las CTEh se preparó la monocapa de células alimentadoras, (CA) se removió el medio y se efectuaron dos lavados con 2 ml de PBS libre de  $Mg^{2+}$  y  $Ca^{2+}$  (Thermo Fisher, SH 30264.02) cada uno y se añadieron 1.5 ml de medio de CTEh (Apéndice A. II) suplementado con bFGF (Apéndice A. VI) más 3  $\mu$ l de 50 mM de tiazovivina (THZ) (Stemgent, 04-0017) al pozo y se colocó en la incubadora mientras se procedió a la descongelación. Para la descongelación, se sacó el criovial del nitrógeno líquido y se colocó en a 37°C hasta que solo quedó el botón de hielo, posteriormente el criovial limpió con etanol al 70% para meterlo a la campana, se colocó 1 ml de medio de CTEh al criovial usando una pipeta de 2 ml removiendo con movimientos circulares y se pasaron los dos ml de medio a un tubo falcón el cual previamente se preparó con 7 ml de medio de CTEh para un volumen final de 9 ml. Se centrifugó a 1000 rpm durante 3 min, se removió el sobrenadante, se resuspendió en 500  $\mu$ l de medio de CTEh y se colocó en el pozo

previamente preparado con medio para CTEh. Se incubó a 37°C cambiando medio diariamente hasta que aparecieron las primeras colonias (aproximadamente 9 días).

## **6.5. Animales**

Un total de 84 ratas Wistar machos adultas (250-280g), fueron mantenidas en el *vivarium* bajo un ciclo de 12 h luz/oscuridad (luces encendidas a las 7:00 am en una temperatura controlada a 22°C) y acceso *ad libitum* a comida y agua. Los procedimientos realizados fueron aprobados por el CICUAL del Instituto de Fisiología Celular con el registro No. MGC08-14.

## **6.6. Grupos de estudio**

En este estudio se emplearon 3 grupos diferentes de animales que fueron trasplantados. **1.6-OHDA**, ratas lesionadas con 6-OHDA como modelo de la EP. **2.Sham**, ratas inyectadas con PBS para producir sólo el daño mecánico e hidrostático y compararlo al de la lesión. **3. SNpc**, ratas intactas hasta el momento del trasplante para evaluar la sobrevivencia y diferenciación el nicho dopaminérgico adulto intacto (SNpc).

## **6.7. Lesión del sistema nigro-estriatal con 6-OHDA**

Para generar el modelo de lesión unilateral de la EP, los animales fueron anestesiados con una inyección intraperitoneal (i.p) de una combinación de Ketamina (100 mg/kg; PISA, Q-7833-028) /xilacina (PISA, Q-7833-099 10 mg/kg) Posteriormente, fueron colocados en un aparato de cirugía estereotáxica para proceder con la inyección de 40 µg de 6-hidroxidopamina (6-OHDA; Sigma, H4381) en solución salina y 0.02% de ácido ascórbico o el vehículo en la SNpc izquierda (-4.7 mm AP, ± 1.6 mm ML, -8.2 mm DV, respecto a Bregma 0; Atlas de Paxinos (Paxinos y Watson 2007).

## **6.8. Prueba de giro inducida con amfetamina**

Para verificar la lesión de la vía nigro-estriatal, empleamos la prueba de giro inducida con la administración i.p. de 4 mg/kg de amfetamina (Sigma, A-5880), un agonista dopaminérgico de los receptores presinápticos dos semanas después de la lesión con 6-

OHDA. (Boronat-García *et al.*, 2016). El número de giros izquierdos fueron registrados durante 90 minutos mediante un sistema computarizado acoplado a un detector de movimiento y los animales con más de 500 giros ipsilaterales inducidos con anfetamina fueron utilizados para los experimentos.

### **6.9. Protocolo de inmunosupresión**

Para todos los grupos se siguió el mismo protocolo de inmunosupresión, el cual consistió en la administración de ciclosporina (Cyclosporin, Pisa) a una dosis de 10 mg/kg por vía oral antes del trasplante y al 10 % en el agua para beber de un día antes del sacrificio de los animales (Jensen *et al.*, 2014).

### **6.10. Trasplante de CTEh en etapa de CE**

Para el trasplante de los CE, 30 días después de la lesión con 6-OHDA éstos fueron disgregados con una combinación de tripsina (Thermo Fisher, 27250-018) /colagenasa (Sigma, 1001963410) /EDTA (Thermo Fisher, AM9261) (0.25%, 1 mg/ml, 1mM) durante 5 minutos. Posteriormente se inyectaron  $2 \mu\text{l} \pm 1 \mu\text{l}$  de suspensión celular con las mismas coordenadas estereotáxicas mencionadas anteriormente.

### **6.11. Obtención y fijación de tejido cerebral**

Los animales fueron sacrificados con una inyección i.p. de pentobarbital sódico (60 mg/kg) y para fijar el tejido, fueron sometidos a perfusión intracardiaca con 250 ml de 0.1 M de buffer de fosfatos seguido de 250 ml de para formaldehído 4% peso/volumen en 0.1 M de buffer de fosfatos, Apéndice A. VIII y VII respectivamente). El cerebro de cada animal fue recolectado y tratado por 12 h en 4% de para formaldehído. Para su criopreservación, los cerebros se colocaron en un tren de deshidratación consistente de soluciones de sacarosa al 10%, 20% y 30% (Apéndice A. IX) durante 24 h a 4°C en cada concentración. Se obtuvieron cortes coronales del estriado y de la SNpc de 40  $\mu\text{m}$ , todos ellos recolectados en orden secuencial.

## 6.12. Inmunofluorescencia de CE

Los CE fueron semidisociados y sembrados en cámaras de cultivo (Nunc Lab-Tek) de  $1.7 \frac{cm^2}{pozo}$ . Nueve días después del sembrado, las células fueron fijadas mediante una solución de 4% de formaldehído (ThermoFisher, A24352) durante 15 minutos y en seguida se les realizó un lavado de PBS de 3 minutos. Posteriormente, se les permeabilizó y bloqueó durante 30 min con una solución consistente de 1% albumina sérica (ThermoFisher, A24353) / 0.3% de Tritón X-100 en PBS (ThermoFisher, A24352). Se diluyó el anticuerpo primario (Tabla 1, apartado 6.4.6) en solución de bloqueo y se incubó durante 3 h a TA o 12 h a 4°C. Posteriormente, se removió el anticuerpo primario y se lavó 3 veces con PBS durante 3 minutos cada lavado, se diluyó el anticuerpo secundario (mismos que en apartado 6.4.6) en solución de bloqueo durante 1 h. Finalmente, se efectuaron 2 lavados de 1 min con PBS y se empleó DAPI (4',6-diamino-2-fenilindol, 300 nM) como tinción nuclear.

## 6.13. Inmunofluorescencia de tejido cerebral

Los cortes coronales fueron lavados 2 veces en PBS por 5 minutos cada uno y posteriormente fueron permeabilizados con PBT (PBS (Apéndice A. X) y 0.3% Tritón 100X (Sigma, T8787). Después se hicieron 2 lavados de 10 minutos y una incubación en recuperador de antígenos (BSB, 0023) (buffer de citratos 1X) a 65°C por 35 minutos. Se mantuvieron a TA por 15 minutos, después se hicieron 3 lavados de PBT de 5 min c/u y posteriormente se mantuvieron en solución de bloqueo consistente en 5% de albumina sérica (Sigma, 9048-46-8) en PBT durante 1 h a TA. Concluido este tiempo, se incubó el tejido con el anticuerpo primario correspondiente empleando las diluciones reportadas al final de este apartado (Tabla 1) para doblecortina, ZO-1, SC-121, tirosina hidroxilasa, Lmx1a y Otx2 y se dejó en agitación 20 minutos. Se incubó toda la noche o 36 h dependiendo del anticuerpo a 4°C. Posterior al periodo de incubación, los cortes se mantuvieron a TA 15 minutos, se llevaron a cabo 3 lavados de 10 min con PBS y se colocaron en el anticuerpo secundario (Alexa Flúor 647 y 488) en una dilución 1:1000 durante 2 h. Concluido el tiempo se dio un lavado de 5 min con PBS y 5 min con DAPI (1: 10,000) como tinción nuclear y se montó en solución para inmunofluorescencia (DAKO, S3023).

**Tabla 1.** Anticuerpos primarios utilizados para inmunofluorescencia de CE y tejido cerebral.

Anticuerpo	Dilución	Periodo de incubación
SMA (Millipore, 41094)	1:1000	3h (TA) -12h (4°C)
TUJ1 (Biolegend, 801202)	1:1000	3h (TA) -12h (4°C)
Oct4 (Millipore, MAB4401)	1:1000	3h (TA) -12h (4°C)
Otx2 (Thermofisher, 100034245)	1:1000	20 min (TA) y 12 h (4°C)
Lmx1a (Millipore, AB10533)	1:100	20 min (TA) y 12 h (4°C)
Doblecortina	1:100	20 min (TA) y 36 h (4°C)
Tirosina hidroxilasa (SB, SB100698-T38)	1:500	20 min (TA) y 12 h (4°C)
ZO-1 (BD Lab, 610966)	1:100	20 min (TA) y 12 h (4°C)
SC-121 (Takara, Y40410)	1:1000	20 min (TA) y 12 h (4°C)

#### 6.14. Tinción Fontana-Masson

Utilizamos el kit de Sigma-Aldrich, HT200. Para la preparación de la solución de plata amoniacal se empleó un matraz Erlenmeyer con 27 ml de agua destilada y se le agregó 9 ml de solución de nitrato de plata al 10%. Posteriormente y en campana de extracción se añadió gota a gota una solución de hidróxido de amonio concentrado mezclando gentilmente hasta que el tono café de la solución se tornó transparente. Se colocaron los cortes en la solución de plata amoniacal descrita anteriormente dentro de un vaso Copling a 60°C hasta que el tejido se tornó amarillo-café (aproximadamente 1 h). Después de este tiempo se lavó 3 veces en agua destilada y se colocaron en solución de cloruro de oro al 0.2% durante 30 seg (TA) y se volvió a lavar con agua destilada. Se pasó a otro vaso Copling con solución de tiosulfato de sodio al 5% por 2 minutos. Transcurrido ese tiempo se lavó 2 veces con agua del grifo y 2 veces con agua destilada. Finalmente, se efectuó una contra tinción con eosina.

#### 6.15. Microscopía de CE y tejido cerebral.

Las muestras tanto de las colonias de CTEh como de CE fueron fotografiadas mediante un microscopio confocal de disco giratorio 3I Marianas (Zeiss Observer Z.1. invertido) y el software empleado fue ImageJ/FIJI. Mientras que las imágenes de inmunofluorescencia de tejido fueron tomadas en un microscopio marca Keyence bz-x700, empleando como software de análisis el Keyence BZ Analyzer.

## 7. Resultados

---

### 7.1. Estandarización de la técnica manual para cultivo de CTEh

Los cultivos de CTEh se caracterizan por presentar poca sobrevivencia a los tratamientos enzimáticos comúnmente utilizados para la disociación celular que permite el subcultivo o pasaje de células (Beers *et al.*, 2013). Esta dificultad en su mantenimiento nos llevó a implementar un “cultivo manual de CTEh” que se dividió en 3 diferentes etapas. En primer lugar, se realizó el crecimiento de las células alimentadoras (CA) (Figura 6A-C), posteriormente el pasaje manual (Figura 8D-F) y finalmente, el cultivo en geltrex (Figura 8G-I). En la figura 8A se puede observar la confluencia celular óptima de las CA. Observamos que para obtener una mejor respuesta celular (pluripotencia y sobrevivencia) de las CTEh posterior a su descongelación, era necesaria una densidad celular de  $63,000 \frac{cel}{cm^2}$ , contrario a algunos protocolos de cultivo de CTEh donde emplean menos densidad (Amit *et al.*, 2000) o a las CTEr que emplean una monocapa con  $84,000 \frac{cel}{cm^2}$  (Conner 2001) (resultado no mostrado).

Una vez que comenzaron a crecer las colonias de CTEh con una buena morfología, es decir con bordes brillantes, definidos y células compactas (Figura 6B), estas se pasaron manualmente a otro pozo con una superficie de crecimiento de  $9.4 \text{ cm}^2$  mientras que las células diferenciadas se dejaron en el pozo (Figura 6C). Se efectuó el pasaje manual cuando las colonias alcanzaron un diámetro cercano a 5-8 mm (Figura 6D), trazando primero una cuadrícula de aproximadamente  $1.44 \text{ mm}^2$  de área por cuadro con una aguja de jeringa BD21 (Figura 6E). Posteriormente, se succionó mediante el uso de una punta de pipeta de  $200 \mu\text{l}$  (aproximadamente 1.2 mm de diámetro exterior) y al final, los cúmulos fueron depositados en otro pozo con medio E8 y geltrex como matriz de adhesión celular.

Al día siguiente de efectuar el pasaje se pudo observar que en cada uno de los “cuadritos” resultado de los cortes para el pasaje se formó una colonia nueva (Figura 6G).

Estas colonias fueron observadas continuamente a partir del 2º día, para remover aquéllas que mostraban colonias diferenciadas (Figura 6H).

Mediante el uso de esta metodología se lograron obtener colonias de morfología uniforme y de apariencia homogénea (Figura 6I). Una de las ventajas de este protocolo de cultivo, fue que nos permitió “seleccionar” las colonias pluripotentes con mejor morfología para que la masa celular resultante fuera más homogénea y con ello evitar la diferenciación.

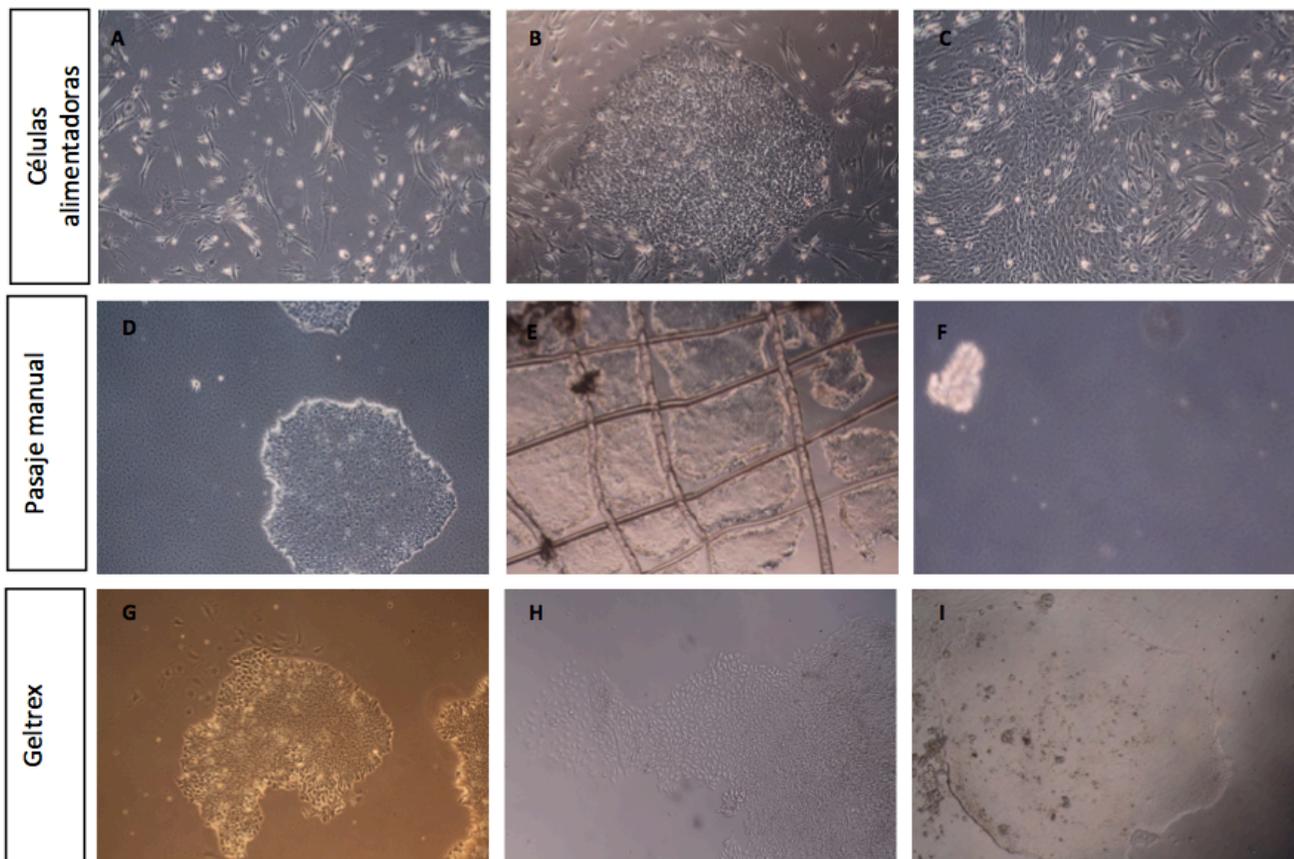
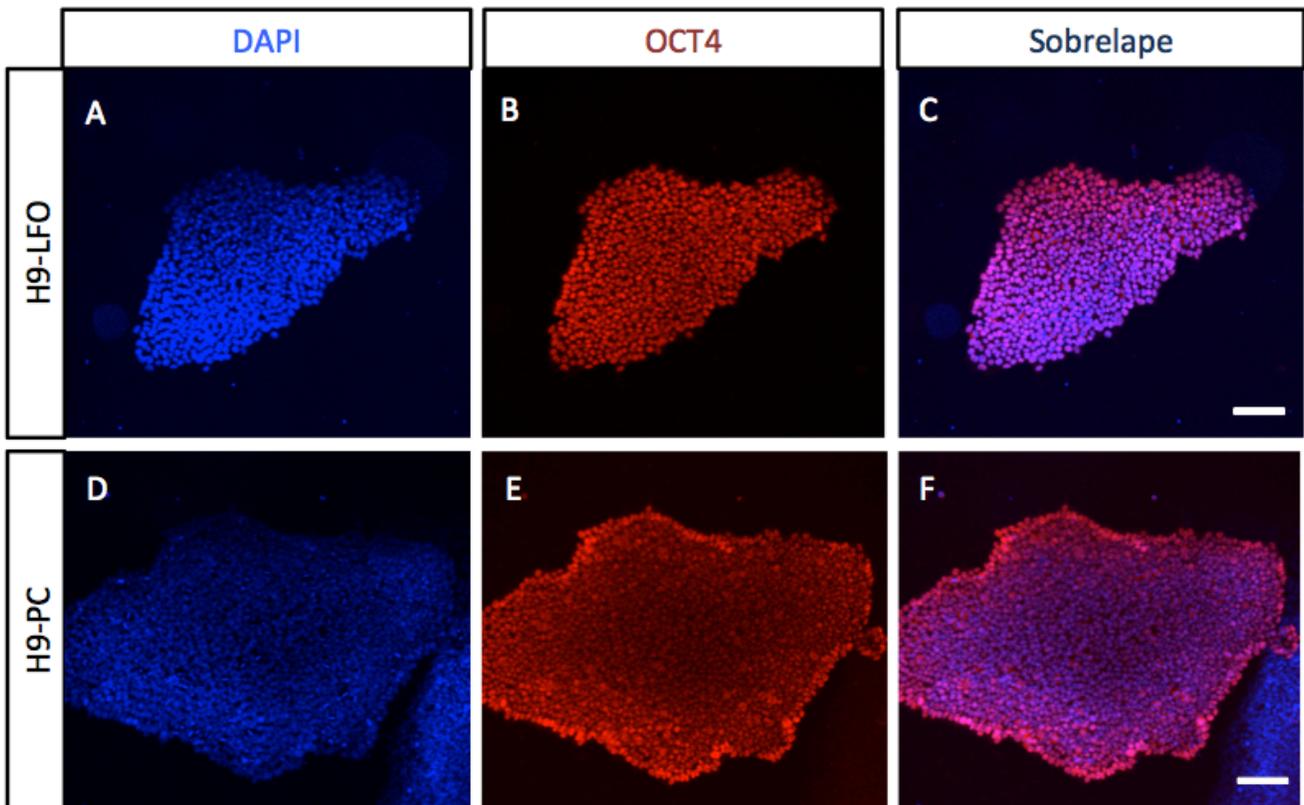


Figura 6. Imágenes representativas de la estandarización del protocolo manual de cultivo de CTEh. A-C. Crecimiento de la línea H9-LFO sobre células alimentadoras. A. Confluencia celular óptima de células alimentadoras de ratón. B. Colonia “saludable” creciendo sobre células alimentadoras. C. Colonia diferenciada creciendo sobre células alimentadoras. D-F. Pasaje manual de CTEh. D. Colonia lista para pasaje. E. Trazado de cuadrícula para la extracción manual. F. Apariencia de un pequeño fragmento de la cuadrícula después de efectuar el pasaje. G-I. Crecimiento en geltrex G. Apariencia de una colonia “saludable” sin diferenciación después de dos días de pasaje. H. Área diferenciada de una colonia que requiere ser retirada. I. Apariencia morfológica de células pluripotentes después de 4 días de pasaje (dpp). Magnificación, 10X. n=15.

## 7.2. Pluripotencia de las colonias H9-LFO y H9-PC.

Para determinar si el protocolo estandarizado efectivamente producía masa celular indiferenciada, se procedió a realizar pruebas de pluripotencia a las colonias con las cuales se formarían los CE requeridos para el trasplante.

Realizamos en ambas líneas troncales inmunofluorescencias para determinar la expresión del FT de pluripotencia Oct4 a 4 días post-pasaje (dpp) (Figura 7). Observamos que las células de las líneas H9-LFO (Figura 7A-C) y H9-PC (Figura 7D-F) presentan una expresión homogénea de Oct4 en sus núcleos como puede apreciarse por su co-localización con el marcador nuclear DAPI.



**Figura 7. Expresión del FT Oct4 en las líneas H9-LFO y H9-PC.** Imágenes representativas de colonias de 4 dpp de la línea H9-LFO (A-C) y H9-PC (D-F) creciendo en geltrex y que expresan el factor de pluripotencia Oct4. **A y D.** DAPI, **B y E.** Oct4. **C y F.** Sobrelape de imágenes de DAPI y OCT4. Barras de escala = 100  $\mu$ m. n=15.

Una vez determinado que nuestras colonias se encontraban en condiciones óptimas para su uso, se procedió a establecer un protocolo de formación de CE que, así como el de cultivo manual, nos permitiera obtener CE con características morfológicas representativas de este estadio celular.

### **7.3. Formación de CE.**

A la fecha existen diferentes metodologías para inducir la formación de un CE, por ejemplo, el empleo de cajas especiales de micropozos (“agrowells”), de gota (“handling drop”) o de auto agregación. Todos estos procedimientos comparten la característica de hacer mediante procesos enzimáticos, que las colonias de CT sean disociadas hasta células únicas para iniciar la agregación celular, lo que ocasiona estrés a las células y baja sobrevivencia, razón por la cual, es necesario el uso de gran cantidad de masa celular (Y. Lin y Chen 2014; Pettinato, Wen, y Zhang 2014).

Nosotros decidimos utilizar una alternativa a la disociación de las colonias. Nuestro método consistió en emplear colagenasa en concentración de 1 mg/ml por un tiempo aproximado de 40 minutos, pues esta condición de tratamiento permite que las colonias completas se despeguen del pozo y floten en la suspensión. Como consecuencia de este cambio se procedió a establecer el tiempo de incubación necesario para obtener CE óptimos para el trasplante. Con el paso de los días se observó que del día 1 a 4 estos CE no presentaban ni conglomeración entre ellos ni evidencia de cavitación (no se muestran resultados). Sin embargo, a partir del 5º día comenzaron a fusionarse entre sí, dando origen a conglomerados amorfos y de densidad mayor (no se muestran resultados). En consecuencia, se estableció que los CE de 4 días (Figura 8D y H) son los que presentaban las mejores características (mayor masa celular sin cavitación ni agregación) para ser trasplantados.

### **7.4. Caracterización de los CE.**

Como fue descrito en detalle en los antecedentes, la línea H9-LFO expresa dos proteínas reporteras que permiten la identificación de las células (mCherryFP), así como el reconocimiento del proceso de diferenciación (GFP) *in vitro* e *in vivo*. A partir del promotor PGK se expresa constitutivamente mCherryFP lo que permite visualizar todas las células. Por otra parte, a partir del promotor TK regulado por el “enhancer” de Nestina se expresa GFP, señalando la expresión de los 3 FT. En cambio, la línea H9-PC solo expresa constitutivamente mCherryFP a partir del promotor antes mencionado y no contiene el otro promotor y los FT. Como se puede observar en la figura 8A y C, los CE de la línea H9-LFO

presentan fluorescencia en verde dada por la expresión de la proteína GFP y la fluorescencia en rojo de la proteína mCherryFP (Figura 8B y C). En contraste y de acuerdo con lo esperado, la línea H9-PC solo presenta la fluorescencia en rojo (Figura 8F y G).

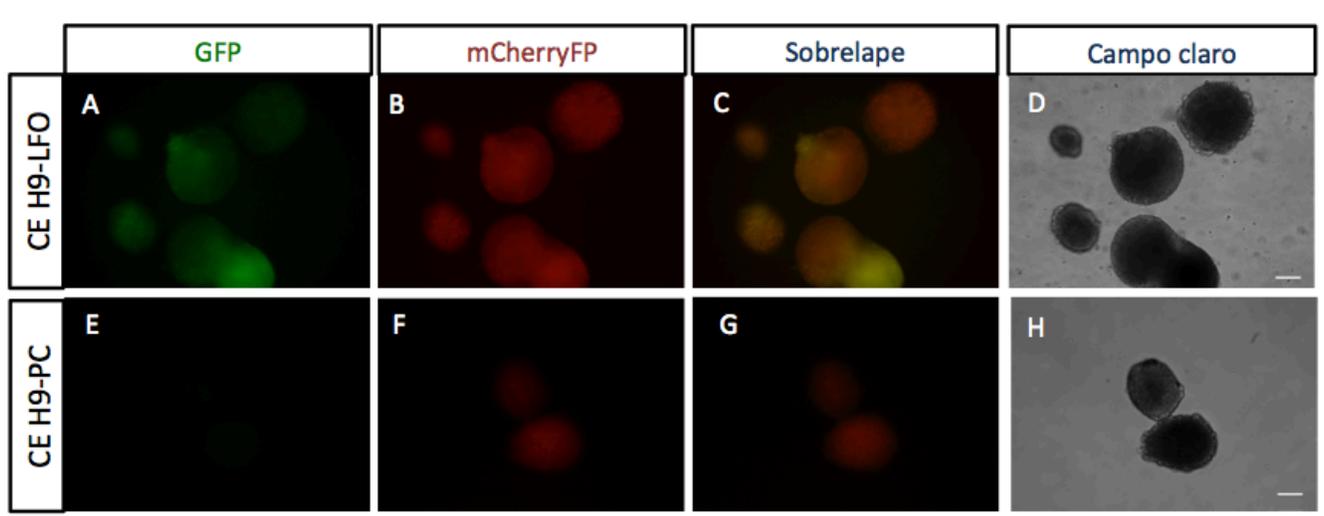


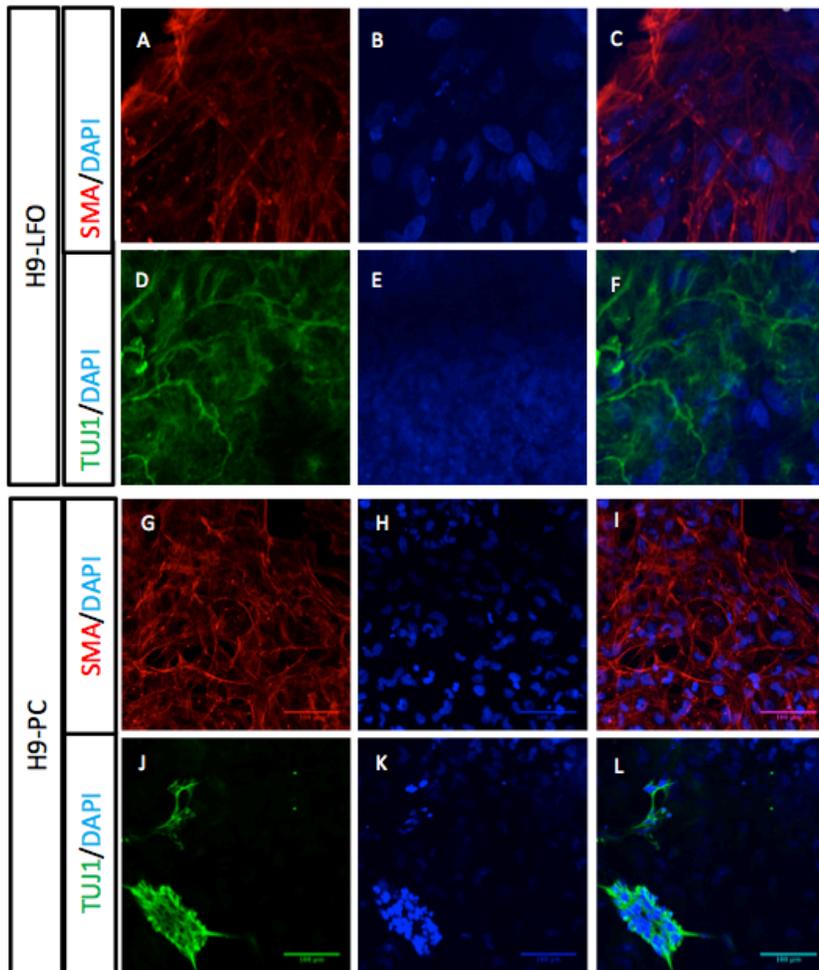
Figura 8. Imágenes representativas de la expresión de reporteros fluorescentes en CE de 4 días de formación. A-D. CE de la línea H9-LFO y E-H. CE de la línea H9-PC. A y E. Expresión de GFP, B y F. Expresión de mCherryFP, C y G. Sobrelape de GFP y mCherryFP, D y H. Campo claro. Barra de escala = 100  $\mu$ m. n=15.

### 7.5. Comprobación de potencialidad del CE para la formación de diferentes linajes germinales.

La capacidad de un CE de inducirse hacia los linajes de las tres capas germinales (ectodermo, mesodermo y endodermo) está determinada por su pluripotencia (Sathananthan 2011). Por este motivo era relevante determinar en cultivo que los CE que serían trasplantados dieran origen a células de las diferentes capas germinales, entre ellas al ectodermo, de donde proviene todo el sistema nervioso.

Con este fin, realizamos ensayos de inmunofluorescencia para determinar la expresión de los marcadores de las 3 capas germinales. Como marcador mesodermal empleamos la actina de músculo liso (SMA por sus siglas en inglés) que forma parte de los microfilamentos del citoesqueleto. Como marcador ectodermal seleccionamos a beta III tubulina (TUJ1), proteína que se encuentra en todas las células del sistema nervioso, siendo un constituyente de los microtúbulos a los que les provee de soporte e integridad. Finalmente, como marcador del endodermo utilizamos alfa-fetoproteína.

Observamos que tanto la línea H9-LFO (Figura 9A–F) como la H9-PC (Figura 9G-L) tienen la capacidad de diferenciarse hacia los linajes mesodérmico (Figura 9A-C, G-I) y ectodérmico (Figura 9D-F, J-L). Aunque no logramos determinar la expresión de alfa-fetoproteína por problemas con el anticuerpo (no se muestra el resultado), la expresión de los otros dos marcadores sugiere que las modificaciones genéticas efectuadas en las líneas de CTEh para la expresión de los 3 FT o la sola introducción del vector, no produjeron cambios en su capacidad de pluripotencia, además de que pueden dar origen *in vitro* a células de tipo neural (TUJ1+).



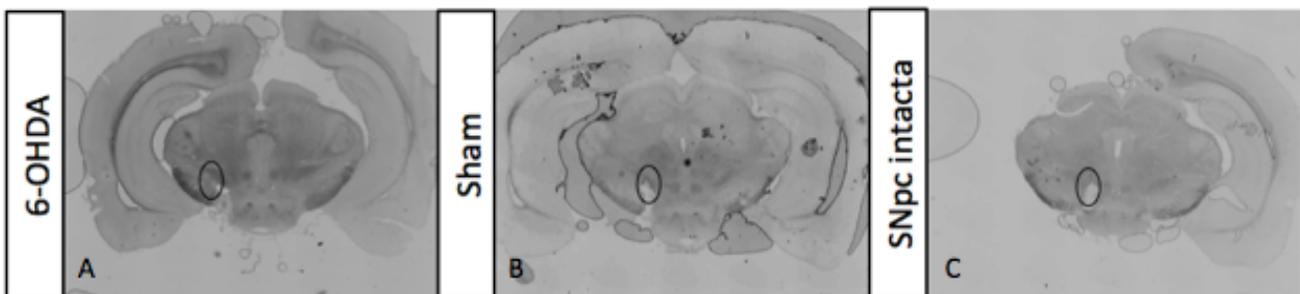
**Figura 9. Diferenciación hacia mesodermo y ectodermo de las líneas H9-LFO y H9-PC.** Imágenes representativas de: **A y G.** Expresión del marcador mesodérmico SMA (actina de músculo liso) de la línea experimental y control respectivamente. **D y J.** Marcaje de la proteína ectodérmico TUJ1 de la línea experimental y control respectivamente. **B, E, H y K.** Muestran el marcaje nuclear con DAPI de la línea H9-LFO (B y E) y H9-PC (H y K). **C, F, I y L.** Se observa el sobre lappe de las imágenes de los marcadores SMA o TUJ1 con DAPI. La barra de escala indica 100  $\mu\text{m}$ . n=3.

Una vez que estandarizamos y caracterizamos la producción eficiente de CE en cultivo, se procedió a desarrollar la etapa *in vivo* de este estudio.

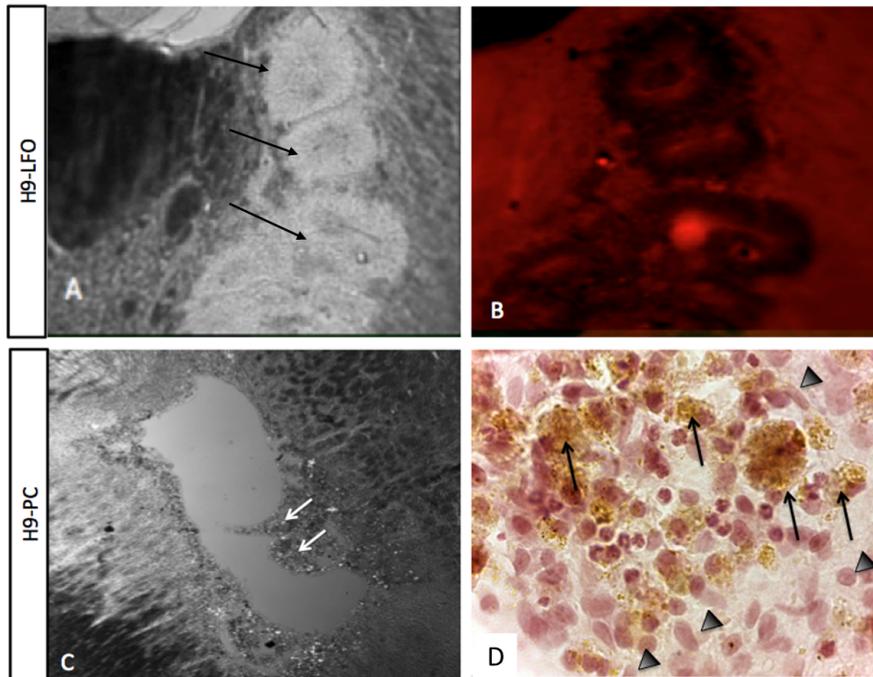
## 7.6. Trasplante de H9-LOFy H9-PC en la SNpc.

Con el fin de determinar si las CTEh que sobreexpresan 3 FT DAm eran capaces de diferenciar hacia un linaje DAm en la SNpc de rata adulta, se trasplantaron CE de la línea H9-LFO y H9-PC en tres diferentes condiciones. En la figura 10 se puede observar resaltada en óvalos negros, la SNpc trasplantada con la línea H9-LFO (Figura 10A, B, C) en ratas lesionadas unilateralmente mediante el uso de la toxina 6-OHDA como modelo de la EP, en ratas Sham (Figura 10B) y en ratas intactas (SNpc intacta, Figura 10C). Estos resultados señalaron la reproducibilidad de la cirugía para implantar las células y permitieron observar su sobrevivencia (Figura 10A). Una observación muy interesante es que la línea H9-LFO a 7 dpt presentaba formaciones columnares radiales (Figura 11A). La morfología de estos arreglos era muy similar a la reportada en cultivos de CTEh como “rosetas neurales” (Sathananthan 2011). Sin embargo, la fluorescencia de mCheryFP disminuyó considerablemente en la línea H9-LFO a los 7 (Figura 11B) y 15 dpt (no se muestra el resultado), lo que dificultó el reconocer a las células trasplantadas del tejido endógeno por su fluorescencia en rojo.

Por el contrario, observamos sorprendentemente que las células de la línea H9-PC trasplantadas también en la SNpc de ratas en el modelo de 6-OHDA presentan una morfología que sugiere que no sobrevivieron (Figura 11C y D). En la figura 11C se observan células redondas refringentes embebidas en zonas con áreas oscuras en donde se vuelven indistinguibles los organelos celulares. Para poder observar a mayor detalle la morfología celular de las células trasplantadas se efectuó una tinción de Hematoxilina-Eosina (H&E). Con este procedimiento fue posible observar que en las células trasplantadas no hay delimitación del núcleo y el citoplasma, además de presentar una coloración amarilla característica de células muertas (Figura 11D). Sin embargo, el tejido endógeno adyacente muestra una morfología normal, con núcleo y citoplasma bien definidos (Figura 11D).



**Figura 10. Imágenes del área de trasplante de la línea H9-LFO.** Imágenes panorámicas representativas de cortes coronales a nivel -4 anteroposterior de ratas en el modelo de 6-OHDA, Sham, y SNpc intacta. El círculo negro indica el área de trasplante. Imágenes tomadas en el microscopio Keyence bz-x700 empleando una magnificación de 10X. n=7, 5 y 5 respectivamente.



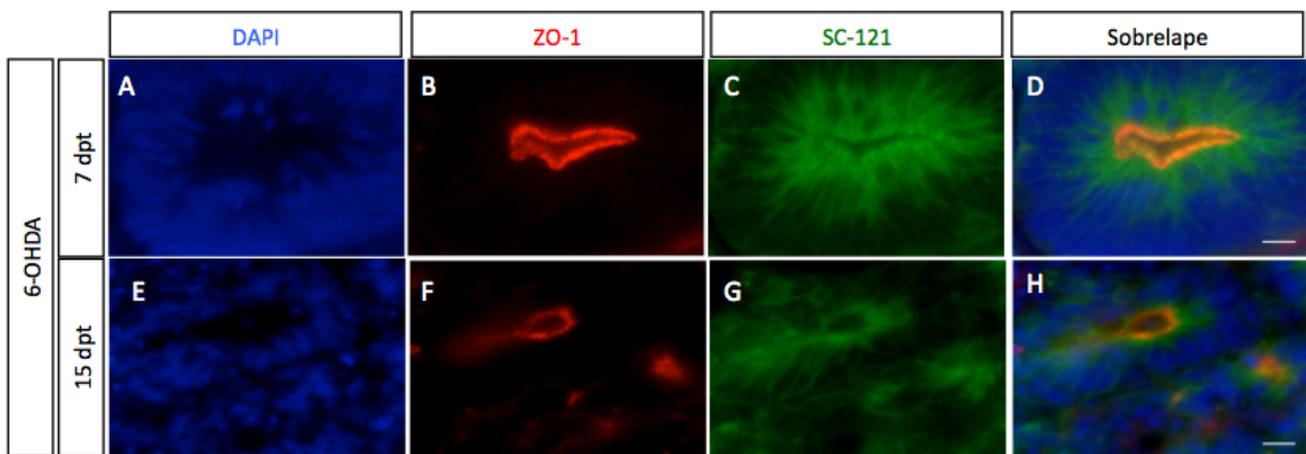
**Figura 11. Trasplante en la SNpc de la línea H9-LFO y H9-PC en la SNpc.** Imágenes representativas de: **A y B.** Línea H9-LFO trasplantada en la SNpc. **A.** En campo claro se observa la formación de rosetas neurales de las células trasplantadas. **B.** La imagen muestra la fluorescencia de la mCherryFP. **C y D.** Apariencia del trasplante con la línea H9-PC. **C.** En campo claro se observan células refringentes (flechas), sin delimitación del núcleo-citoplasma sugeriendo muerte celular. **D.** La tinción de H & E permitió observar células amarillas sin delimitación de núcleo y citoplasma (flechas) lo que confirma la muerte celular. Mientras que en el tejido endógeno se observa una estructura celular normal caracterizada por estructuras nucleares y citoplasmáticas definidas con los colores rojo y rosa respectivamente (cabeza de flecha). Amplificación en A y B. 10X; C.100X.n=3.

### 7.7. Formación de rosetas neurales en la SNpc de ratas trasplantadas con la línea H9-LFO

Como mencionaba anteriormente, observamos de forma sorprendente que la línea H9-LFO presentaba formaciones similares a rosetas neurales a 7 (Figura 11A) y 15 dpt (Figura 11B) en los tres diferentes grupos analizados, 6-OHDA (Figura 10A y Figura 11), Sham y SNpc intacta (Figura 10). La roseta neural es una formación morfogénica esencial durante el desarrollo neural embrionario, equiparada al estado de placa neural (Elkabetz *et al.*, 2008). Se encuentra conformada por células progenitoras neurales (NPC) que probablemente representen el primer tipo celular neural (Elkabetz *et al.*, 2008). Las rosetas neurales, son fácilmente identificables por ser altamente polarizadas con una parte basal y una apical en la que se localiza el lumen (Sathananthan 2011a). Esta característica está dada en parte por

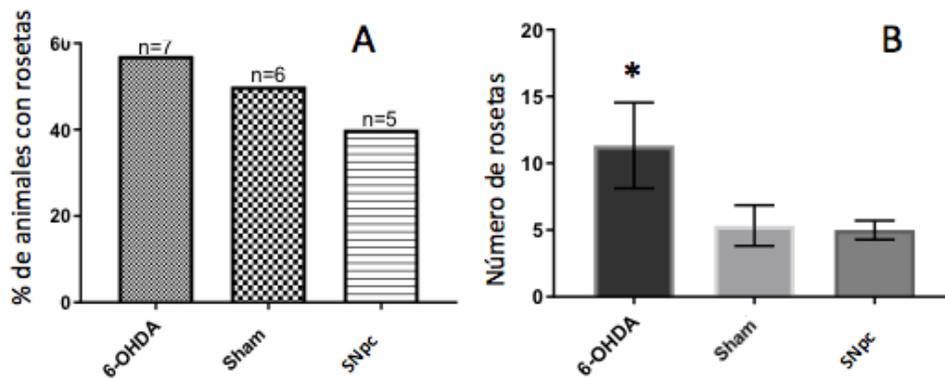
proteínas de uniones estrechas encontradas en la parte apical de las rosetas(Sathananthan 2011). El proceso de diferenciación neural temprana de CTEh en cultivo, comienza con la formación del neuroectodermo primitivo, que se manifiesta por la formación de rosetas, con diferenciación consecutiva NSC con potencial más restringido(Elkabetz *et al.*, 2008; D. S. Kim *et al.*, 2012)

Dada la relevancia de esta formación para la diferenciación neuronal, nos interesó determinar si las estructuras observadas eran efectivamente rosetas neurales. Con este fin se realizó la inmunofluorescencia para la proteína de unión estrecha y elemento de polarización, “zonula occludens-1” (ZO-1) expresada en la parte luminal de las rosetas (D. S. Kim *et al.*, 2012). Como puede observarse en la Figura 14, las formaciones columnares formadas a partir de la línea H9-LFO en el grupo lesión con 6-OHDA a 7 (Figura 14A-D) y 15 dpt (Figura 14E-H), presentaron la expresión luminal de esta proteína. Para determinar que la expresión de ZO-1 proviene de las células trasplantadas, utilizamos el marcador STEM121 (SC-121), el cual es una proteína de citoplasma humano que se ha empleado para el reconocimiento de implantes de ese origen celular tanto en ratas como en ratones (Uchida *et al.*, 2012). Observamos que la expresión de ZO-1 se correlacionaba con la expresión de SC-121 a 7 y 15 dpt (Figura 12D y H); lo que permitió comprobar que, en efecto, estos arreglos columnares son rosetas neurales formadas *in vivo* y que estas son de origen humano.



**Figura 12. Rosetas neurales en la SNpc lesionada de ratas a 7 y 15 dpt.** Imágenes representativas de: **A y E.** Marcaje nuclear con DAPI. **B y F.** Expresión de ZO-1 en la parte luminal de las rosetas. **C y G.** Expresión de la proteína de citoplasma humano SC-121. **D y H.** Sobrelape de las imágenes del marcador SC-121, ZO-1 y DAPI. Barra de escala = 50  $\mu$ m. n=3.

Para determinar la proporción de animales en los que se iniciaba este proceso de diferenciación neural en la SNpc, se cuantificó la presencia de rosetas en el tejido de los tres diferentes grupos a 7 dpt. Se encontraron rosetas en la siguiente proporción: cerca del 57% de ratas en el grupo lesión con 6-OHDA, 50% de ratas Sham y 40% de ratas con la SNpc intacta (Figura 13A). De entre las ratas con estas formaciones neurales, había en promedio 11, 6 y 5 rosetas en los grupos de 6-OHDA, Sham lesión y SNpc intacta, respectivamente (Figura 13B). El análisis por ANOVA unifactorial con  $p < 0.05$  indica que existe una diferencia significativa en el número de rosetas presentes en el grupo de 6-OHDA con respecto a sus controles, por lo que se podría sugerir que la lesión en la SNpc promueve la formación de rosetas neurales en la línea H9-LFO.

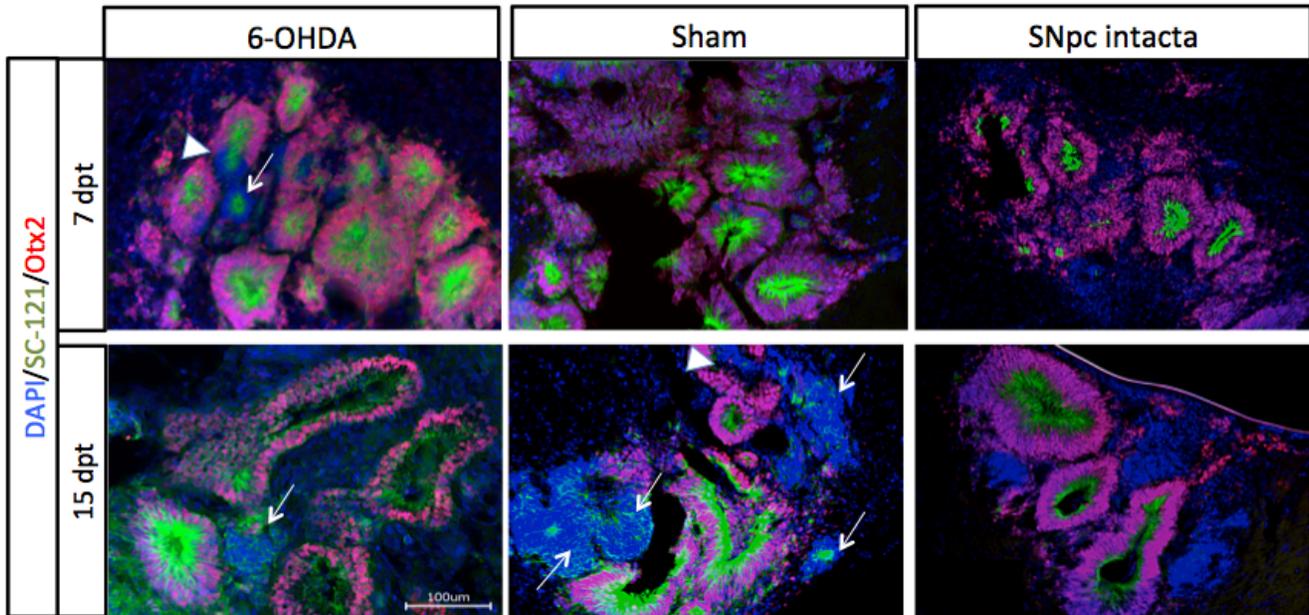


**Figura 13. Formación de rosetas de la línea H9-LFO en la SNpc de rata adulta.** **A.** Porcentaje de formación de rosetas de ratas lesionadas con la toxina 6-OHDA, Sham y SNpc intacta. **B.** Número de rosetas cuantificadas por condición, 6-OHDA, Sham y SNpc intacta con valores promedio de 7,6 y 5 respectivamente. El grupo de 6-OHDA presentó una diferencia significativa con respecto a los controles. Análisis estadístico: ANOVA unifactorial con intervalo de confianza del 95%.  $n=7$ , 6, 5 para el modelo 6-OHDA, Sham y SNpc respectivamente.

### 7.8. Expresión de Otx2y Lmx1a en trasplantes de H9-LFO.

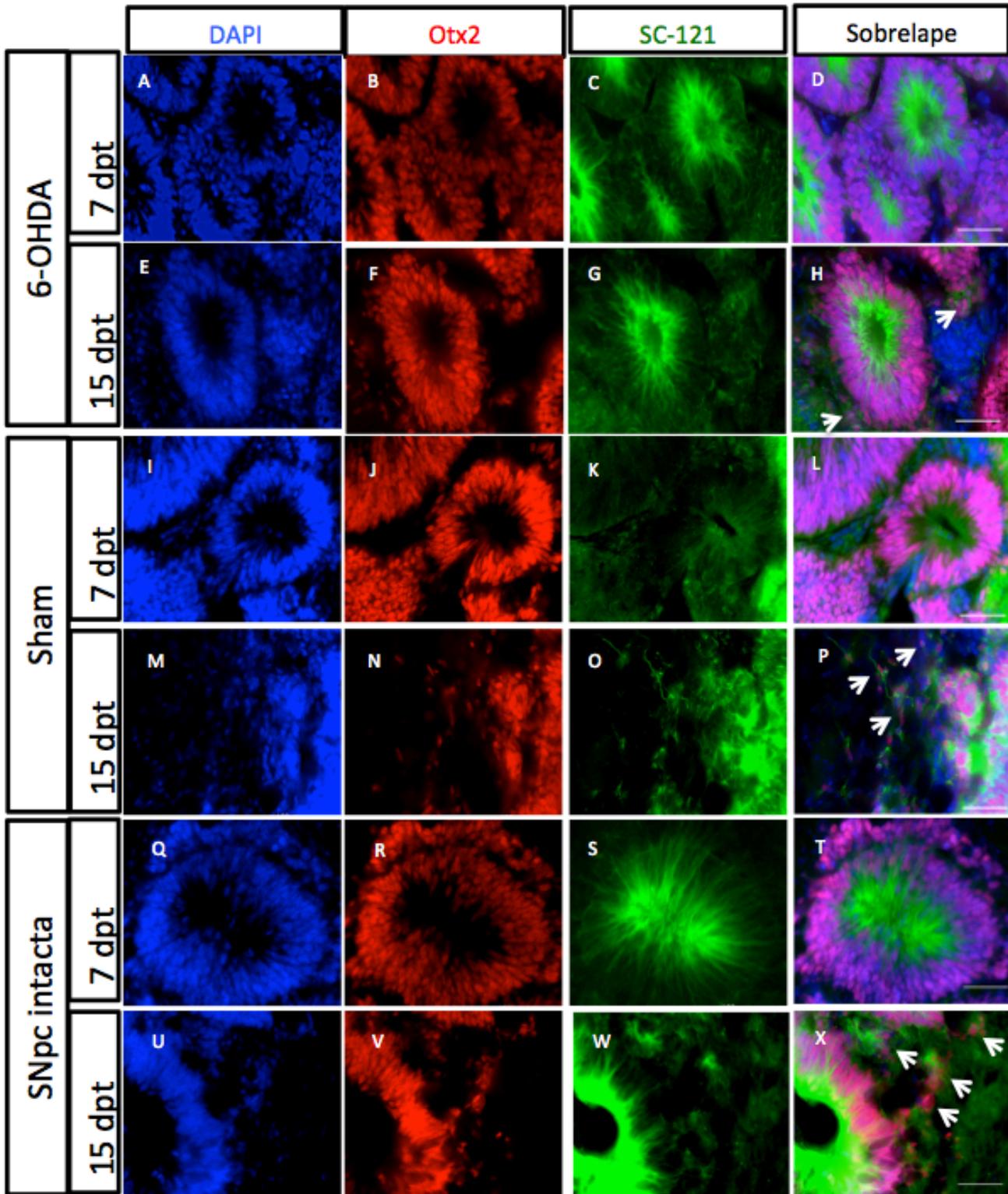
Con el fin de caracterizar el fenotipo observado en las rosetas, evaluamos la expresión del marcador del SNC (tubo neural) anterior Otx2, reportado anteriormente en esta formación (Malchenko *et al.*, 2014). Como resultado de la determinación por inmunofluorescencia de Otx2, se observó su expresión generalizada en las rosetas a 7 y 15 dpt en la SNpc lesionada (Figura 14A-F). Sin embargo, en ambos tiempos post-trasplante se observan algunas rosetas SC-121+ que no expresan Otx2 o sólo un área de la roseta sin Otx2 (Figura 14A cabezas de flecha). A 15 dpt se observan más rosetas SC-121+ que no expresan Otx2 (Figura 14D, E,

flechas blancas), lo que sugiere que su expresión disminuye. El FT Otx2 se observa también en las rosetas formadas en la SNpc de las dos condiciones control (Figura 15I-X).



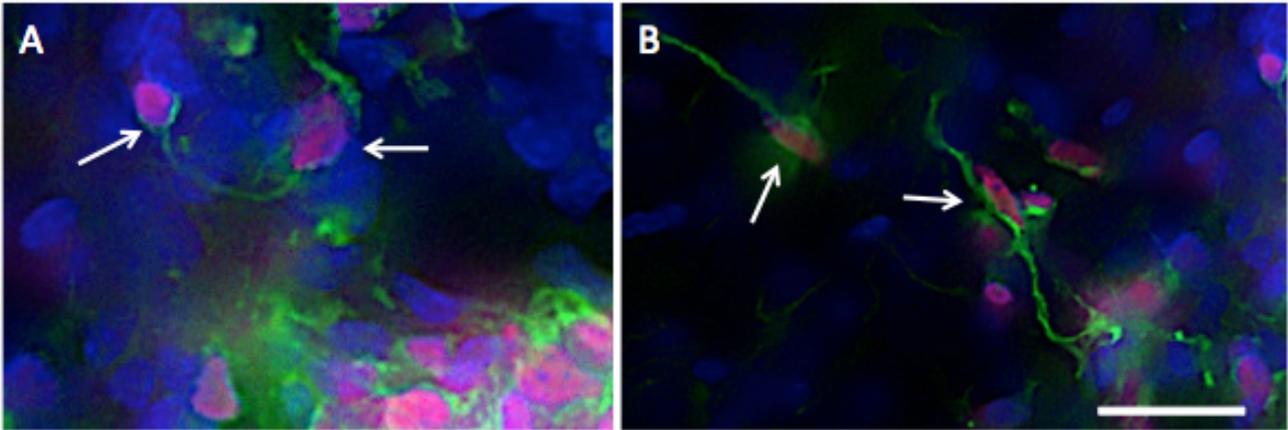
**Figura 14. Expresión del FT Otx2 en la línea H9-LFO trasplantada en la SNpc.** Imágenes representativas de: **A-F**. Se observa la expresión de Otx2 (rojo), en el núcleo (DAPI, azul) de células humanas (SC-121+, verde) a 7 (**A-C**) y 15 dpt (**D-F**). La mayoría de las rosetas en los grupos 6-OHDA (**A, D**), Sham (**B, E**) y SNpc intacta (**C, F**) expresan Otx2. Las flechas señalan algunas de las formaciones de rosetas negativas a Otx2, y las cabezas de flecha indican rosetas con una zona Otx2 negativa. Cada imagen muestra el sobrelape de los 3 marcadores. Barra de escala = 100 µm. n=3

A mayor magnificación fue posible observar que las rosetas a 7 dpt se encuentran en general bien delimitadas y con expresión de Otx2 mayormente en células dentro de las rosetas (Figura 15A-D, I-L, Q-T). En contraste, en todos los grupos estudiados a 15 dpt ya no es tan evidente la delimitación de las rosetas y se observa mayor cantidad de células SC-121+/Otx2- fuera de estos arreglos (Figura 15E-H, M-P, U-X, flechas blancas). Estos resultados sugerían la disminución en el número de rosetas y de Otx2, que probablemente conllevaba la progresión hacia la diferenciación neural.



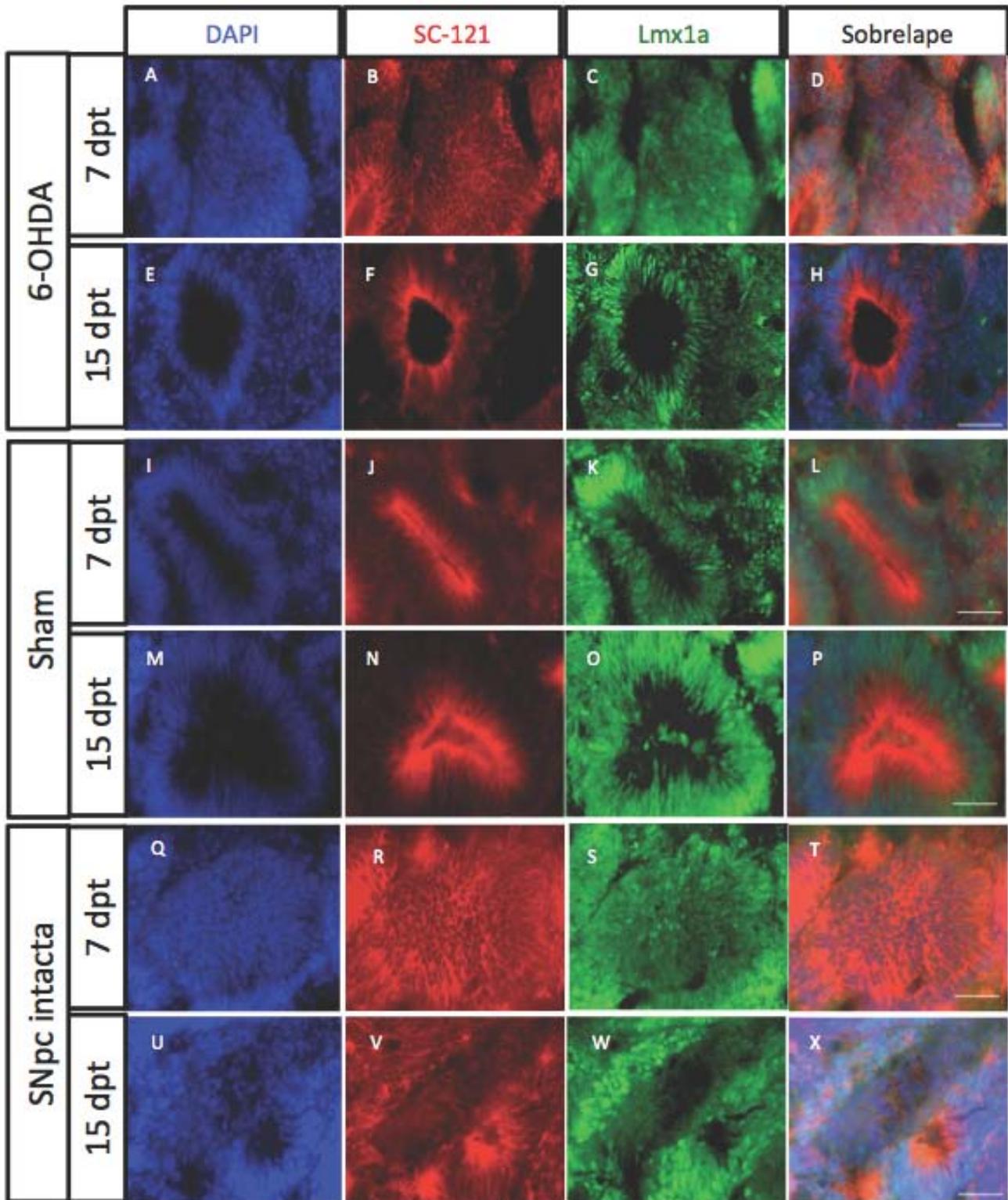
**Figura 15. Expresión de Otx2 en la línea H9-LFO trasplantada en la SNpc.** Imágenes representativas 40X de la expresión de Otx2 en rosetas formadas en la SNpc de animales lesionados con 6-OHDA (**A-H**), Sham (**I-P**) e intactos (**Q-X**), a 7 y 15 dpt. Se observa que mientras a 7 dpt las rosetas tienen su morfología característica, a 15 dpt no están bien delimitadas y hay áreas de células SC121+ sin conformación de roseta que no expresan Otx2. Las flechas señalan esas áreas negativas a Otx2. **A, E, I, M, Q, U.** Marcaje nuclear con DAPI (azul). **B, F, J, N, R, V.** Marcaje para Otx2 (rojo). **C, G, K, O, S, W.** Marcaje para SC-121 (verde). **D, H, L, P, T, X.** Sobrelape de las imágenes de DAPI, SC-121 y Otx2. Barra de escala = 50  $\mu$ m. n=3.

En ese sentido, el mayor acercamiento por microscopía confocal, permitió observar a 15 dpt, células con morfología neuronal, caracterizadas por un citoplasma en forma más alargada y con proyecciones evidentes (Figura 16 A y B).



**Figura 16. Morfología de células SC121+ que expresan Otx2.A y B.** Imágenes representativas de amplificación 60X que muestran CTEh que expresan Otx2 a 15 dpt en el grupo lesionado (**A**) y Sham (**B**). En ambas condiciones se observan células Otx2+ con morfología neuronal (flechas blancas). Las imágenes presentan el sobrelape de las señales de DAPI (azul), Otx2 (rojo) y SC-121 (verde). Barra de escala = 25  $\mu$ m; n=3.

Por otra parte, la expresión de Lmx1a, FT crítico para la adquisición del compromiso DAm se ha observado también en la etapa de roseta neural (Cai *et al.*, 2009). Los ensayos de inmunofluorescencia para Lmx1 que llevamos a cabo, permitieron observar que, como ocurre para Otx2, su expresión se encuentra en prácticamente todas las rosetas a 7 y 15 dpt en los 3 diferentes grupos (Figura 17), con un incremento de células con apariencia neuronal a 15 dpt (no se muestra el resultado).



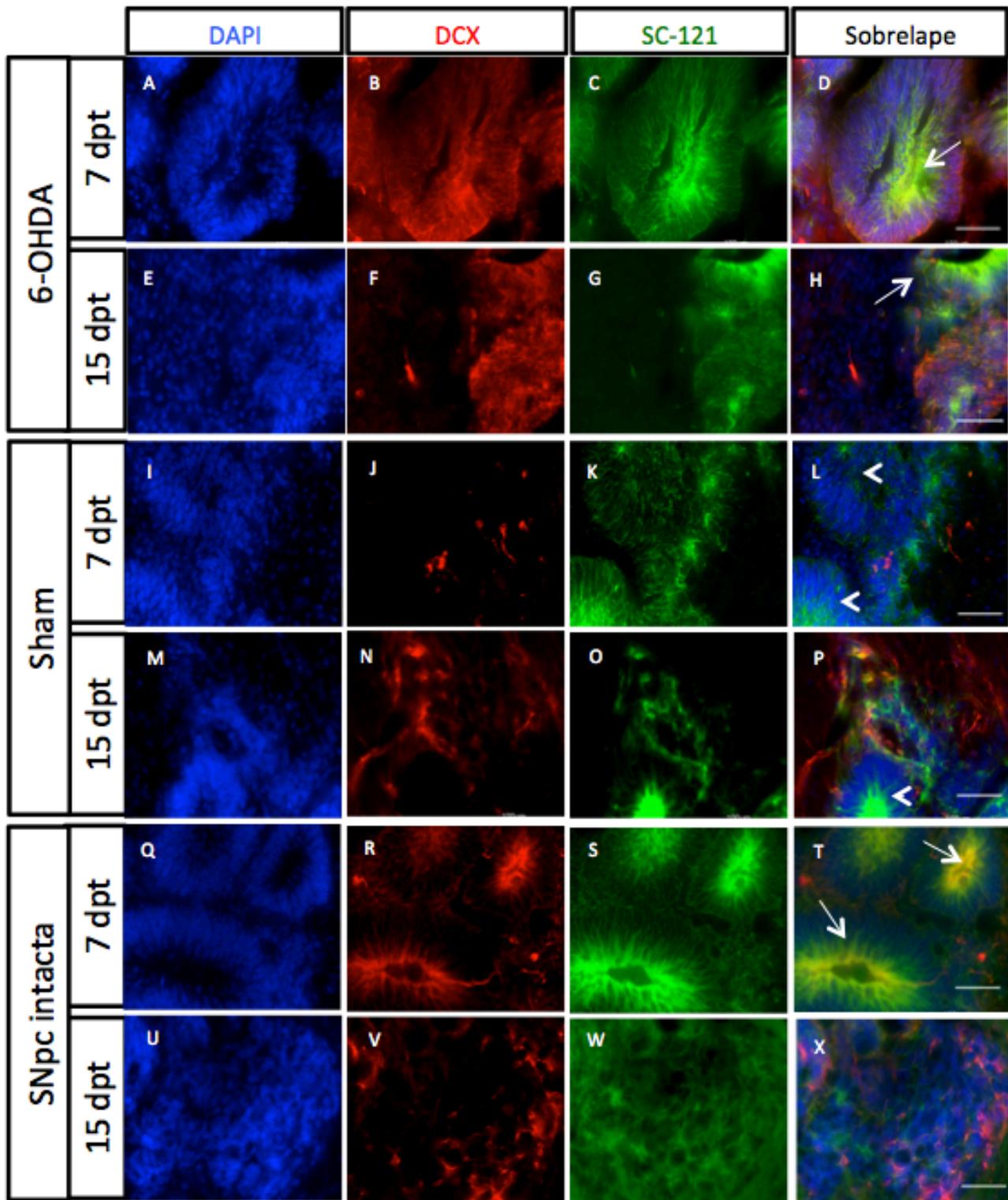
**Figura 17.** Expresión de Lmx1a en la línea H9-LFO trasplantada en la SNpc. Imágenes representativas de a 40X que muestran la expresión de Lmx1a en rosetas formadas en la SNpc de animales lesionados con 6-OHDA(A-H), Sham(I-P) e intactos(Q-X), a 7 y 15 dpt. **A, E, I, M, Q, U.** Marcaje nuclear con DAPI (azul). **B, F, J, N, R, V.** Marcaje para Lmx1a (rojo). **C, G, K, O, S, W.** Marcaje para SC-121 (verde). **D, H, L, P, T, X.** Sobrelape de las imágenes de DAPI, SC-121 y Lmx1a. Barra de escala = 50  $\mu$ m. n=3.

## 7.9. Expresión de doblecortina (DCX) en trasplantes de H9-LFO.

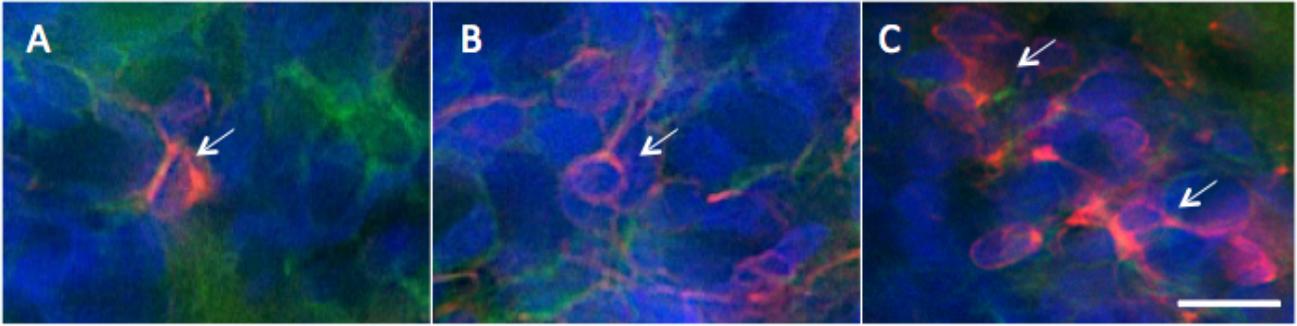
Con el objetivo de determinar si los cambios morfológicos observados en las rosetas Lmx1a+/Otx2+ en el transcurso de 7 a 15 dpt se deben al surgimiento de NSC con potencial más restringido y/o a la formación de neuronas, analizamos la expresión de la proteína DCX, un conocido marcador de neuroblastos y neuronas inmaduras (Moore *et al.*, 2004). DCX es una proteína de migración neuronal asociada a los microtúbulos y con un papel esencial en la neurogénesis durante el desarrollo embrionario y en el cerebro adulto (Francis *et al.*, 1999; Kappeler *et al.*, 2006).

Por inmunofluorescencia encontramos que la expresión de DCX se encuentra distribuida de manera heterogénea, ya que se puede observar de manera generalizada en algunas rosetas (Figura 18D, H y T, flechas blancas), mientras que otras no la expresan (Figura 18 L y P, puntas de flecha). Sin embargo, una observación interesante es que a 15 dpt en todos los grupos se observa un incremento en el marcaje de DCX, mayormente en células que ya no están conformando rosetas (Figura 19A-C). Adicionalmente, estas células DCX+ presentaban la apariencia característica de neuroblastos o neuronas jóvenes (Figura 19A-C) (Wang *et al.*, 2011). De acuerdo con esta observación se determinó que en cultivo, la diferenciación neural de células provenientes de CE ocurre a la par que la migración de las células en la roseta de la parte luminal a la basal y continua en la disolución de la roseta (P. Koch *et al.*, 2009).

Esta expresión heterogénea de DCX difirió de la observada con Otx2 y Lmx1a. Todos los resultados en conjunto sugerían la progresión de la roseta hacia la formación de precursores neurales y neuronas. Por lo tanto, llevamos nuestros estudios al análisis de la diferenciación neural a más largo plazo.



**Figura 18. Expresión de doblecortina (DCX) en la línea H9-LFO trasplantada en la SNpc.** Imágenes representativas a 40X de la expresión de DCX en rosetas formadas en la SNpc de animales lesionados con 6-OHDA (A-H), Sham (I-P) e intactos (Q-X), a 7 y 15 dpt. A, E, I, M, Q, U. Marcaje nuclear con DAPI (azul). B, F, J, N, R, V. Marcaje para DCX (rojo). C, G, K, O, S, W. Marcaje para SC-121 (verde). D, H, L, P, T, X. Sobrelape de las imágenes de DAPI, SC-121 y DCX. Barra de escala = 50  $\mu$ m. n=3.



**Figura 19. Morfología de células DCX+/SC-121+ de la línea H9-LFO trasplantada en la SNpc.** Imágenes representativas a magnificación 60X de que muestran la morfología neuronal de células que expresan DCX en las células trasplantadas en la SNpc de animales lesionados con 6-OHDA (**A**), Sham (**B**) y SNpc intacta(**C**) a 15 dpt. Imágenes del sobrelape de las señales de DAPI, SC-121 y DCX. Las flechas indican células DCX+/SC-121+ con morfología neuronal. Barra de escala = 25  $\mu$ m. n=3.

### 7.10. Diferenciación neuronal a 30 dpt.

Para determinar si las células de CE de la línea H9-LFO trasplantadas sobrevivían y diferenciaban hacia un linaje neuronal y específicamente al DAM, analizamos la expresión de los marcadores Otx2, DCX y TH en la SNpc de 7 ratas lesionadas con 6-OHDA a 30 dpt.

Observamos que las zonas Otx2+son escasas (Figura 20B,D) y que este FT está presente sólo en estructuras que parecen ser un remanente de una conformación columnar (Figura 20F, H). Se observó también la expresión homogénea de DCX en el trasplante (Figura 20J, L), que disminuye únicamente en las pocas zonas de morfología columnar (no se muestra el resultado). Una observación muy interesante, fue la expresión también homogénea de TH en neuronas que presentan proyecciones claras y que colocalizan con SC-121 (Figura 20N, P).

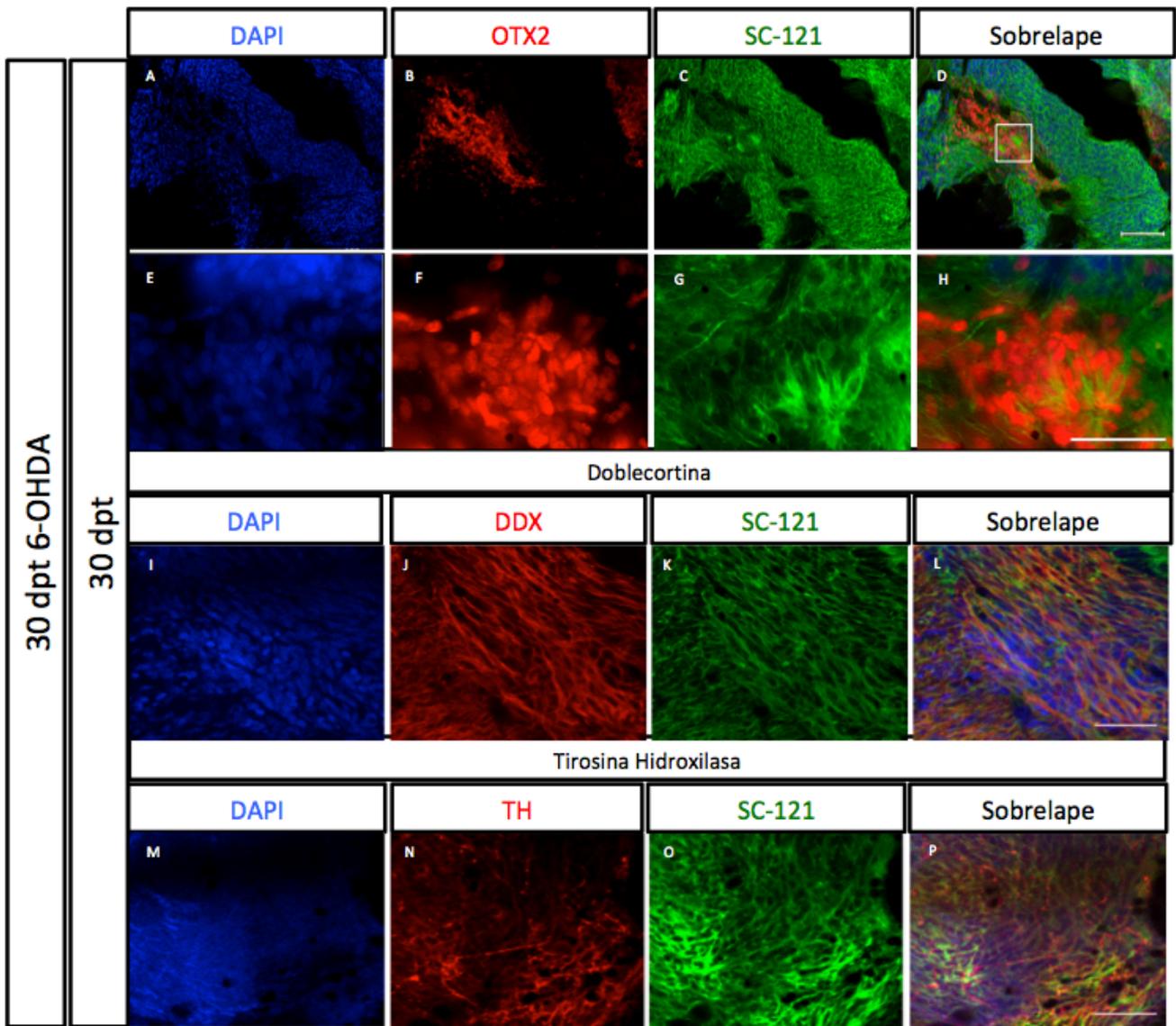


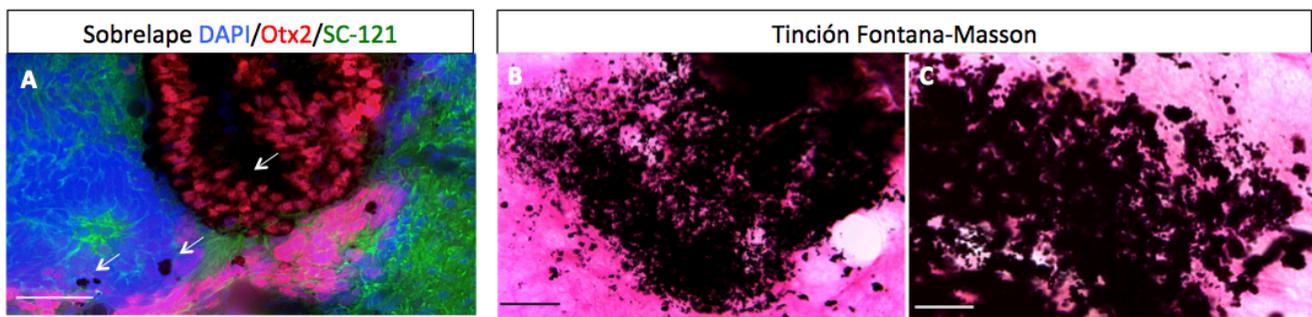
Figura 20. Expresión de Otx2, DCX y TH a 30 dpt en la línea H9-LFO trasplantada en la SNpc en el modelo de 6-OHDA. Imágenes representativas de: **A-D**. La expresión de Otx2 (**B, F**) es observada en una pequeña región dentro de estructuras con morfología similar a las rosetas neurales encontradas a 7 y 15 dpt. El recuadro en la imagen **D**. muestra la zona Otx2+ que es observada a mayor amplificación en **E-H**. **I-L**. La expresión de DCX (**J**) se observa en áreas extensas y en células con morfología neuronal. **M-P**. La expresión de TH (**N**) también se observa en células con morfología neuronal a lo largo de todo el trasplante. **A, E, I, M**. DAPI. **C, G, K, O**. SC-121. **D, H, L, P**. Sobrelape de las señales de DAPI, el marcador de diferenciación correspondiente y SC-121. La barra de escala en A-D indica 100  $\mu\text{m}$ , de E-P indica 50  $\mu\text{m}$ . n=3.

Sorprendentemente, en la mayoría de estos especímenes (5 de 7 ratas) también observamos por microscopía de epifluorescencia y confocal la presencia en las zonas del trasplante, de regiones oscuras que posterior al procesamiento del tejido por inmunofluorescencia se observaban en coloración negra (Figura 21A). Dadas estas características y la presencia de neuronas TH+, se sospechó que esta coloración podría ser neuromelanina (NM), un polímero pigmentado producido por las neuronas DAm de la SNpc (Fedorow *et al.*, 2005) y que es sintetizado a partir del mismo precursor que la dopamina, la L-DOPA (Chinta y Andersen 2005). Evidencia reciente relaciona esta molécula con posibles

roles fisiológicos vinculados con la EP (Youdim, Ben-Shachar, y Riederer 1994). Como parte de la neuropatología, estas células pigmentadas prácticamente desaparecen con la progresión de la enfermedad (Fedorow *et al.*, 2005).

Con el fin de establecer si esta pigmentación era NM, se efectuó una tinción de Fontana-Masson, la cual es específica para identificar gránulos de melanina y argentafines. La reacción se basa en la capacidad de estos gránulos para atrapar moléculas de plata y reducirlas a un estado metálico sin necesidad de un agente reductor. Por consiguiente, las células con melanina producen un precipitado negro insoluble (S. T. Kim *et al.*, 2006). En la Figura 21B y C, es posible observar pequeños puntos negros intracelulares que conformaban zonas negras en la zona de trasplante.

En conjunto, todos los resultados obtenidos indican que la línea H9-LFO diferencia al fenotipo dopaminérgico mesencefálico al trasplantarse en la SNpc.



**Figura 21. Coloración negra en la línea H9-LFO a 30 dpt.** Imágenes representativas de: **A.** Inmunofluorescencia para Otx2 (rojo), en la que se observa una zona de coloración negra (flecha). La imagen presenta el sobrelape de las señales de DAPI (azul), Otx2 (rojo) y SC-121 (verde). **B y C.** Tinción Fontana-Masson que permitió determinar la presencia de neuromelanina en diferentes zonas del trasplante. Barra de escala **A y B**= 50  $\mu$ m, **C** =  $\mu$ m. n=3.

## 8. Discusión

### 8.1. Estandarización del protocolo de cultivo de CTEh.

En este trabajo fue posible llevar a cabo la estandarización de un protocolo de cultivo manual de CTEh. Dicha estandarización fue una parte esencial de toda la metodología experimental, al ser la base de la obtención de la masa celular indiferenciada para poder responder la pregunta de investigación planteada en este proyecto.

La mayoría de los protocolos para el cultivo de CTEh consisten en el empleo de enzimas como colagenasa, tripsina, acutasa o dispasa para desprender las células de la matriz a la cual se encuentran adheridas y así efectuar el pasaje celular. Sin embargo, su uso origina baja sobrevivencia, células individualizadas y heterogeneidad en los cúmulos que se obtienen. Esto puede ocasionar cariotipos anormales (Beers *et al.*, 2013), entre los que se encuentran la aneuploidía cromosomal, especialmente la trisomía 12 y/o 17, conjuntamente con una expresión génica aberrante (Mitalipova *et al.*, 2005) y cambios epigenéticos (Badur, Zhang, y Metallo 2015). Además, se ha demostrado que el pasaje de CTEh empleando enzimas conduce a un decremento en el metabolismo de la glucosa celular junto con la atenuación de la lipogénesis, lo que repercute en el desempeño, metabolismo, y sobrevivencia de las líneas celulares (Badur, Zhang, y Metallo 2015).

Por todo lo anteriormente expresado y con el fin de mejorar las condiciones de cultivo de CTEh, en nuestro protocolo todos los medios, reactivos y procedimientos empleados, estuvieron encaminados a disminuir el estrés celular, mantener cúmulos de un tamaño (0.5 mm<sup>2</sup>) que permitiera la mayor expansión celular y fomentar su respuesta ante los tratamientos (ej. THZ), a la vez de evitar la disociación completa para coadyuvar en su conjunto al aumento de la sobrevivencia. Además, el pasaje celular se realizó por métodos no enzimáticos, con el fin de evitar posibles modificaciones cromosómicas o metabólicas (Badur, Zhang, y Metallo 2015). Este nuevo procedimiento se denominó “cultivo manual de CTEh”, debido a que el pasaje se realiza trazando surcos para su posterior recolección y depósito en una nueva caja, así como la remoción de partes de colonias diferenciadas o con inicios de diferenciación mediante el uso de una punta de pipeta. La estandarización involucró también probar diferentes condiciones (como confluencia celular, tamaño óptimo de las colonias para pasaje, área optima de cúmulos para su pasaje y criopreservación) así como realizar modificaciones en la concentración óptima de THZ en el pasaje y descongelación. A diferencia de los protocolos estándar (Health 2006) para mantener condiciones idóneas de pluripotencia, nuestro método, tiene como base el empleo de un medio químicamente definido (E8) y el modulador químico THZ. El medio esencial E8 (Preparación Apéndice A.III), contiene 8 componentes clave para la manutención metabólica de las CTEh, medio DMEM/F12, insulina, selenio, transferrina, ácido L-ascórbico, FGF2 y TGFb (Chen *et al.*, 2011); en particular el FGF2 y el TGFb mantienen la proliferación y la pluripotencia (Chen *et al.*, 2011). Por su parte, la THZ aumenta significativamente la sobrevivencia de células disociadas y ayuda al proceso de auto-renovación en condiciones

adherentes y no adherentes al promover la estabilidad de la E-cadherina y las interacciones célula-célula por medio de la inhibición de la vía de Rho-ROCK, que es normalmente sobre-regulada posterior a una disociación (Li *et al.*, 2013). Por ello, el empleo de este modulador químico era esencial en cada pasaje.

Existe en el mercado un nuevo medio de cultivo llamado “StemFlex”. Este medio es más empleado para evitar el estrés celular en un contexto de reprogramación, el pasaje unicelular para protocolos de diferenciación y la edición génica. Sin embargo, para fines de mantención de la pluripotencia, ambos medios parecen no tener diferencia. No obstante, faltarían estudios más detallados para su confirmación.

Es así que el protocolo de limpieza manual usado en este estudio permitió obtener colonias de CTEh indiferenciadas y definidas (con bordes definidos en crecimiento en monocapa) a través de varios pasajes (Badur, Zhang, y Metallo 2015), como lo mostró la morfología celular y la expresión del marcador Oct4+ en esas colonias. Esta validación permitió continuar los cultivos hacia la formación del CE, observando que ambas líneas eran capaces de formar CE y de diferenciar al menos al linaje mesodérmico y ectodérmico, restando por determinar si también son capaces de dirigirse al linaje endodérmico. Se encontraron problemas técnicos con el anticuerpo que no permitieron la evaluación del marcador de alfa-fetoproteína, por lo que se sugiere usar en un futuro el marcador específico de ese linaje beta-catenina (Darras *et al.* 2011).

## **8.2. Diferenciación neuronal y DA de la línea H9-LFO implantada en la SNpc.**

Aunque no se observaron diferencias entre ambas líneas en cuanto a morfología, pluripotencia y diferenciación hacia 2 linajes de capas germinales en las pruebas *in vitro*, el análisis de los trasplantes indica que la línea H9-LFO tiene la capacidad de sobrevivir en el tejido hospedero, contrario a lo que sucede con la H9-PC. El 85% de los trasplantes de la línea H9-LFO sobrevive en la SNpc independientemente del grupo trasplantado, tanto a 7 como a 15 dpt, mientras que con la línea H9-PC, se observa muerte celular en el 86% de las ratas trasplantadas (6/7 especímenes). Estos resultados apuntan a que la inserción de los FT Lmx1a, FoxA2 y Otx2 provee a las células provenientes de CE la capacidad para sobrevivir al ser trasplantadas en la SNpc de ratas lesionadas con 6-OHDA e intactas. En todas las observaciones efectuadas mediante inmunofluorescencia, se observa la presencia de una coloración amarilla en la zona del trasplante, probablemente debido a la presencia del

pigmento lipofuscina (subproducto de la oxidación de ácidos grasos insaturados), el cual indica degeneración membranal (Di Guardo 2015). Más aún, al efectuar la tinción histológica de H&E, se encontraron células con fragmentación de la membrana nuclear. Ambos resultados sugieren que se está llevando a cabo un proceso de apoptosis en las células H9-PC trasplantadas.

La presencia de rosetas neurales en la línea H9-LFO fue sin duda un hallazgo sorprendente, al tratarse de una estructura elemental para la diferenciación neuronal, ya que en el desarrollo embrionario normal esta estructura mimetiza al cierre del tubo neural. En los protocolos de diferenciación a partir de cultivos de CTEh estas son inducidas con el fin de promover una alta tasa de diferenciación hacia diferentes linajes neuronales y normalmente se utiliza el marcador ZO-1 para identificar las estructuras formadas (Gallegos-Cárdenas *et al.*, 2015; Wilson y Stice 2006; Malchenko *et al.*, 2014). Esta proteína se encuentra en el lumen de las rosetas, lo que evidencia formaciones con las mismas características reportadas *in vitro*, señalando que estos arreglos son especialmente receptivos a morfógenos (Elkabetz *et al.*, 2008) y señalizaciones de regionalización (Philipp Koch *et al.*, 2009).

En el proceso de formación de las rosetas neurales, las células neuroepiteliales pasan por diferentes estadios. En primer lugar, se da un intercalado entre el conglomerado celular que dará origen a la roseta. Después, se constriñe y se polariza hacia la zona apical (centro de la roseta). Finalmente, las células se alargan para dar lugar al lumen en el área apical. Cuando las rosetas se diferencian hacia un linaje neuronal más específico migran desde el lumen hacia la parte basal (periferia) de la roseta (Gallegos-Cárdenas *et al.*, 2015). Asimismo el neuroepitelio se engrosa por proliferación mitótica donde el núcleo de las células en interface se encuentra distal al lumen cerca de la superficie externa (Wilson y Stice 2006). De manera similar, durante la formación de rosetas neurales en cultivo, prácticamente todos los núcleos celulares se orientan hacia la parte basal y muy pocos a la parte luminal, recapitulando el desarrollo embrionario (Wilson y Stice 2006). Recientemente se describió que la formación de las rosetas neurales involucra 5 pasos distintivos por su morfología y movimiento celular (Hribkova *et al.*, 2018). En la etapa 5 de formación del lumen y que representa el estado más avanzado, las células expresan ZO-1 en la parte apical (lumen). Esta morfología, junto con la expresión del marcador ZO-1 es apreciable en las rosetas formadas en todos nuestros grupos de estudio, lo cual nos lleva a proponer que a 7 dpt

observamos rosetas neurales “maduras”. También se describió que al diferenciar a neuronas, las células contenidas en las rosetas migran hacia la parte basal modificando su morfología hasta perderse la estructura columnar característica (Gallegos-Cárdenas *et al.*, 2015). Por lo tanto, si las células se estuvieran diferenciado a neuronas, a mayores tiempos post-trasplante prácticamente ya no se encontrarían estas formaciones. Lo que observamos en nuestro estudio es que a 30 dpt, los trasplantes no presentaban rosetas neurales y en su lugar las células tenían morfología de neuroblasto. Es notable que en las células provenientes de CE trasplantadas observamos estos cambios morfológicos significativos que incluyen la formación de rosetas neurales, que marcan el inicio de la diferenciación neural y su posterior migración fuera de estas estructuras. Adicionalmente, esta morfología de progresión hacia la diferenciación neuronal correlaciona con los perfiles de expresión tanto de *Otx2* como de *Lmx1a* (marcadores tempranos del destino DAM), que a 7 dpt se encuentran prácticamente en todas las células de las rosetas para posteriormente disminuir su expresión (15 dpt). Además, observamos un incremento progresivo en la expresión de DCX, proteína clave en la migración celular.

Es interesante hacer notar que este resultado es contrario al obtenido previamente en el laboratorio, en donde células disgregadas de CE de ratón (línea celular sin sobreexpresión de estos FT) y trasplantadas en la SNpc intacta de ratas, la expresión de DCX incrementaba en el periodo de 7 a 15 dpt. Sin embargo, a los 30 dpt ésta disminuía casi por completo (Maya-Espinosa *et al.*, 2015). Este resultado parece indicar que los CE provenientes de CTEh tienen un rezago en el proceso de diferenciación en comparación a las de CE de ratón, aunque requerimos analizar marcadores neurales y neuronales para interpretar de manera concluyente el estado de maduración. Sin embargo, hay que señalar que a 30 dpt observamos un importante número de células expresando TH, el marcador por excelencia de la diferenciación DA. Aunque es necesario realizar la cuantificación de las células TH+, así como evaluar la expresión de otros marcadores del fenotipo DAM, las evidencias presentadas indican que los 3 FT sobre-expresados, son también indispensables para la diferenciación neuronal DAM de CE generados a partir de CTEh.

En ese mismo sentido, otro hallazgo muy interesante fue el observar la capacidad de síntesis de neuromelanina por parte de las células trasplantadas. Este pigmento negro es producido naturalmente por poblaciones específicas de neuronas catecolinérgicas en el cerebro, más específicamente, las neuronas DAM de la SNpc. En el caso de la EP, este

pigmento se pierde casi en su totalidad en pacientes afectados por esta enfermedad, lo cual señala su importancia en células con este fenotipo, a la par de resaltar la relevancia de que las células H9-LFO tengan el potencial de generar este subproducto derivado de la misma vía de síntesis de la enzima TH (Fedorow *et al.*, 2005; Youdim, Ben-Shachar, y Riederer 1994; Chinta y Andersen 2005).

Es importante destacar que este trabajo evidencia la capacidad que tienen los CE derivados de una línea de CTEh de recibir estímulos provenientes del nicho y responder a ellos como demostramos que ocurre con los CE provenientes de ratón (Maya-Espinosa *et al.*, 2015), pero ahora diferenciando a células TH+ debido a la sobre-expresión de 3 FT. A su vez, nuestros resultados sugieren que la SNpc es permisiva a la diferenciación neuronal DAM y con ello proveemos nuevas evidencias de que esta estructura puede ser considerada un blanco para la terapia celular en la EP, como lo postulamos anteriormente (Maya-Espinosa *et al.*, 2015).

## 9. Conclusiones

---

- Ambas líneas celulares (H9-LFO y H9-PC), bajo las condiciones establecidas de cultivo celular presentan características de pluripotencia (en colonias), capacidad de formación de CE y diferenciación hacia ectodermo y mesodermo (CE de 4 dpp).
- La línea H9-LFO trasplantada en cúmulos en la SNpc de ratas lesionadas, Sham y SN intacta tiene la capacidad de sobrevivir, iniciar el proceso de diferenciación neural, probablemente DAM, a través de la formación de rosetas neurales Otx2+/Lmx1a+/DCX+ y a 7 y 15 dpt y a 30 dpt dirigirse hacia el fenotipo DAM(células TH+ y expresando neuromelanina). Lo anteriormente indica que la SNpc es un nicho permisivo para la diferenciación neuronal y DA de la línea H9-LFO.
- En contraste, la línea control H9-PC, presentó una baja sobrevivencia y en consecuencia una nula diferenciación. Por lo tanto, los FT son clave tanto para la diferenciación como para la sobrevivencia.

## 10. Perspectivas

---

- Efectuar los trasplantes de la línea H9-LFO de los grupos Sham para lesión y Sham intacta a 30 dpt y de todos los grupos a largo plazo (2 meses).
- Efectuar pruebas de comportamiento para analizar las posibles diferencias conductuales a largo plazo.

### **I. Medio para células alimentadoras.**

Para la elaboración de 500 ml de este medio se empleó como base 432.5 ml DMEM alto en glucosa (Thermo Fisher, SH30081.02) y se complementó con: 50 ml de suero fetal bovino inactivado (Thermo Fisher, 30910.03), glutamax (Thermo Fisher, 35050-061) y aminoácidos no esenciales 100X (5 ml de cada uno, Thermo Fisher, 11140 050) y penicilina-estreptomicina 100X (Thermo Fisher, 15140-122), Piruvato de sodio (2.5 ml cada uno).

### **II. Medio para CTEh**

Para 500 ml de este medio se empleó como base 389.5 ml de DMEM/F12 (Thermo Fisher, 11320-082) y se complementó con 100 ml de suero de reemplazo (Thermo Fisher, 10828-028), 5 ml de aminoácidos no esenciales 100X (Thermo Fisher, 11140 050), y 2.5 ml de penicilina-estreptomicina (Thermo Fisher, 15140-122) y glutamax c/u, (Thermo Fisher, 35050-061), así como 0.5 ml de beta mercaptoetanol (Thermo Fisher, 21985-025) y 30 µl de FGF2 (Peprotech, 100-18 B).

### **III. Medio E8**

Para 500 ml de medio E8, se emplearon 487.5 ml de medio básico E8 (Thermo Fisher, A14666SA), 2.5 ml de penicilina- estreptomicina (Thermo Fisher, 15140-122) y 10 ml de suplemento de E8.

### **IV. Preparación de la solución de gelatina al 0.1%**

Para la preparación de 100 ml de gelatina de porcino (Sigma, G2500) en agua con dietilpirocarbonato (DEPC) se requiere un tiempo total de preparación de 1.5 días. El primer día, a 99.9 ml de agua desionizada (no estéril) se le adicionaron 0.1 ml de DEPC con base al cálculo siguiente:

$$( 100ml \times \left( \frac{0.1\%}{100} \right) = 0.1ml \frac{1000\mu l}{1ml} = 100\mu l \text{ de DEPC } )$$

Posteriormente, se mezcló mediante agitación vigorosa y se dejó reposar por lo menos 12 horas. El día siguiente se preparó el equipo para la esterilización y se pesó 0.1% p/p de gelatina de porcino con base al cálculo siguiente:

$$100 \text{ ml} \left\langle \frac{1 \text{ g}}{1 \text{ ml}} \right\rangle \times \frac{0.1\%}{100} = 0.1 \text{ g de gelatina de porcino}$$

Se adicionó al agua previamente tratada con DEPC y se inició el ciclo de esterilización para eliminar el DEPC.

## V. Preparación de mitomicina

Para la preparación de la solución de almacenamiento a partir de mitomicina de 2 mg (Sigma, M4287-2MG), se empleó como solvente agua desionizada con base al siguiente calculo:

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

$$(2 \text{ mg}) \times V_1 = \left[ \frac{0.5 \text{ mg}}{\text{ml}} \right] \times \frac{[1 \text{ ml}]}{1}$$

$$V_1 = \left[ \frac{0.5 \text{ mg}}{\text{ml}} \left| \frac{1}{2 \text{ mg}} \right| = \frac{0.25}{\text{ml}} \therefore \frac{1}{0.25 \text{ ml}} = 4 \text{ ml} \right]$$

Por lo tanto, para la solución de almacenamiento se disolvieron los 2 mg en 4 ml de agua desionizada estéril.

Para mitomizar las células se agregaron 40  $\mu$ l de mitomicina (solución de almacenamiento, 0.5 mg/ml) a 960  $\mu$ l de medio para MEFs para alcanzar una concentración de trabajo de 20  $\mu$ g/ml en base al siguiente calculo:

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2 \quad \therefore \quad \frac{0.5 \text{ mg}}{\text{ml}} \times V_i = \frac{20 \mu\text{g}}{\text{ml}} \times 1 \text{ ml} \quad \therefore \quad V_i = \frac{20 \mu\text{l}}{\text{ml}} \times \frac{1 \text{ ml}}{1} \times \frac{\text{ml}}{500 \mu\text{g}}$$

$$= 0.04 \text{ ml} \frac{1000 \mu\text{l}}{1 \text{ ml}}$$

$$V_i = 40 \mu\text{l}$$

## **VI. Preparación de bFGF**

Se reconstituyó con 100  $\mu$ l de 10 mM Tris y 0.1 % BSA, pH 7.6 para una concentración del stock de 100  $\mu$ l/ml de bFGF (Peprotech, 100-18 B) a sugerencia del fabricante. Se dividió en alícuotas de 10  $\mu$ l y estas se mantuvieron a -20°C hasta su uso.

## **VII. Preparación de soluciones de PBS 0.2 y 0.1 M (1L)**

A un vaso de precipitado se le agregaron 920-950 ml de agua desionizada, posteriormente se solvataron en agitación constante, 58 g de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (JT Baker, 3818-01) y 5.24 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  (JT Baker, 3822-01) hasta homogenización completa. Posteriormente, se ajustó el pH a  $7.3 \pm 0.1$  y se aforó a 1L. Finalmente, para la preparación de PBS 0.1M se realizó una dilución 1:2 del PBS 0.2 M y se filtró.

## **VIII. Para formaldehído al 4% p/v (1L)**

A un vaso de precipitado con 500 ml de agua desionizada a 65°C se le agregaron 40 g de para formaldehído (Sigma, 30525-89-4) hasta su completa homogenización. Para ello, es necesario basificar el solvente, por lo que se adicionó en goteo lento una solución de NaOH 10N (JT Baker, 3724-01) hasta clarificación. Finalmente, se dejó enfriar y se le agregaron 400-450 ml de PBS 0.2M, se ajustó el pH a  $7.3 \pm 0.1$  y se filtró.

## **IX. Soluciones de sacarosa 10, 20, 30% p/v en PBS 0.1 M (1L)**

Para las soluciones de sacarosa (Sigma, 57-50-1) de 10, 20, 30% se pesaron 100, 200, 300 g de sacarosa para las diferentes concentraciones y se completó el volumen empleando PBS 0.1 M.

## **X. Preparación de PBS para inmunofluorescencia (PBSi, 1L)**

En un vaso de precipitado con 950 ml de agua desionizada se adicionaron 8 g de NaCl (JT Baker, 3624-01), 2.9 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ , 0.2 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (JT Baker, 3246-01) y 0.2 g de KCl (JT Baker, 3624-01) y se inició agitación constante. Se esperó hasta solvatación completa de las sales, se ajustó el pH a  $7.3 \pm 0.1$  y se filtró.

## Bibliografía

---

- Amit, Michal, Melissa K. Carpenter, Margaret S. Inokuma, Choy Pik Chiu, Charles P. Harris, Michelle A. Waknitz, Joseph Itskovitz-Eldor, and James A. Thomson. 2000. "Clonally Derived Human Embryonic Stem Cell Lines Maintain Pluripotency and Proliferative Potential for Prolonged Periods of Culture." *Developmental Biology* 227 (2): 271–78. <https://doi.org/10.1006/dbio.2000.9912>.
- Andersson, Elisabet, Ulrika Tryggvason, Qiaolin Deng, Stina Friling, Zhanna Alekseenko, Benoit Robert, Thomas Perlmann, and Johan Ericson. 2006. "Identification of Intrinsic Determinants of Midbrain Dopamine Neurons," 393–405. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.10.037>.
- Arcot, Santosh S, Erik K Flemingtons, and L Deiningerj. 1989. "The Human Thymidine Kinase Gene Promoter." *Biochemistry*.
- Arenas, E., M. Denham, and J. C. Villaescusa. 2015. "How to Make a Midbrain Dopaminergic Neuron." *Development* 142 (11): 1918–36. <https://doi.org/10.1242/dev.097394>.
- Badur, Mehmet G., Hui Zhang, and Christian M. Metallo. 2015. "Enzymatic Passaging of Human Embryonic Stem Cells Alters Central Carbon Metabolism and Glycan Abundance." *Biotechnology Journal* 10 (10): 1600–1611. <https://doi.org/10.1002/biot.201400749>.
- Beers, Jeanette, Daniel R Gulbranson, Nicole George, Lauren I Siniscalchi, Jeffrey Jones, James A Thomson, and Goukai Chen. 2013. "Passaging and Colony Expansion of Human Pluripotent Stem Cells by Enzyme-Free Dissociation in Chemically Defines Culture Conditions." *NIH-PA Author Manuscript* 7 (11): 2029–40. <https://doi.org/10.1038/nprot.2012.130.Passaging>.
- Boronat-García, Alejandra, Magdalena Guerra-Crespo, and René Drucker-Colín. 2017. "Historical Perspective of Cell Transplantation in Parkinson's Disease." *World Journal of Transplantation* 7 (3): 179. <https://doi.org/10.5500/wjt.v7.i3.179>.
- Cai, Jingli, Angela Donaldson, Ming Yang, Michael S German, Grigori Enikolopov, and Lorraine Iacovitti. 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 (1): 220–29.

<https://doi.org/10.1634/stemcells.2008-0734>.

- Cervantes-Arriaga, Amin, Mayela Rodríguez-Violante, Minverva López-Ruiz, and Ingrid Estrada-Bellmann. 2013. "Caracterización de La Enfermedad de Parkinson En México: Estudio ReMePARK." *Gaceta Médica de México* 149: 497–501.
- Chaddah, R, M Arntfield, S Runciman, L Clarke, and D van der Kooy. 2012. "Clonal Neural Stem Cells from Human Embryonic Stem Cell Colonies." *J Neurosci* 32 (23): 7771–81. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3286-11.2012>.
- Chen, Guokai, Daniel R Gulbranson, Zhonggang Hou, Jennifer M Bolin, Mitchell D Probasco, Kimberly Smuga-otto, Sara E Howden, et al. 2011. "Chemically Defined Conditions for Human iPS Cell Derivation and Culture." *Nature Methods* 8 (5): 424–29. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1593>.Chemically.
- Chinta, Shankar J., and Julie K. Andersen. 2005. "Dopaminergic Neurons." *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 37 (5): 942–46. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2004.09.009>.
- Conner, David A. 2001. "Mouse Embryonic Stem (ES) Cell Culture." In *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, Inc. <https://doi.org/10.1002/0471142727.mb2303s51>.
- Darras, Sébastien, John Gerhart, Mark Terasaki, Marc Kirschner, and Christopher J Lowe. 2011. "β-Catenin Specifies the Endomesoderm and Defines the Posterior Organizer of the Hemichordate *Saccoglossus Kowalevskii*." *Development (Cambridge, England)* 138 (5). Company of Biologists: 959–70. <https://doi.org/10.1242/dev.059493>.
- Elkabetz, Yechiel, Georgia Panagiotakos, George Al Shamy, Nicholas D. Socci, Viviane Tabar, and Lorenz Studer. 2008. "Human ES Cell-Derived Neural Rosettes Reveal a Functionally Distinct Early Neural Stem Cell Stage." *Genes and Development* 22 (2): 152–65. <https://doi.org/10.1101/gad.1616208>.
- Fedorow, H., F. Tribi, G. Halliday, M. Gerlach, P. Riederer, and K. L. Double. 2005. "Neuromelanin in Human Dopamine Neurons: Comparison with Peripheral Melanins and Relevance to Parkinson's Disease." *Progress in Neurobiology* 75 (2): 109–24. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2005.02.001>.
- Ferri, Anna L M, Wei Lin, Yannis E Mavromatakis, Julie C Wang, Hiroshi Sasaki, Jeffrey a Whitsett, and Siew-Lan Ang. 2007. "Foxa1 and Foxa2 Regulate Multiple Phases of Midbrain Dopaminergic Neuron Development in a Dosage-Dependent Manner." *Development (Cambridge, England)* 134 (15): 2761–69.

<https://doi.org/10.1242/dev.000141>.

- Francis, Fiona, Annette Koulakoff, Dominique Boucher, Philippe Chafey, Bruce Schaar, Marie Claude Vinet, Gaëlle Friocourt, et al. 1999. "Doublecortin Is a Developmentally Regulated, Microtubule-Associated Protein Expressed in Migrating and Differentiating Neurons." *Neuron* 23 (2): 247–56. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80777-1](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80777-1).
- Freed, Curt R., Wenbo Zhou, and Robert E. Breeze. 2011. "Dopamine Cell Transplantation for Parkinson's Disease: The Importance of Controlled Clinical Trials." *Neurotherapeutics* 8 (4): 549–61. <https://doi.org/10.1007/s13311-011-0082-9>.
- Freed, Curt R, Paul E Greene, Robert E Breeze, Wei-Yann Tsai, William DuMouchel, Richard Kao, Sandra Dillon, et al. 2001. "Transplantation of Embryonic Dopamine Neurons for Severe Parkinson's Disease." *The New England Journal of Medicine* 344 (10): 710–19.
- Friling, S., E. Andersson, L. H. Thompson, M. E. Jonsson, J. B. Hebsgaard, E. Nanou, Z. Alekseenko, et al. 2009. "Efficient Production of Mesencephalic Dopamine Neurons by Lmx1a Expression in Embryonic Stem Cells." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106 (18): 7613–18. <https://doi.org/10.1073/pnas.0902396106>.
- Gaillard, Afsaneh, and Mohamed Jaber. 2011. "Rewiring the Brain with Cell Transplantation in Parkinson's Disease." *Trends in Neurosciences* 34 (3): 124–33. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2011.01.003>.
- Gale, Emily, and Meng Li. 2008. "Midbrain Dopaminergic Neuron Fate Specification: Of Mice and Embryonic Stem Cells." *Molecular Brain* 1 (1): 8. <https://doi.org/10.1186/1756-6606-1-8>.
- Gallegos-Cárdenas, Amalia, Robin Webb, Erin Jordan, Rachel West, Franklin D. West, Jeong-Yeh Yang, Kai Wang, and Steven L. Stice. 2015. "Pig Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Neural Rosettes Developmentally Mimic Human Pluripotent Stem Cell Neural Differentiation." *Stem Cells and Development* 24 (16): 1901–11. <https://doi.org/10.1089/scd.2015.0025>.
- Gibco, life technologies. 2012. "Formation of Embryoid Bodies ( EBs ) from Mouse Embryonic Stem Cells ( mESCs )." *Protocols and Methods*, no. August.
- Grealish, Shane, Elsa Diguët, Agnete Kirkeby, Bengt Mattsson, Andreas Heuer, Yann Bramouille, Nadja Van Camp, et al. 2014. "Human ESC-Derived Dopamine Neurons Show Similar Preclinical Efficacy and Potency to Fetal Neurons When Grafted in a Rat Model of Parkinson's Disease." *Cell Stem Cell* 15 (5): 653–65. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2014.09.017>.

- Guardo, G Di. 2015. "Lipofuscin, Lipofuscin-Like Pigments and Autofluorescence." *European Journal of Histochemistry : EJH* 59 (1). PAGEPress Publications, Pavia, Italy: 2485. <https://doi.org/10.4081/ejh.2015.2485>.
- Health, National Institutes of. 2006. "Regenerative Medicine 2006." *National Institutes of Health*, 1–106. [papers2://publication/uuid/05ECFE2C-F165-4F6C-8222-FCE8CDB6A13C](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16544622/).
- Hegarty, Shane V., Aideen M. Sullivan, and Gerard W. O'Keeffe. 2013. "Midbrain Dopaminergic Neurons: A Review of the Molecular Circuitry That Regulates Their Development." *Developmental Biology* 379 (2). Elsevier: 123–38. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2013.04.014>.
- Jargin, Sergei V. 2010. *Stem Cells and Cell Therapy. Cell Engineering & Engineering* 8. Vol. 117. <https://doi.org/10.1159/000322147>.
- Jensen, Matthew B, Rajeev Krishnaney-Davison, Laura K. Cohen, and Su-Chun (University of Wisconsin (Department of Neurology)) Zhang. 2014. "Injected Versus Oral Cyclosporine for Human Neural Progenitor Grafting in Rats." *J Stem Cell Res Ther*. <https://doi.org/10.4172/2157-7633.S10-003>.Injected.
- Jeong, Y. 2003. "Distinct Regulators of Shh Transcription in the Floor Plate and Notochord Indicate Separate Origins for These Tissues in the Mouse Node." *Development* 130 (16): 3891–3902. <https://doi.org/10.1242/dev.00590>.
- Kappeler, Caroline, Yoann Saillour, Jean Pierre Baudoin, Françoise Phan Dinh Tuy, Chantal Alvarez, Christophe Houbron, Patricia Gaspar, et al. 2006. "Branching and Nucleokinesis Defects in Migrating Interneurons Derived from Doublecortin Knockout Mice." *Human Molecular Genetics* 15 (9): 1387–1400. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddl062>.
- Kele, Julianna, Nicolas Simplicio, Anna L M Ferri, Helena Mira, François Guillemot, Ernest Arenas, and Siew-Lan Ang. 2006. "Neurogenin 2 Is Required for the Development of Ventral Midbrain Dopaminergic Neurons." *Development* 133 (3): 495 LP-505. <http://dev.biologists.org/content/133/3/495.abstract>.
- Kim, Dae Sung, Dongjin R. Lee, Han Soo Kim, Jeong Eun Yoo, Sung Jun Jung, Bo Young Lim, Jiho Jang, et al. 2012. "Highly Pure and Expandable PSA-NCAM-Positive Neural Precursors from Human ESC and iPSC-Derived Neural Rosettes." *PLoS ONE* 7 (7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0039715>.
- Kim, Sung Tae, Ji Hyun Choi, DongHou Kim, and Onyou Hwang. 2006. "Increases in TH Immunoreactivity, Neuromelanin and Degeneration in the Substantia Nigra of Middle

- Aged Mice.” *Neuroscience Letters* 396 (3): 263–68.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.neulet.2005.11.053>.
- Kobl, B., Whishaw, I.Q. 2006. “Trastornos Neurológicos.” *Neuropsicología Humana*, 706–8.
- Koch, P., T. Opitz, J. A. Steinbeck, J. Ladewig, and O. Brustle. 2009. “A Rosette-Type, Self-Renewing Human ES Cell-Derived Neural Stem Cell with Potential for in Vitro Instruction and Synaptic Integration.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106 (9): 3225–30. <https://doi.org/10.1073/pnas.0808387106>.
- Koch, Philipp, Thoralf Opitz, Julius A Steinbeck, Julia Ladewig, and Oliver Brüstle. 2009. “A Rosette-Type, Self-Renewing Human ES Cell-Derived Neural Stem Cell with Potential for in Vitro Instruction and Synaptic Integration.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (9): 3225–30.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.0808387106>.
- Kriks, S, J W Shim, J Piao, Y M Ganat, D R Wakeman, Z Xie, L Carrillo-Reid, et al. 2011. “Dopamine Neurons Derived from Human ES Cells Efficiently Engraft in Animal Models of Parkinson’s Disease.” *Nature* 480 (7378): 547–51.  
<https://doi.org/10.1038/nature10648>; [10.1038/nature10648](https://doi.org/10.1038/nature10648).
- Li, Wenlin, Ke Li, Wanguo Wei, and Sheng Ding. 2013. “Chemical Approaches to Stem Cell Biology and Therapeutics.” *Cell Stem Cell* 13 (3). Nature Publishing Group: 270–83.  
<https://doi.org/10.1016/j.stem.2013.08.002>.
- Lin, Wei, Emmanouil Metzakopian, Yannis E Mavromatakis, Nan Gao, Nikolaos Balaskas, Hiroshi Sasaki, James Briscoe, et al. 2009. “Foxa1 and Foxa2 Function Both Upstream of and Cooperatively with Lmx1a and Lmx1b in a Feedforward Loop Promoting Mesodiencephalic Dopaminergic Neuron Development.” *Developmental Biology* 333 (2): 386–96. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2009.07.006>.
- Lin, Yongshun, and Guokai Chen. 2014. “Embryoid Body Formation from Human Pluripotent Stem Cells in Chemically Defined E8 Media.” *Stembook.Org*, 1–4.  
<https://doi.org/10.3824/stembook.1.98.1.1>.
- Malchenko, Sergey, Jianping Xie, Maria de Fatima Bonaldo, Elio F. Vanin, Bula J. Bhattacharyya, Abdelhak Belmadani, Guifa Xi, et al. 2014. “Onset of Rosette Formation during Spontaneous Neural Differentiation of hESC and hiPSC Colonies.” *Gene* 534 (2). Elsevier B.V.: 400–407. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2013.07.101>.
- Matsunaga, Eiji, Tatsuya Katahira, and Harukazu Nakamura. 2002. “Role of Lmx1b and Wnt1 in Mesencephalon and Metencephalon Development.” *Development* 129 (22): 5269 LP-

5277. <http://dev.biologists.org/content/129/22/5269.abstract>.

- Maya-Espinosa, Guadalupe, Omar Collazo-Navarrete, Diana Millán-Aldaco, Marcela Palomero-Rivero, Gilda Guerrero-Flores, René Drucker-Colín, Luis Covarrubias, and Magdalena Guerra-Crespo. 2015. "Mouse Embryonic Stem Cell-Derived Cells Reveal Niches That Support Neuronal Differentiation in the Adult Rat Brain." *Stem Cells (Dayton, Ohio)* 33 (2): 491–502. <https://doi.org/10.1002/stem.1856>.
- Mitalipova, Maisam M, Raj R Rao, Deborah M Hoyer, Julie a Johnson, Lorraine F Meisner, Karen L Jones, Stephen Dalton, and Steven L Stice. 2005. "Preserving the Genetic Integrity of Human Embryonic Stem Cells." *Nature Biotechnology* 23 (1): 19–20. <https://doi.org/10.1038/nbt0105-19>.
- Moores, Carolyn A., Mylène Perderiset, Fiona Francis, Jamel Chelly, Anne Houdusse, and Ronald A. Milligan. 2004. "Mechanism of Microtubule Stabilization by Doublecortin." *Molecular Cell* 14 (6): 833–39. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2004.06.009>.
- Mulligan, Kimberly A, and Benjamin N R Cheyette. 2012. "Wnt Signaling in Vertebrate Neural Development and Function." *Journal of Neuroimmune Pharmacology* 7 (4): 774–87. <https://doi.org/10.1007/s11481-012-9404-x>.
- Olanow, C Warren, Christopher G Goetz, Jeffrey H Kordower, a Jon Stoessl, Vesna Sossi, Mitchell F Brin, Kathleen M Shannon, et al. 2003. "A Double-Blind Controlled Trial of Bilateral Fetal Nigral Transplantation in Parkinson ' S Disease." *Annals of Neurology*, 403–14. <https://doi.org/10.1002/ana.10720>.
- Omodei, Daniela, Dario Acampora, Pietro Mancuso, Nilima Prakash, Luca Giovanni Di Giovannantonio, Wolfgang Wurst, and Antonio Simeone. 2008. "Anterior-Posterior Graded Response to Otx2 Controls Proliferation and Differentiation of Dopaminergic Progenitors in the Ventral Mesencephalon." *Development* 135 (20): 3459 LP-3470. <http://dev.biologists.org/content/135/20/3459.abstract>.
- Ono, Y., T. Nakatani, Y. Sakamoto, E. Mizuhara, Y. Minaki, M. Kumai, A. Hamaguchi, et al. 2007. "Differences in Neurogenic Potential in Floor Plate Cells along an Anteroposterior Location: Midbrain Dopaminergic Neurons Originate from Mesencephalic Floor Plate Cells." *Development* 134 (17): 3213–25. <https://doi.org/10.1242/dev.02879>.
- Paxinos, George, and Charles Watson. 2007. "The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates BT - 123Library." In , 6th ed. Academic Press.
- Perlow, M J, W J Freed, B J Hoffer, A Seiger, L Olson, and R J Wyatt. 1979. "Brain Grafts Reduce Motor Abnormalities Produced by Destruction of Nigrostriatal Dopamine

System.” *Science* 204 (4393): 643 LP-647.

<http://science.sciencemag.org/content/204/4393/643.abstract>.

Pettinato, Giuseppe, Xuejun Wen, and Ning Zhang. 2014. “Formation of Well-Defined Embryoid Bodies from Dissociated Human Induced Pluripotent Stem Cells Using Microfabricated Cell-Repellent Microwell Arrays.” *Scientific Reports* 4: 7402.

<https://doi.org/10.1038/srep07402>.

Politis, Marios, and Olle Lindvall. 2012. “Clinical Application of Stem Cell Therapy in Parkinson ’ S Disease,” 1–8.

Rangel-barajas, Claudia Flóran-Garduño, Benjamin. 2005. “Activación de Receptores.” *Rev Biomed* 16 (2508): 273–80.

Sánchez-Danés, a., A Consiglio, Y Richaud, I. Rodríguez-Pizà, B. Dehay, M. Edel, J. Bové, et al. 2012. “Efficient Generation of A9 Midbrain Dopaminergic Neurons by Lentiviral Delivery of LMX1A in Human Embryonic Stem Cells and Induced Pluripotent Stem Cells.” *Human Gene Therapy* 23 (1): 56–69. <https://doi.org/10.1089/hum.2011.054>.

Sathananthan, A. Henry. 2011a. “Neural Stem Cells in Neurospheres, Embryoid Bodies, and Central Nervous System of Human Embryos.” *Microscopy and Microanalysis* 17 (4): 520–27. <https://doi.org/10.1017/S1431927611000584>.

Sathananthan, A Henry. 2011b. “M Icroscopy M Icroanalysis Neural Stem Cells in Neurospheres , Embryoid Bodies , and Central Nervous System of Human Embryos,” no. July 2011: 520–27. <https://doi.org/10.1017/S1431927611000584>.

Smits, Simone M, Tiia Ponnio, Orla M Conneely, J Peter H Burbach, and Marten P Smidt. 2003. “Involvement of Nurr1 in Specifying the Neurotransmitter Identity of Ventral Midbrain Dopaminergic Neurons.” *European Journal of Neuroscience* 18 (7). Blackwell Science, Ltd: 1731–38. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2003.02885.x>.

Thomson, James A, Joseph Itskovitz-Eldor, Sander S Shapiro, Michelle A Waknitz, Jennifer J Swiergiel, Vivienne S Marshall, and Jeffrey M Jones. 1998. “Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts.” *Science* 282 (5391): 1145 LP-1147.

<http://science.sciencemag.org/content/282/5391/1145.abstract>.

Uchida, Nobuko, Kevin Chen, Monika Dohse, Kelly D Hansen, Justin Dean, Joshua R Buser, Art Riddle, et al. 2012. “Human Neural Stem Cells Induce Functional Myelination in Mice with Severe Dysmyelination.” *Science Translational Medicine* 4 (155):

10.1126/scitranslmed.3004371. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3004371>.

Ungerstedt, Urban. 1968. “6-Hydroxy-Dopamine Induced Degeneration of Central Monoamine

Neurons.” *European Journal of Pharmacology* 5 (1): 107–10.

[https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/0014-2999\(68\)90164-7](https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/0014-2999(68)90164-7).

- Wang, Congmin, Fang Liu, Ying Ying Liu, Cai Hong Zhao, Yan You, Lei Wang, Jingxiao Zhang, et al. 2011. “Identification and Characterization of Neuroblasts in the Subventricular Zone and Rostral Migratory Stream of the Adult Human Brain.” *Cell Research* 21 (11). Nature Publishing Group: 1534–50. <https://doi.org/10.1038/cr.2011.83>.
- Wilson, Patricia G., and Steve S. Stice. 2006. “Development and Differentiation of Neural Rosettes Derived from Human Embryonic Stem Cells.” *Stem Cell Reviews* 2 (1): 67–77. <https://doi.org/10.1007/s12015-006-0011-1>.
- Wurst, Wolfgang, and Laure Bally-Cuif. 2001. “Neural Plate Patterning: Upstream and Downstream of the Isthmic Organizer.” *Nature Reviews Neuroscience* 2 (February). Nature Publishing Group: 99. <http://dx.doi.org/10.1038/35053516>.
- Yiping, Yan, Yang Dali, Zarnowska Ewa D., Du Zhongwei, Werbel Brian, Valliere Chuck, Pearce Robert A., Thomson James A., and Zhang Su-Chun. 2009. “Directed Differentiation of Dopaminergic Neuronal Subtypes from Human Embryonic Stem Cells.” *STEM CELLS* 23 (6). Wiley-Blackwell: 781–90. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2004-0365>.
- Youdim, Moussa, D Ben-Shachar, and P Riederer. 1994. *The Enigma of Neuromelanin in Parkinson’s Substantia Nigra. Journal of Neural Transmission. Supplementum*. Vol. 43.
- Zhu, Fangfang, Matthew Gamboa, Alfonso P. Farruggio, Simon Hippenmeyer, Bosiljka Tasic, Birgitt Schüle, Yanru Chen-Tsai, and Michele P. Calos. 2014a. “DICE, an Efficient System for Iterative Genomic Editing in Human Pluripotent Stem Cells.” *Nucleic Acids Research* 42 (5). <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1290>.