



Universidad Nacional Autónoma de México

---

---

Facultad de Psicología

División de estudios profesionales

**ANÁLISIS DE MARCADORES DOPAMINÉRGICOS EN CÉLULAS  
TRONCALES EMBRIONARIAS HUMANAS QUE SOBRE EXPRESAN LMX1A,  
OTX2 Y FOXA2 EN UN MODELO DE PARKINSON**

**TESIS**

Que para obtener el título de

Licenciado en Psicología

presenta:

Rodrigo Ramos Acevedo

Directora de tesis:

Dra. Magdalena Guerra Crespo



Ciudad Universitaria, Cd. de México, 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.

Para la realización de este trabajo se contó con el donativo de DGAPA-PAPIIT IN207116.

El autor recibió la beca de titulación por parte de la UNAM y un apoyo de ayudante de investigador por parte de CONACYT.

Un especial agradecimiento a la Dra. Birgitt Schüle por habernos donado las líneas celulares y apoyado en la realización del proyecto.

## *Agradecimientos:*

A mi padre, por las más grandes enseñanzas.

A mi madre, por tanto cariño, atención y amor.

A mi hermano, lejos pero cercano.

A la Dra. Guerra, por guiar y confiar.

A Ale, por toda la paciencia.

A Luis y a Vero, por traer el caos al laboratorio.

A Marce y a Diana, simplemente vitales.

A mi familia, por siempre.

A mis amigos, sin ellos, nada.

Gracias por todo el apoyo.

# INDICE

GLOSARIO.....	1
RESUMEN.....	3
INTRODUCCIÓN.....	4
ANTECEDENTES.....	4
1. La enfermedad de Parkinson (EP).....	4
1.1 Epidemiología.....	4
1.2 Historia.....	4
1.3 Síntomas.....	4
1.4 Causas y tratamientos.....	5
2. Medicina regenerativa.....	8
2.1 Descripción de las células troncales embrionarias (CTE).....	8
2.2 El cuerpo embriode (CE).....	9
3. Medicina regenerativa en la enfermedad Parkinson.....	12
3.1 Factores inductores de neuronas dopaminérgicas mesencefálicas (DAm).....	12
3.2 Sobre expresión de FoxA2, Lmx1a y Otx2.....	14
3.3 Trasplantes en modelos de la EP.....	16
4. Microambiente de la Sustancia Nigra <i>pars compacta</i> (SNpc).....	17
4.1 Microambiente y diferenciación.....	17
4.2 Trasplantes en la SNpc.....	18
JUSTIFICACIÓN.....	20
PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	21
HIPÓTESIS.....	21
OBJETIVOS.....	21
MATERIALES .....	22
Reactivos.....	22
MÉTODO.....	24
Animales.....	24

Modelo de la EP (Lesión en la SNpc con 6-Hidroxidopamina).....	25
Cultivo de células troncales embrionarias humanas (CTEh).....	26
Trasplante de CE en la SNpc.....	27
Obtención y procesamiento de tejido.....	28
Inmunofluorescencia.....	29
Microscopía.....	29
RESULTADOS.....	30
DISCUSIÓN.....	41
CONCLUSION.....	45
PERSPECTIVAS.....	45
REFERENCIAS.....	46

## GLOSARIO

6-Hidroxidopamina.....	6-OHDA
Célula troncal.....	CT
Célula troncal embrionaria.....	CTE
Célula troncal embrionaria humana.....	CTEh
Célula troncal embrionaria de ratón.....	CTEr
Cuerpo embrioide.....	CE
Días post-trasplante.....	dpt
Doblecortina.....	DCX
Dopaminérgico/a(s).....	DA
Dopaminérgico/a(s) mesencefálicas.....	DAm
Enfermedad de Parkinson.....	EP
Estructuras similares a rosetas neurales.....	ESRN
Factores de transcripción.....	FT
Factor de transcripción de homeocaja 1 alfa asociado a LIM.....	Lmx1a
Factor de transcripción de homeocaja ortodentícula 2.....	Otx2
Factor de transcripción de la proteína A2 de la caja de pinza.....	Foxa2
Globo Pálido interno.....	GPi
Globo Pálido externo.....	GPe
Masa celular interna.....	MCI
Núcleo Ventrolateral del tálamo.....	VL
Placa de Piso.....	PP
Rosetas Neurales.....	RN
Sustancia Nigra pars compacta.....	SNpc

Tirosina Hidroxilasa.....TH

Tubo Neural.....TN



## RESUMEN

La enfermedad de Parkinson (EP) es una condición neurodegenerativa que promueve la pérdida del control del movimiento. La muerte progresiva de las neuronas dopaminérgicas (DA) mesencefálicas (DAm) de la Sustancia Nigra *pars compacta* (SNpc) es mayormente responsable de los síntomas motores. La administración de levodopa reduce los movimientos involuntarios. Sin embargo, genera discinesias después de un tiempo prolongado de tratamiento.

Para tratar la EP, los trasplantes de células troncales (CT) son una propuesta en la búsqueda de un tratamiento alternativo. De hecho, a partir de las CT embrionarias (CTE) se puede generar el cuerpo embrioide (CE). Un estudio publicado por nuestro grupo demostró que trasplantes de CE derivados de CTE de ratón (CTEr) pueden responder a moléculas del microambiente celular pues en la SNpc estas células fueron capaces de diferenciarse a neuronas. Por otra parte, los factores de transcripción (FT) *Lmx1a* (FT de homeocaja 1 alfa asociado a LIM), *Foxa2* (proteína A2 de la caja de pinza) y *Otx2* (homeocaja ortodentícula 2) inducen la diferenciación DAm al ser sobre expresados simultáneamente en CTE humanas (CTEh) *in vitro*. Con esta base, evaluamos la sobrevivencia y diferenciación de células trasplantadas en la SNpc en etapa de CE de la línea de CTEh, H9-LFO que sobre expresa *Lmx1a*, *Otx2* y *FoxA2*.

Determinamos que las células de la línea H9-LFO generaron rosetas neurales que expresaban el marcador *Otx2*, asociado a especificación DAm y el marcador de precursor neural doblecortina (DCX). Además, a los 30 dpt encontramos expresión de TH.

Concluimos que la SNpc es un nicho permisivo para la diferenciación DA de CTEh trasplantadas en etapa de CE comprometidas a un linaje DAm. Sin embargo, será necesario ampliar la ventana temporal de los trasplantes de la línea H9-LFO para determinar si las rosetas neurales son capaces de diferenciarse en neuronas DA maduras y funcionales.

# **1. La Enfermedad de Parkinson**

## **1.1 Epidemiología**

La enfermedad de Parkinson es el segundo desorden neurodegenerativo con más incidencia en la población después del Alzheimer. En los países industrializados hay una tasa de 0.3% de prevalencia de la EP en la población (Lee y Gilbert, 2016). Afecta alrededor de 4.5 millones de personas a nivel mundial (Cervantes-Arriaga et al., 2013). En México se estima que hay 45 casos por cada 100 mil habitantes (Diagnóstico y tratamiento de la Enfermedad de Parkinson inicial y avanzada en el tercer nivel de atención, México: Secretaría de Salud, 2010).

## **1.2 Historia**

Fue descrita formalmente por primera vez en 1817 por James Parkinson (Parkinson, 2002). *Shaking palsy* (parálisis agitante) era el nombre que los médicos contemporáneos usaban para referirse a los síntomas de personas que mostraban temblores incontrolables. Pero este término se utilizaba de manera muy generalizada y no hacía referencia precisa al conjunto de síntomas que Parkinson describió (Pfeiffer et al., 2015).

Cincuenta años más tarde, Jean-Martin Charcot escribió un ensayo más descriptivo con respecto a los síntomas que él observaba, distinguiendo la bradicinesia como un aspecto principal de la enfermedad y no como un debilitamiento consecuente a esta. Además, Charcot fue el primero en referirse a esta descripción sintomática como la Enfermedad de Parkinson, así como diferenciar por síntomas a la EP de otras similares (Goetz, 2011). No fue hasta 1925 que Brissaud propuso que era el daño en la Sustancia Nigra la causa anatómica de los síntomas motores de la EP (Goetz, 2011).

## **1.3 Síntomas**

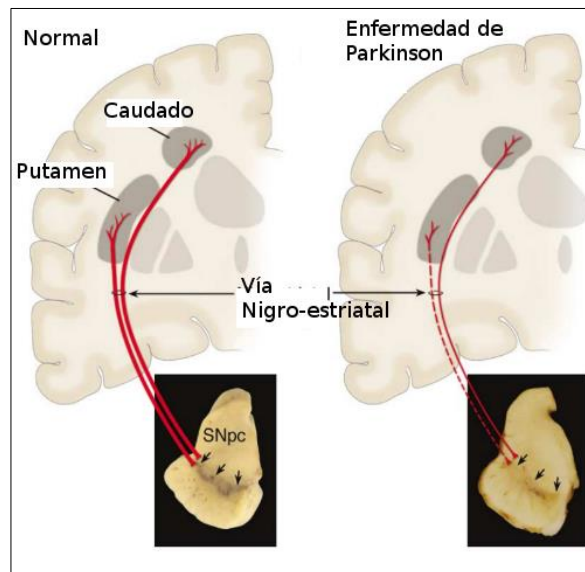
Los síntomas principales que presentan los pacientes con la EP son temblor, rigidez, bradicinesia, e inestabilidad postural (Pfeiffer et al., 2015). Además, se ha caracterizado el declive cognitivo en el lenguaje, memoria y atención (de la Riva et al., 2014; Michel, Hirsch, y Hunot, 2016). Trastornos como depresión, ansiedad y demencia son habituales entre las personas con EP (de la Riva et al., 2014).

Otra característica importante de la EP es que el sistema nervioso autónomo se ve afectado, lo cual se puede observar en muchos pacientes, pues presentan disfunción gastrointestinal, urológica, sexual, cardiovascular, termoregulatoria y respiratoria. El sueño es uno de los aspectos más perjudicados pues padecen de insomnio, desorden conductual del sueño de movimientos oculares rápidos (REM), somnolencia diurna (de la Riva et al., 2014; French y Muthusamy, 2016).

## **1.4 Causas y Tratamientos**

Se han descrito varios factores de riesgo que predisponen a la EP (Lee y Gilbert, 2016). La edad es uno de los más destacables ya que el 1.0% de la población con más de 60 años la padece y el 3.0% de los adultos mayores a 80 años. Se presenta dos veces más en hombres que en mujeres, posiblemente debido a un factor neuroprotector por parte de los estrógenos. La exposición a agentes tóxicos como los pesticidas también predisponen al inicio de la enfermedad. La Desmetilprodina o MPPP (1-metil-4-fenil-4-propionoxipiperidina) es un pesticida que al ser metabolizado por el organismo produce MPTP (1-metil-4fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina), considerado uno de los agentes más riesgosos junto con la rotenona y el paracuat debido a su toxicidad. Entre las causas genéticas y heredables de la enfermedad se puede mencionar la triplicación del gen que contiene la información necesaria para traducir la proteína alfa-sinucleína (*SNCA*) y mutaciones en los genes *LRRK2* y *VPS35*, cuyos productos peptídicos se encargan de la degradación y movilización de polipéptidos; la visión actual considera a la EP como una enfermedad multifactorial (Dauer y Przedborski, 2003; Poewe et al., 2017).

Algunos síntomas motores de la EP se deben a la muerte progresiva de las neuronas DA de la SNpc, un núcleo mesencefálico que forma parte de la vía nigro-estriatal del movimiento. Esta vía funciona mediante la comunicación de la corteza motora con el Putamen, el Globo Pálido en sus segmentos interno (GPi) y externo (GPe), el Núcleo Ventrolateral del tálamo (VL) y la Sustancia Nigra (Jahanshahi, 2013) siendo esta última la estructura que libera dopamina en el Putamen para unirse a los receptores DA D1 y D2 (Figura 1) (Dauer y Przedborski, 2003).



**Figura 1. Vía nigro-estriatal en el cerebro normal y con EP.** En el cerebro normal se puede ver la pigmentación de la SNpc dada por la neuromelanina presente en las neuronas DAm, así como sus principales vías eferentes. En el cerebro afectado con la EP la pigmentación de la SNpc disminuye debido a la degeneración de las neuronas DA, que conduce a la pérdida de la vía nigro-estriatal. Modificada de Dauer y Przedborski, 2003.

Para disminuir los síntomas motores se administra levodopa, el precursor de la dopamina. La levodopa atraviesa la barrera hematoencefálica y aumenta los niveles de dopamina en el estriado. Este es el método más común para tratar a los pacientes con EP. Sin embargo, al administrarla por un tiempo prolongado se presentan complicaciones motoras incapacitantes conocidas como discinesias (Castro et al., 2016).

También se ha implementado el uso de cirugías en las cuales se colocan electrodos en los núcleos subtalámicos para regular la actividad neuronal y controlar los movimientos involuntarios. Desafortunadamente esta intervención no se encuentra al alcance de la mayor parte de la población

debido a su alto costo además de no ser un procedimiento viable para todas las personas con EP (Fundament et al., 2016; Jahanshahi, 2013).

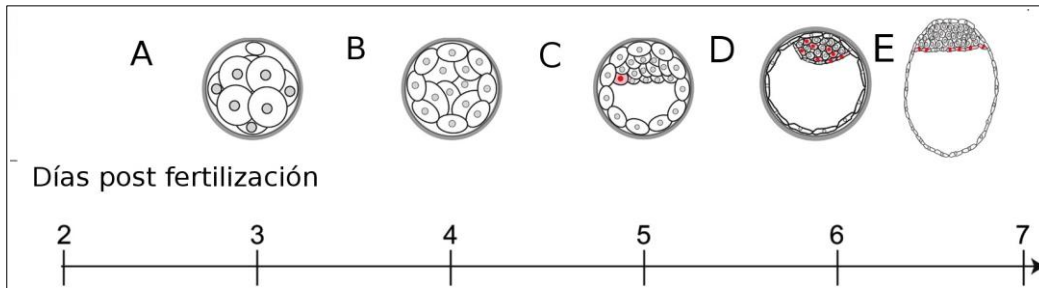
Una posible alternativa para el tratamiento de la EP es el uso de células troncales (CT), estas en principio podrían ser una fuente de neuronas DA capaces de proveer al núcleo estriado de dopamina, restaurando así los niveles basales de este neurotransmisor. Con el trasplante de neuronas DA provenientes de tejido de mesencéfalo ventral humano se han obtenido mejoras conductuales tanto en pacientes con EP, así como en modelos animales de la EP (Glavaski-Joksimovic y Bohn 2013; Fahn, 2015). La variabilidad obtenida en los resultados y las restricciones éticas del uso de tejido embrionario no sustentan su aplicación en pacientes, por lo que se requieren más estudios que conduzcan a mejorar la eficacia de estos procedimientos (Boronat-García, Guerra-Crespo, y Drucker-Colín, 2017). Debido lo anterior, aún es necesario encontrar métodos que mejoren la viabilidad de las células trasplantadas, así como una integración funcional en el encéfalo. Más aún, es necesario explorar alternativas a las fuentes celulares que se han usado y al lugar donde se han trasplantado para tener una visión más amplia de la capacidad que tienen diferentes áreas del cerebro para permitir la sobrevivencia y diferenciación de un trasplante.

## 2. Medicina regenerativa

### 2.1 Descripción de las Células Troncales Embrionarias (CTE)

La medicina regenerativa se basa en el uso de CT para reemplazar tejido perdido. Las CT son capaces de auto renovarse con el fin de replicarse y mantener una población idéntica, así como dar origen a células especializadas. Esto se conoce como división asimétrica. Son clasificadas dependiendo de su potencia para diferenciar a diferentes fenotipos. Siendo totipotentes las células que pueden dar origen a un organismo entero, incluyendo tejido extraembrionario; pluripotentes las que son capaces de dar origen a células de las 3 capas germinales (endodermo, mesodermo y ectodermo) y multipotentes si se diferencian en cualquier célula de un linaje específico de alguna de las capas germinales. Por ejemplo, los precursores neurales que generan solo el linaje neural compuesto por neuronas, células gliales y oligodendroglia (Keller, 2017). Además, dependiendo del estadio en el que se encuentre una CT expresará una gama de marcadores asociados a su etapa de desarrollo. En la etapa de pluripotencia, por ejemplo, se expresarán Oct4, Sox2, cMyc o Nanog (Chen y Lai, 2014).

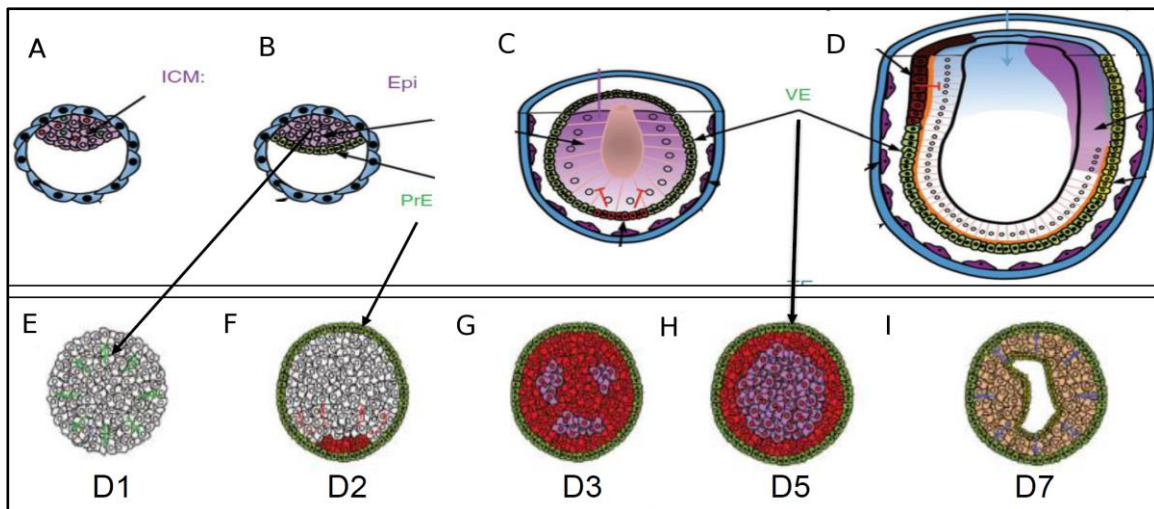
Las CT se pueden encontrar en diversos nichos de un organismo y durante diferentes etapas del desarrollo. Una fuente de la que se pueden extraer CT durante el desarrollo embrionario es la masa celular interna (MCI) del blastocisto, un conglomerado celular pluripotente que se genera posterior a la implantación del embrión. Esta da lugar al epiblasto y posteriormente al embrión (Figura 2). Estas células fueron obtenidas inicialmente en ratón y denominadas células troncales embrionarias (CTE) (Martin, 1981). Tiempo después se aislaron las primeras CTEh que mostraban las mismas características fenotípicas. (Thomson et al., 1998). Por su capacidad de dar lugar a casi cualquier tipo de célula incluyendo a las neuronas DA, las CTE han sido objeto de estudio en diversos protocolos de diferenciación *in vitro* (Kirkeby, Grealish, et al., 2012; Kirkeby, Nelander, y Parmar, 2012; Morizane et al., 2010; Villa-Diaz et al., 2013).



**Figura 2. Desarrollo del blastocisto humano.** Secuencia de etapas posteriores a la fertilización e implantación. **(A)** Mórula en etapa de 8 células. **(B)** Etapa de 10 a 20 células. **(C)** Inicio de cavitación del blastocisto que da lugar a la MCI. **(D-E)** La cavidad genera el trofoectodermo y la MCI, el endodermo primitivo y el epiblasto. Modificado de Niakan y Eggan, 2013.

## 2.2 El cuerpo embrioide

Un protocolo ampliamente usado en el estudio de la diferenciación celular consta de la formación de colonias de CTE que al ser cultivadas en flotación generan agregados celulares que forman esferas. Estas formaciones se conocen como CE ya que se desarrollan con gran similitud a un embrión durante su maduración (Itskovitz-Eldor et al., 2000; Rathjen y Rathjen, 2001). El CE es capaz de generar señales de polarización que tienen su paralelo al desarrollo embrionario (Figura 3) (Brickman y Serup, 2017). Inclusive, el CE eventualmente cavitará de la misma forma a como lo hace el blastocisto posterior a su implantación. Al estudiar los marcadores que expresa el CE se encontró que su capa más externa expresaba los marcadores del endodermo primitivo, el centro los del epiblasto, mientras que al cavitar se generaba una capa que asemejaba a la formación del epitelio columnar (Figura 4).



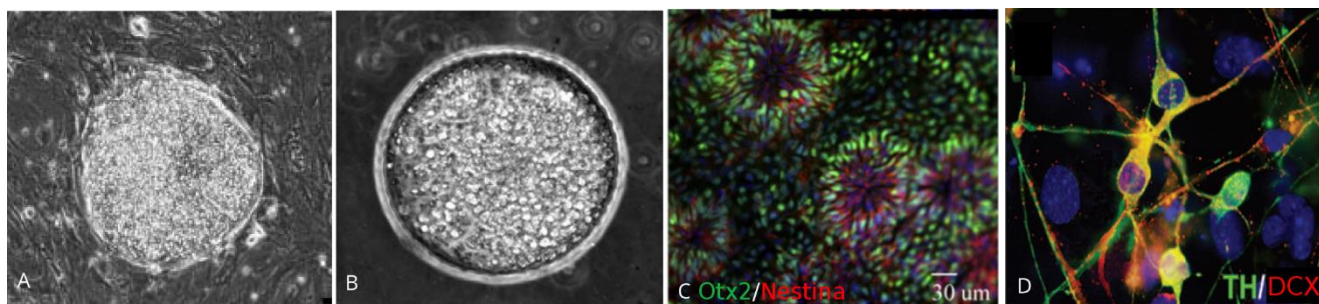
**Figura 3. La evolución del CE asemeja al desarrollo embrionario. (A-D)** Desarrollo del blastocisto *in vivo*. **(A)** Blastocisto preimplantado donde se señala la MCI. **(B)** Blastocisto con el epiblasto (morado) y el endodermo primitivo (verde) señalizados. **(C-D)** Etapas tempranas de desarrollo del saco primitivo donde se señala el endodermo visceral. **(E-I)** Desarrollo *in vitro* del CE. **(E)** Inicio de formación del CE. **(F)** CE formado que tiene una capa externa que señala expresión similar al endodermo primitivo (verde). **(G-H)** Expresión diferenciada de células en el CE donde la capa externa se asemeja al endodermo visceral. **(I)** Inicio de cavitación del CE muestra células con expresión similar al epitelio columnar en el centro. ICM: masa celular interna; Epi: epiblasto; PrE: endodermo primitivo; VE: endodermo visceral. Modificada de Brickman y Serup, 2017.

Una vez adherido a un sustrato, el CE puede continuar su proceso de diferenciación. A partir de este punto se podrá observar la formación de conglomerados celulares llamados rosetas neurales. Estas indican el inicio de diferenciación neural al presentar marcadores de precursores neurales (Figura 3). Posteriormente modificarán su morfología hasta adoptar el fenotipo neuronal y expresar los marcadores correspondientes al linaje neuronal que pertenezcan (Koch et al., 2009; Malchenko et al.,



2014). Por esto, el CE marca una etapa crítica en el inicio de la diferenciación celular, manteniendo relevancia en el estudio de modelos de desarrollo y patologías.

Al usar estos modelos del desarrollo se ha logrado discernir cascadas de señalización en la maduración de neuronas DAM que, a su vez, pueden ser usadas para inducir neuronas DA *in vitro*, siendo una fuente potencial para el tratamiento de la EP.



**Figura 4. Desarrollo *in vitro* de neuronas DA.** Secuencia temporal del desarrollo *in vitro* de neuronas DA iniciando con **(A)** CTE cultivadas sobre fibroblastos de ratón al inicio de un cultivo células troncales. **(B)** CE en flotación, etapa siguiente en el protocolo de diferenciación. **(C)** Formaciones de rosetas neurales obtenidas posterior a la adhesión del CE que expresan Otx2 (verde), un FT asociado a desarrollo DAM, y Nestina (rojo), un marcador de citoesqueleto de precursores neurales. **(D)** Células con morfología neuronal y expresión de Tirosina hidroxilasa (TH; verde) y Doble cortina (DCX; rojo); siendo marcadores de neuronas DA y de neuronas en desarrollo respectivamente. Imagen **A** y **B** modificadas de Thomson et al., 1998; imagen **C** modificada de Malchenko et al., 2014; imagen **D** modificada de Tomov et al., 2015.

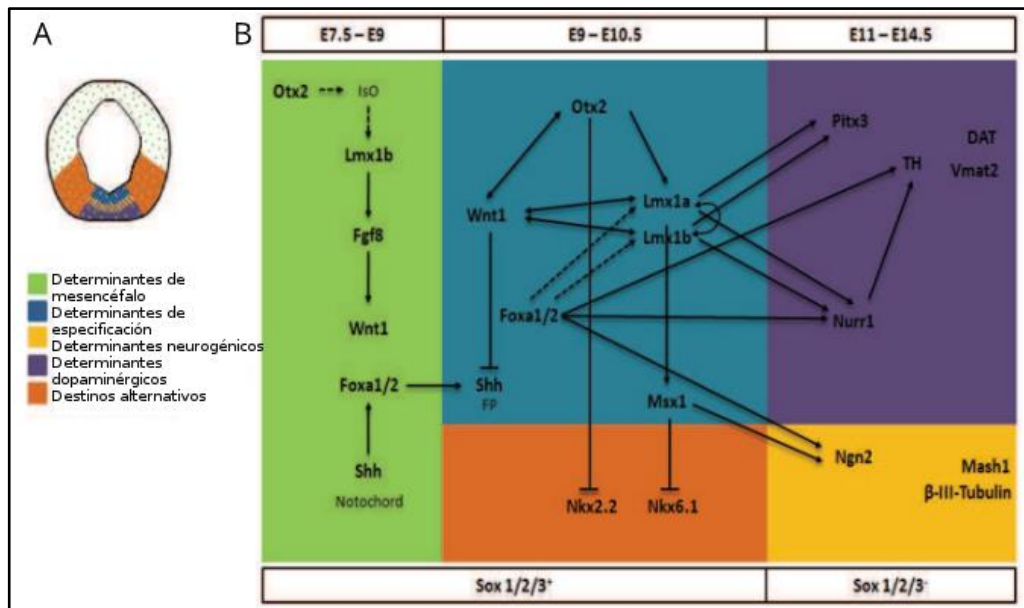
### 3. Medicina regenerativa en la enfermedad de Parkinson

#### 3.1 Factores inductores de neuronas DA

Para trasplantar células productoras de dopamina en modelos animales de la EP habitualmente se generan neuronas DAM en cultivo y posteriormente se introducen en el núcleo estriado (Boronat-García et al., 2017). Para este propósito se han desarrollado algunos métodos de diferenciación DAM, entre los que destacan aquellos que usan morfógenos y citocinas involucradas en el desarrollo embrionario de las neuronas DAM al adicionarlos ya sea *in vitro* (Kirkeby, Grealish, et al., 2012), o al introducir genes de factores de diferenciación DAM en el genoma para su sobre expresión (Andersson et al., 2006). Los factores que han dado mejores resultados al obtener altas tasas de diferenciación DAM son aquellos que se expresan en respuesta a la señalización que inducen los factores de transcripción FT Lmx1a (LIM Homeobox Transcription Factor 1 Alpha), Foxa2 (Forkhead Box Protein A2) y Otx2 (Orthodenticle Homeobox 2).

Las cascadas de señalización que dirigen el desarrollo de las neuronas DAM empiezan a actuar al día de desarrollo embrionario 7.5 (E7.5), en el segmento anterior y posterior del epiblasto donde se expresa Otx2 para formar una estructura conocida como el itsmo (Wurst y Bally-Cuif, 2001). Por otra parte, ubicada ventralmente al tubo neural (TN) se encuentra la notocorda. Esta induce el establecimiento de la placa de piso (PP) a lo largo del TN través de la expresión de Sonic Hedghog (Shh), controlado a su vez por Foxa2 entre los días E8 y E9. Esta misma cascada induce la especificación de precursores neurales ventrales (Matisse et al., 1998) siendo Otx2 y Foxa2 necesarios para la expresión de Lmx1a en las células de la PP (Omoidei et al., 2008; Lin et al., 2009). Por lo cual Otx2 y Foxa2 actúan en conjunto para determinar la expresión de Lmx1a en precursores mesencefálicos ventrales. Además, se ha encontrado que células que expresan Shh en la PP se diferencian en neuronas DAM (Jeong y Epstein, 2003). En el E9.5, Lmx1a se expresa en la línea medial ventral del mesencéfalo alrededor del día E9, siendo esencial para la diferenciación de neuronas DA (Andersson et al., 2006). Más aún, Lmx1a regula la expresión del gen Pareado como homeodominio 3 (Paired Like Homeodomain 3; Ptx3), Foxa2 y el Receptor nuclear asociado 1 (Nuclear Receptor Related 1; Nurr1), así como la de la enzima TH, que cataliza la reacción limitante de la síntesis de dopamina.

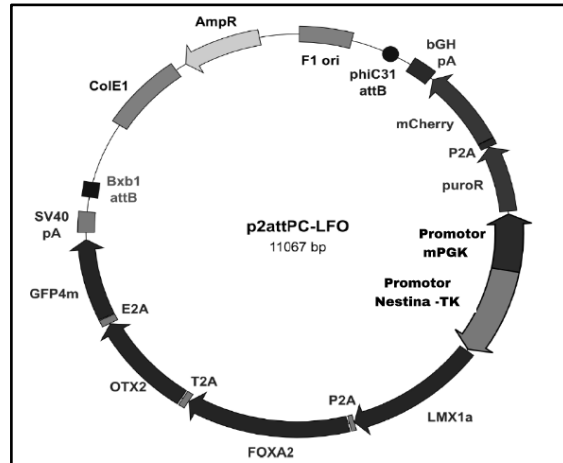
Juntos, Ptx3 y Nurr1 mantendrán la transcripción de genes que se encuentran involucrados en el mantenimiento del fenotipo DA como la presencia de TH, el transportador vesicular de monoaminas (Vmat2) y el transportador de dopamina (DAT) (Ferri et al., 2007; Guerrero-Flores y Covarrubias, 2011; Kim et al., 2003; Saucedo-Cardenas et al., 1998) (Figura 5). Por la forma en que interactúan Lmx1a, Foxa2 y Otx2 con los otros factores y morfógenos se considera a estos factores como centrales y necesarios para la diferenciación DAM.



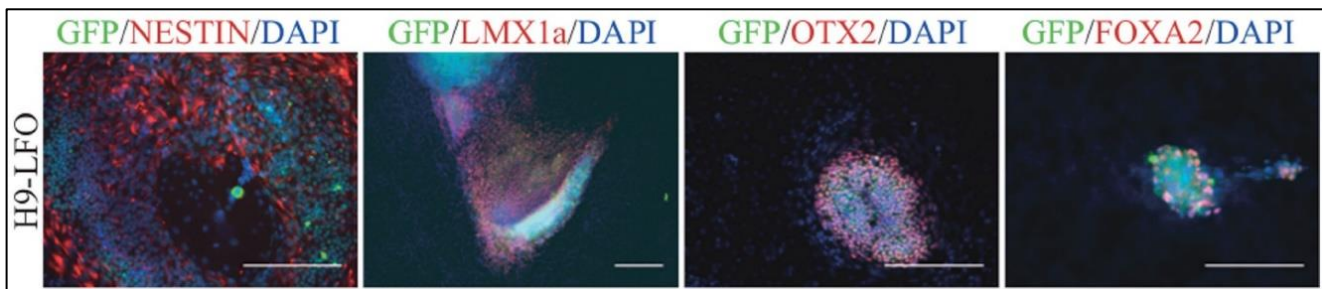
**Figura 5. Cascadas de factores de señalización de neuronas DA mesencefálicas. (A)** Regiones del mesencéfalo donde se expresan los morfógenos asociados al desarrollo DA. **(B)** Vías de señalización asociadas a la especificación DA. Lmx1a, Foxa2 y Otx2 se encuentran en posiciones ventrales clave para dirigir la diferenciación DA. Modificado de Guerrero-Flores y Covarrubias, 2011.

### 3.2 Sobre expresión de Lmx1a, FoxA2 y Otx2

Con el fin de mejorar la diferenciación DAM en cultivo de CTEh y estudiar la relevancia de los 3 FT DAM Lmx1a, Foxa2 y Otx2 en conjunto, la doctora B. Schule y colaboradores desarrollaron un método de inserción de plásmidos al genoma humano por medio de una nueva técnica de edición genómica denominada DICE (Dual Integrase Cassette Exchange) (Zhu et al., 2014). Para ello, se usaron dos integrasas con las que lograron realizar, de forma específica, el posicionamiento de un plásmido en una región del genoma favorable en transcripción. De esta manera insertaron los genes Lmx1a, Foxa2 y Otx2 en un solo transcrito policistrónico dependiente del promotor constitutivo de timidin cinasa. Estos fueron unidos al gen reportero “*enhanced green fluorescent protein*” proteína verde fluorescente potenciada (eGFP o GFP) el cual se encuentra al final del transcrito para determinar si se expresaron correctamente los FT. La transcripción de este conjunto está regulada por el potenciador del gen de Nestina, gen que se expresa en etapa temprana de precursores neurales. A la par, para identificar a las células que tuvieran el transcrito activo se utilizó una proteína reportera fluorescente rojo cereza (“mCherry”), bajo el control transcripcional de la enzima fosfoglicerato cinasa asegurando así su expresión de forma constitutiva. Esta línea fue denominada H9-LFO (Figura 6). Al diferenciarlas en cultivo, observaron que posterior a la etapa de CE tenían alta expresión de los FT insertados (Figura 7). Es así como con este vector lograron generar células comprometidas a un linaje DAM con el fin de estudiar el desarrollo neuronal y la EP *in vitro*.



**Figura 6. Vector p2attPC-LFO:** Vector insertado en la línea H9-LFO para dirigir las células hacia la diferenciación DAm. El vector cuenta con los sitios para la integración *phiC31 attB* y *Bxb1 attB*. Las secuencias de poliadelinación SV40 pA y bGH pA se encuentran al final de los genes que se traducen. Los segmentos de autoescisión P2A, T2A y E2A fueron ubicados entre cada FT para asegurar que cada secuencia sea debidamente separada. Modificado de Zhu et al., 2014.



**Figura 7. Línea H9-LFO expresa los FT Lmx1a, Otx2 y Foxa2.** Las células fueron cultivadas para su diferenciación. Posterior a la etapa de CE, fueron mantenidas durante 8 días en condiciones de adherencia. Al término de ese periodo se observa la expresión en rojo de **(A)** Nestina, **(B)** Lmx1a, **(C)** Otx2 y **(D)** Foxa2. Cada imagen representa el mismo día del protocolo de diferenciación. Modificado de Zhu et al., 2014.

### 3.3 Trasplantes en modelos de la EP

Anterior al trabajo de la doctora Schule, Andersson y su equipo (Andersson et al., 2006) generaron una línea de CTE de ratón (CTEr) en la que integraron un vector de sobre expresión bajo el control del potenciador de *Nestina* para aumentar la cantidad del FT Lmx1a en estas células y así obtener un mayor número de neuronas DA *in vitro* con el fin de poder trasplantarlas en modelos animales de la EP. Con esto lograron una alta proporción de células DAM. Posteriormente, otro grupo trasplantó células DAM derivadas de CTEr en ratas lesionadas en el estriado. Estas células también sobre expresaban Lmx1a bajo el control de Nestina. Observaron que solo el 50% de las células de los trasplantes logró sobrevivir, pero estas células presentaban TH así como otros marcadores DAM. Además, generaron líneas de CTEh con un vector de sobre expresión de Lmx1a asociado a un promotor constitutivo, las cuales mostraron una mejora significativa en el porcentaje de diferenciación *in vitro* comparada con las células de ratón (Friling et al., 2009). Recientemente, otro grupo derivó neuronas DA a partir de CTEh al sobre expresar Lmx1a y las trasplantó en el estriado de ratas adultas sin lesionar. Observaron que el trasplante sobrevivía hasta 5 meses después y presentaba marcadores de células mDA (Sánchez-Danés et al., 2012). Estas investigaciones demostraron que la sobreexpresión de un FT que dirige gran parte del desarrollo de neuronas DAM, en este caso Lmx1a, resulta ser un factor importante para aumentar de la tasa de diferenciación en cultivo de CTE tanto de ratón como de humano a un linaje DAM.

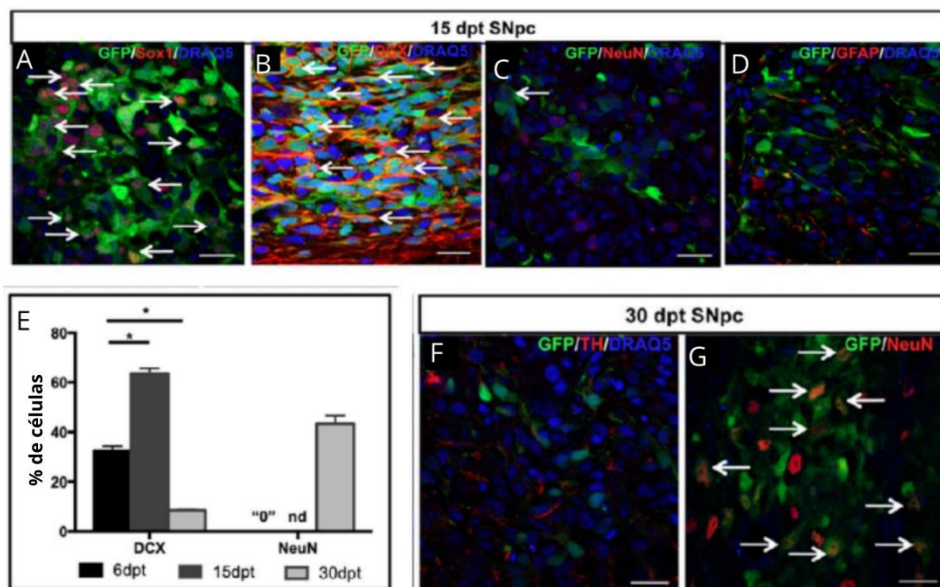
## 4. Microambiente de la Sustancia Nigra pars compacta

### 4.1 Microambiente y diferenciación

Las células troncales residen en nichos especializados o microambientes, los cuales proveen de señalización extracelular que aseguran la continuidad de la auto renovación e identidad celular. El microambiente mantiene un balance entre quiescencia y diferenciación, regulando el comportamiento de las células troncales pues previene su proliferación excesiva y al mismo tiempo evita que se agote la reserva de células troncales al diferenciarse en los linajes celulares que las necesidades del organismo demanden (Fuchs, Tumber y Guash, 2004; Morrison y Spradling, 2008). Para evaluar la capacidad del mesencéfalo de proveer señales de diferenciación en etapas tempranas del desarrollo a 3 diferentes etapas de diferenciación en un protocolo estandarizado de diferenciación neuronal, el doctor Luis Covarrubias y su equipo (Baizabal y Covarrubias, 2009) desarrollaron una metodología que denominaron “trasplante a explante”, donde colocaron CTEr, CE y progenitores neurales originados a partir de embriones de 10.5 días en explantes de mesencéfalo embrionario de ratón de la misma edad. Las células se depositaban a diferentes niveles dorso-ventrales del explante del mesencéfalo con el fin de evaluar diferencias entre zonas. Encontraron que hasta el 66% de las células derivadas de CE ubicados en la región ventral del mesencéfalo mostraban marcadores de neuronas DAM como Lmx1a y de neuronas maduras como lo es beta-tubulina. Más aún, al menos 38% expresaban TH. Además, en la región lateral del mesencéfalo encontraron expresión de marcadores de linajes neuronales alternos, indicando que las células de CE tienen la capacidad de ser especificados a diferentes linajes neuronales acorde a la región del mesencéfalo en la cual son integrados. Además, encontraron que los progenitores neurales lograban expresar marcadores de diferenciación neuronal, aunque solo expresaban marcadores DAM si se les adicionaba el factor de crecimiento de fibroblastos 8 (FGF8) y Shh. En contraste, las CTEr no mostraron cambio alguno, indicando que solamente el CE derivado de CTEr tiene la capacidad de diferenciarse con mayor facilidad al linaje que el microambiente del mesencefálico ventral le proporciona (Baizabal y Covarrubias, 2009).

## 4.2 Trasplantes en la SNpc

Basados en los antecedentes del doctor Covarrubias, nuestro equipo buscó evaluar la capacidad que tiene el CE de ser especificado al linaje DA en ratas adultas en una zona considerada no neurogénica. Para esto, el grupo realizó trasplantes de CTEr en etapa de CE en la SNpc sin lesionar en ratas adultas y encontró que las células trasplantadas expresaban el FT asociado al desarrollo del sistema nervioso central SRY-Box1 (Sox1) 6 días post-trasplante (dpt). De estas células el 32% también eran DCX+. Al dpt 15 este último porcentaje se incrementó a 64%, disminuyendo a solo el 10% 15 días después. NeuN, un marcador de núcleos neuronales, tenía baja expresión a los 15 dpt, pero incrementó a 43% a los 30 dpt. No se detectó la proteína glial fibrilar ácida (GFAP) perteneciente a la astrogliá, ni TH en ninguna ventana temporal analizada (Maya-Espinosa et al., 2015). Con este resultado se demostró que la SNpc de ratas adultas es un nicho permisivo para la diferenciación neuronal de CE derivados de CTEr no comprometidas al linaje neural.



**Figura 8. Diferenciación de CE trasplantados en la SNpc.** Señal encontrada a los 15 dpt de los marcadores **(A)** Sox1 **(B)** DCX **(C)** NeuN **(D)** GFAP. **(E)** Porcentaje de células expresando DCX y NeuN a 6, 15 y 30 dpt. Expresión a 30 dpt de **(F)** TH y **(G)** NeuN. Modificado de Maya-Espinosa et al., 2015.



Uno de los principales objetivos que se requiere alcanzar con los trasplantes de CT en la EP es su funcionalidad. Siendo la falta de dopamina en el estriado el primer problema que se aborda, la mayor parte de los experimentos han consistido en realizar trasplantes de células productoras de dopamina en el mismo estriado. Sin embargo, se ha observado que esta metodología genera discinesias, provocado por la falta de regulación en la liberación de dopamina por los propios trasplantes. Por lo cual, también se han efectuado trasplantes en zonas alternas al estriado con el fin de evitar este efecto secundario. Así, a la par del trabajo de nuestro grupo, Grealish y su equipo decidieron evaluar la capacidad que pudieran tener los trasplantes para generar proyecciones axónicas a larga distancia. Trasplantaron neuronas DA derivadas de CTEh en la SNpc (Grealish et al., 2014) que fueron cultivadas usando un protocolo de diferenciación DA previamente establecido en el que se les induce empleando diferentes morfógenos y factores como Shh (Kirkeby, Nelander, et al., 2012). Encontraron que estas células desarrollaron proyecciones de hasta 10 mm fuera del núcleo del trasplante hacia el núcleo estriado. Por lo tanto, en el mesencéfalo se pueden encontrar moléculas señalizadoras o que promueven el crecimiento axónico, desde la SNpc hasta el estriado.

## JUSTIFICACIÓN

Debido al carácter neurodegenerativo de la EP se han buscado formas de restablecer los niveles de dopamina en el estriado. La medicina regenerativa aporta una alternativa para regenerar las neuronas DA que la SNpc perdió y así aumentar la cantidad de dopamina en el estriado. Sin embargo, es probable que debido a la ubicación de los trasplantes realizados y a las células que se han usado, no se ha logrado mantener un injerto funcional a largo plazo. Por esto, se requiere investigar la capacidad que tiene una zona del encéfalo alterna para permitir la sobrevivencia de CTEh trasplantadas, y desarrollar estrategias que permitan aumentar las probabilidades que tienen estas células para integrarse funcionalmente con el fin de sugerir un posible tratamiento para la EP.

El microambiente presente en el mesencéfalo muestra que, ya sea en el PP, del TN, el istmo o en el eje ventro-medial del mesencéfalo, las señales secretadas por estas y otras estructuras dictaminarán el fenotipo final a que una célula llegará. Por tanto, el lugar donde se trasplanta cualquier tipo de CT, así como la capacidad de células no diferenciadas para recibir y responder a señalización microambiental resulta determinante para que las células trasplantadas sobrevivan y diferencien.

Puesto que hemos observado que las células de CE derivadas de CTEr pueden diferenciarse a un linaje neuronal en la SNpc (Maya-Espinosa et al., 2015) y sabemos que la línea de CTEh H9-LFO tiene una gran capacidad de diferenciarse a neuronas DA (Zhu et al., 2014), esperamos que al trasplantar en la SNpc la línea H9-LFO en etapa de CE estas células se diferencien en neuronas DA.

## **PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN**

¿Las CTEh trasplantadas en etapa de CE y que sobre expresan FT inductores de la diferenciación dopaminérgica serán capaces de sobrevivir y diferenciar a neuronas DAm en la SNpc?

## **HIPÓTESIS**

La sobre expresión simultánea de los FT Lmx1a, Otx2 y FoxA2 facilitarán la diferenciación de la línea H9-LFO trasplantada en etapa de CE a un fenotipo DAm en la SNpc.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo general**

Caracterizar si la línea celular H9-LFO trasplantada en etapa de CE en la SNpc es capaz de sobrevivir y diferenciarse en neuronas DAm.

### **Objetivo específicos**

Determinar si la línea celular H9-LFO trasplantada en etapa de CE en la SNpc inicia un proceso de especificación DA a corto plazo.

Demostrar si la línea celular H9-LFO trasplantada en etapa de CE en la SNpc es capaz de diferenciarse al fenotipo DAm a corto plazo.

## MATERIALES

### Reactivos

#### Cultivo de CTEh

1. Medio esencial 8 media kit – Thermo Fisher Scientific (TFS), A14666SA.
2. Penicilina-Estreptomicina – TFS, 15140-122.
3. DMEM-F12 - Life Technologies, 11320-082.
4. Geltrex - TFS, A1413202.
5. Tiazovivina (THZ) – Stemgent, 04-0017.
6. Bambanker - TFS, NC9582225.
7. DMEM HIGH GLUCOSE - TFS, SH30081.02.
8. Suero Fetal Bovino - TFS, 30910.03.
9. MEM NEAA - TFS, 11140 050.
10. Glutamax - TFS, 35050-061.
11. DPBS Mg<sup>++</sup>/Ca<sup>++</sup> - TFS, D8662.
12. Knockout serum replacement - TFS, 10828-028.
13. Beta mercaptoetanol - TFS, 21985-025.
14. FGF2 (peprotech, 100-18 B).
15. 500 ml Unidad de filtrado - TFS, 0974105.
16. BD 21G, jeringas – TFS, 1482123.
17. Platos de cultivo celular con 6 pozos – TFS, 087721B.
18. Tubos de centrifuga 15 ml – Corning, 430790.
19. Tubos de centrifuga 50 ml – Corning, 430829.
20. Pipeta 5 ml – Corning, 4051.
21. Platos de cultivo celular – Corning, 430166.
22. Crío viales de 2 ml Corning - Thermo Fisher Scientific, 0337431.
23. Puntas de pipetas con filtro.

## Cirugía y Prueba de giro

24. Ketamina – PISA, Q-7833-028.
25. Xilazina – PISA, Q-7833-099.
26. Lidocaina/Epinefrina – PISA, Q-7833-148.
27. 6-Hidroxidopamina – Sigma, H4381.
28. Sulfato D-Anfetamina – Sigma, A-5880.

## MÉTODO

### Animales

Se empleó un total de 84 ratas macho de la cepa Wistar, entre 230-250 grs. Las ratas fueron resguardadas bajo las condiciones estándar: 12:12 ciclo luz/obscuridad (luces encendidas a las 7:00 am), a una temperatura controlada de (22 °C) y con agua y alimento *ad libitum*. Todos los estudios fueron conducidos de acuerdo con los principios y procedimientos autorizados por el CICUAL en el Instituto de Fisiología Celular con el No. MGC08-14.

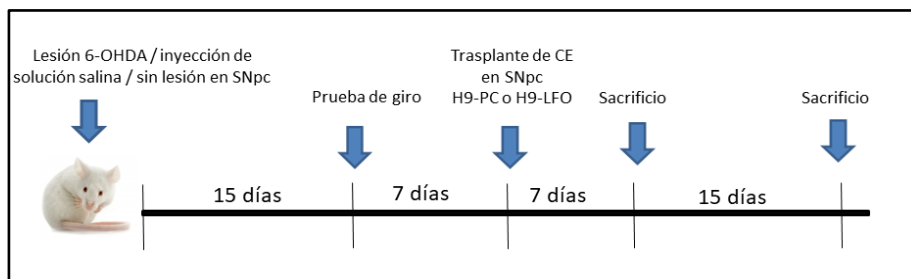
Los animales fueron asignados de manera aleatoria a uno de 12 grupos representados en la Tabla 1. En breve, los grupos se organizaron si se inyectó a la rata 6-Hidroxidopamina (6-OHDA) (Lesión) o solución salina (Sham) o no se le realizó intervención alguna previo al trasplante (Control). Así como si se trasplantó la línea H9-LFO o H9-PC. Además, si se sacrificó a la rata a los 7 o 15 dpt.

**Tabla 1. Grupos utilizados.**

		H9-LFO	H9-PC
LESIÓN	7 dpt	8	8
	15 dpt	8	8
SHAM	7 dpt	8	5
	15 dpt	8	5
CONTROL	7 dpt	5	3
	15 dpt	5	3

Los experimentos se llevaron a cabo como se muestra en la Figura 9. Las ratas fueron sometidas a cirugía para inyectar 6-OHDA o solución salina. Después de 15 días a todas las ratas del grupo *Lesión* se les realizó la prueba de giro (Bové y Perier, 2012) para determinar si la SNpc había sido lesionada correctamente. Para esto se inyectó amfetamina (4 mg/kg) intra-peritoneal y se cuantificó el número de giros que dieron a través del software Matlab (R). Aquellas ratas con más de 500 giros en un lapso de 2 h eran incluidas en el grupo *Lesión*. Las que no superaron el número de giros requeridos en

los grupos *Lesión* fueron descartadas. Una semana más tarde se realizaron los trasplantes de las líneas H9-LFO o H9-PC en la SNpc en etapa de CE. A 7 y 15 dpt se sacrificaron las ratas. Para identificar las células trasplantadas, se realizaron inmunofluorescencias dobles para el marcador de células humanas STEM121, a la par de distintos marcadores de especificación o diferenciación.



**Figura 9. Diseño experimental.** Las ratas fueron lesionadas con 6-OHDA, se les inyectó solución salina o se mantuvieron intactas hasta el día del trasplante. Se realizó la prueba de giro 15 días después de la primer cirugía y 7 días después se efectuó el trasplante de cualquiera de las 2 líneas H9-PC o H9-LFO. Se sacrificó a las ratas 7 o 15 dpt.

### Lesión con 6-OHDA

Tres semanas antes del trasplante de CE, las ratas fueron inyectadas con 6-OHDA en el hemisferio izquierdo en la SNpc con un aparato estereotáxico. Las coordenadas fueron determinadas de acuerdo con el atlas de Paxinos y Watson, anteroposterior 4.8; lateral 1.6; ventral 8.1 (Paxinos, 2004). Las ratas fueron anestesiadas vía intra-peritoneal con una mezcla de ketamina y xilacina (87/13 mg/Kg, respectivamente). Cada infusión de 6-OHDA fue estabilizada con 32  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  de L-ascorbato en un volumen total de 0.5  $\mu\text{l}$  de solución salina, a una velocidad de 0.125  $\mu\text{l}/\text{min}$ . Al grupo *Sham* se le inyectó el mismo volumen de solución salina sin L-ascorbato.

### **Cultivo de fibroblastos embrionarios de ratón (células alimentadoras)**

Para comenzar el cultivo de CTEh fue necesario sembrar a las células sobre fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs), de modo que proporcionaran a las CTEh factores tróficos y les confirieran pluripotencia (Jozefczuk, Drews, y Adjaye, 2012). Para esto se preparó gelatina usando 0.1% de gelatina de piel de porcino diluida en agua tratada con 0.1% de dietil pirocarbonato (DEPC). Los pozos de 6 cm<sup>2</sup> fueron recubiertos con 1 mL de gelatina preparada. Se retiró la gelatina 20 minutos después para dejar que se formara una capa donde se pudieran adherir los MEFs. Los MEFs fueron obtenidos de embriones de ratón de E12 de la cepa de ratón CD1 y almacenados a -80°C en viales de criopreservación.

Para iniciar el cultivo se descongeló rápidamente un vial que contenía 400,000 MEFs, colocándolo en un baño de agua a 37° C. Con el contenido casi líquido, se fue agregando lentamente 1 ml de medio para MEFs (DMEM High Glucose, DMEMHG) en el vial donde se encontraban. La suspensión celular se transfirió a un tubo Falcon de 15 ml que fue centrifugado a 1000 rpm durante 3 minutos. Se aspiró el sobrenadante y se agregó 1 ml de DMEM HG para mezclar con el precipitado celular. Se agregaron 3 ml más de medio DMEMHG, una vez mezclado, fueron sembrados en la caja previamente gelatinizada. Se necesitaron alrededor de 300,000 MEFs para tener la confluencia necesaria para sembrar las CTEh, cerca de 50%. Las células permanecieron durante 2 h en la incubadora para permitir su adhesión a la caja, posteriormente, se añadió mitomicina C (20µg/ml) por 2 h más para impedir la replicación celular. Se cambió el medio, y las células se mantuvieron en la incubadora durante la noche y se revisaron al día siguiente para asegurarse que la mitomicina actuó correctamente y así sembrar las CTEh.

### **Cultivo de CTEh.**

Seguimos el protocolo de nuestra colaboradora B. Schuele (Zhu et al., 2014). Para ello, se descongeló un vial con colonias de CTEh de las líneas H9-PC o H9-LFO sobre una cama de MEFs mitomizados. La descongelación se realizó mezclando lentamente 800 µl de medio F12 enriquecido en el vial con las células para después pasar el volumen final (1.8 ml) a un tubo de 15 ml con 9.2 ml de medio F12. Este



fue centrifugado por 2.5 minutos a 1000 rpm. Se retiró el sobrenadante del tubo. Se tomaron 500  $\mu$ l de medio F12 con los cuales fueron resuspendidas las colonias de CTEh. El producto se sembró en el pozo con los MEFs a las cuales se les agregó 1.5 ml de medio F12 y 3  $\mu$ l de Tiazovivina (THZ) (1 mM, concentración final 1.5  $\mu$ M). La THZ es necesaria para aumentar la viabilidad celular posterior a la descongelación y los pasajes.

El medio de cultivo se cambió cada 24 h durante los siguientes 5-7 días. Al tercer día, con colonias ya formadas, se removían aquellas con puntos de densidad o áreas con células dispersas. Después de cada limpieza se cambiaba el medio para evitar que las señales de diferenciación se propagaran. A partir del quinto día, las colonias con 2 milímetros de diámetro eran suficientemente grandes para poder pasarlas manualmente a pozos sin MEFs mitomizados pero que estaban cubiertos con una capa de Geltrex, una matriz de origen tumoral que permite el crecimiento de las colonias.

Para la matriz de adhesión celular en la cual las colonias de CTEh se sembraron, se tomaron 500  $\mu$ l de la concentración inicial de Geltrex y se diluyeron en 12 ml de medio F12. Se colocaron 1.5 ml de esta solución en cada pozo y se dejó reposando al menos una noche a 4° C antes de usarse.

### **Pasaje manual**

Con el fin de aumentar el número de colonias de CTEh, estas fueron pasadas manualmente a pozos con medio E8 y Geltrex. Para esto, se trazaban cuadrículas uniformes sobre las colonias usando una aguja. Con una micropipeta de 200  $\mu$ l se tomaban y depositaban los cuadrantes de las colonias en un pozo previamente preparado con medio atemperado junto con 2  $\mu$ l de THZ.

### **Formación de CE**

Para inducir a las células al estado de CE es necesario que cada colonia fuera cultivada en flotación. Así pues, después de un pasaje manual a un pozo con Geltrex, se les permitió crecer hasta 4 días. Posteriormente se retiró el medio y se adicionó 1 ml de colagenasa IV (1 mg/ml) en medio E6. Esta enzima les permitió separarse de la placa sin desintegrar la colonia. Con una pipeta fueron

transferidos a un pozo de 2 cm de ultra baja adherencia donde permanecieron 4 días con E6 suplementado con 15% de suero fetal bovino (SFB) inactivado. El medio fue cambiado solo 2 días después de la formación del CE.

### **Trasplante de CE**

La preparación del CE para su trasplante inicia al tomarlos del pozo de cultivo y transferirlos a un tubo Falcon de 15 cm. Los CE se dejan asentar por gravedad y se retira el medio. Se debe agregar una mezcla de tripsina y colagenasa para que se disocien. Dicha mezcla se deja en incubación a 37° C durante 5 minutos. Posteriormente se debe resuspender con el fin de disociar los CE por fuerza mecánica. Se trasplantaron 60,000 células viables por animal.

El proceso del trasplante de las células fue similar al ya mencionado para la lesión y utilizando las mismas coordenadas. Las células fueron introducidas con una jeringa Hamilton con PBS e inyectadas durante un minuto. La jeringa se dejó 6 minutos más para que las células bajen y se retiró lentamente para evitar alguna reabsorción.

### **Inmunosupresión**

Para evitar que el trasplante fuera rechazado por el sistema inmune de las ratas, se administró desde el día anterior al trasplante 0.25 ml de Ciclosporina (10mg/ml) via oral y 0.1 ml diluido en 750 ml de agua. Este tratamiento se mantuvo diariamente hasta el día previo a la perfusión.

### **Extracción de cerebros**

Para extraer el cerebro de las ratas trasplantadas, estas se perfundieron vía intracardíaca con 200 ml de una solución amortiguadora de fosfatos (PBS), a 4°C seguido de 200 ml de paraformaldehído (PFA) a 4°C. Los cerebros fueron extraídos y posterior a esto se realizó un proceso de posfijación en

paraformaldehído al 4% hasta el día siguiente con cambios de sacarosa al 10%, 20% y 30% en los 3 días posteriores. Se realizaron cortes coronales de los cerebros con un grosor de 40  $\mu\text{m}$ .

### **Inmunofluorescencia**

Cada tejido fue permeabilizado usando PBT (PBS y 0.3% Tritón 100x) con 2 lavados de 10 minutos cada uno. Se colocaron en 1 ml de recuperador de antígenos 1X durante 35 minutos a 65° C. Posteriormente se realizaron 3 lavados de PBT de 5 minutos cada uno y se les dejó una hora en solución de bloqueo (PBT más 5% de albumina). Se diluyó el anticuerpo primario en la solución de bloqueo de acuerdo con las recomendaciones del fabricante y se mantuvieron los tejidos en esta preparación durante toda la noche a 4° C. Al día siguiente, los cortes se lavaron en PBS 3 veces. El anticuerpo primario se diluyó 1:1000 en PBS, los tejidos estuvieron en esta solución durante 2 h. Posteriormente se lavaron en PBS por 5 minutos y se mantuvieron otros 5 minutos en DAPI (4',6-diamino-2-fenilindol) diluido 1:10,000 para teñir el núcleo de las células. Para evitar interferir con la expresión en rojo ( $\lambda$  555) del gen reportero mCherry, utilizamos rojo lejano ( $\lambda$  649 nm) para detectar los diferentes marcadores de diferenciación DA. La dilución de los anticuerpos utilizados fue STEM121 1:1000; Otx2 1:1000; DCX 1:500; TH 1:1000.

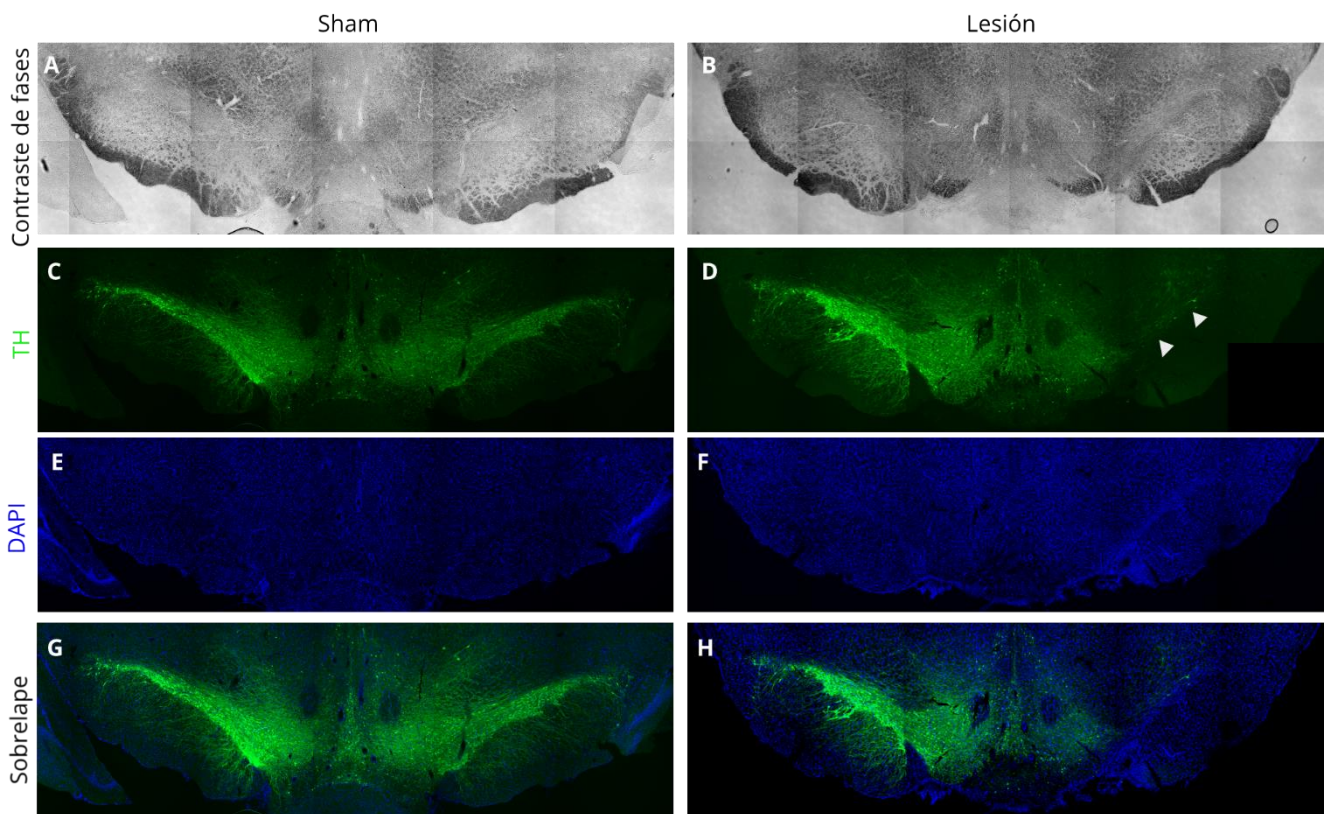
### **Microscopía**

Se obtuvieron imágenes del tejido mediante un microscopio confocal de disco giratorio 3I Marianas (Zeiss Observer Z.1 Invertido) y mediante un microscopio confocal Olympus FV1000 Multi-fotónico (Upright BX61WI e IX81 Invertido). Se utilizó el software ImageJ/ FIJI para procesar las imágenes.

## Resultados

### *Degeneración de neuronas en la SNpc con 6-OHDA.*

Para comprobar la degeneración de las neuronas DA en la SNpc del hemisferio izquierdo al inyectar 6-OHDA (Lesión) realizamos una inmunofluorescencia para detectar la enzima TH en estas condiciones, 30 días posteriores a la cirugía (Figura 10). Encontramos que en la rata inyectada con 6-OHDA había una drástica disminución de TH en la SNpc, donde la toxina fue inyectada. En cambio, en la rata inyectada con solución salina no presentaba degeneración neuronal alguna a pesar del daño mecánico, validando nuestras condiciones Sham y Lesión.



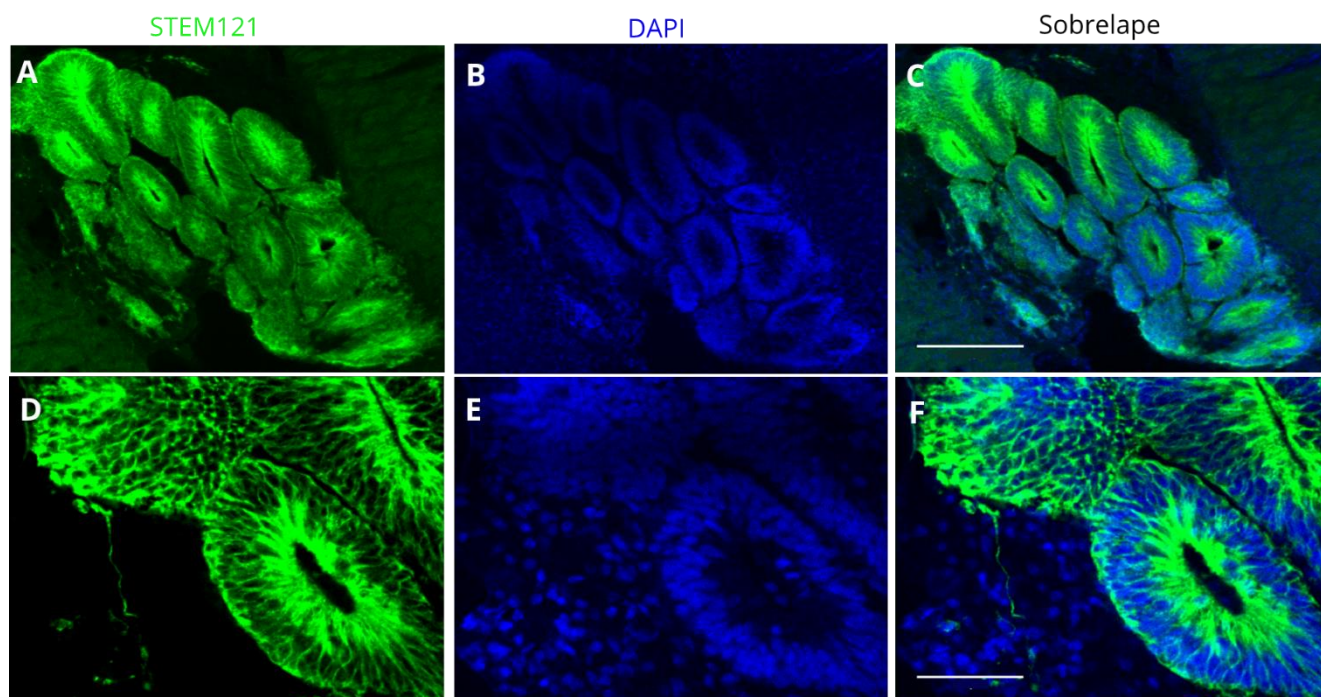
**Figura 10. Degeneración DA causada por inyección de 6-OHDA.** Región ventral del cerebro de una rata inyectada con solución salina (**A, C, E y G**) o 6-OHDA (**B, D, F y H**) a nivel de la SNpc. **A y B,**

contraste de fases; **C y D**, marcador para la enzima TH (verde); **E y F**, marcador nuclear DAPI (azul); **G y H**; sobrelape del marcaje de TH y DAPI. Las flechas en **D** indican la región donde no se observa la señal de TH. La figura fue reconstruida a partir de un mosaico de imágenes tomadas a 10X.

*Los trasplantes de CE de la línea H9-LFO generan estructuras similares a rosetas neurales.*

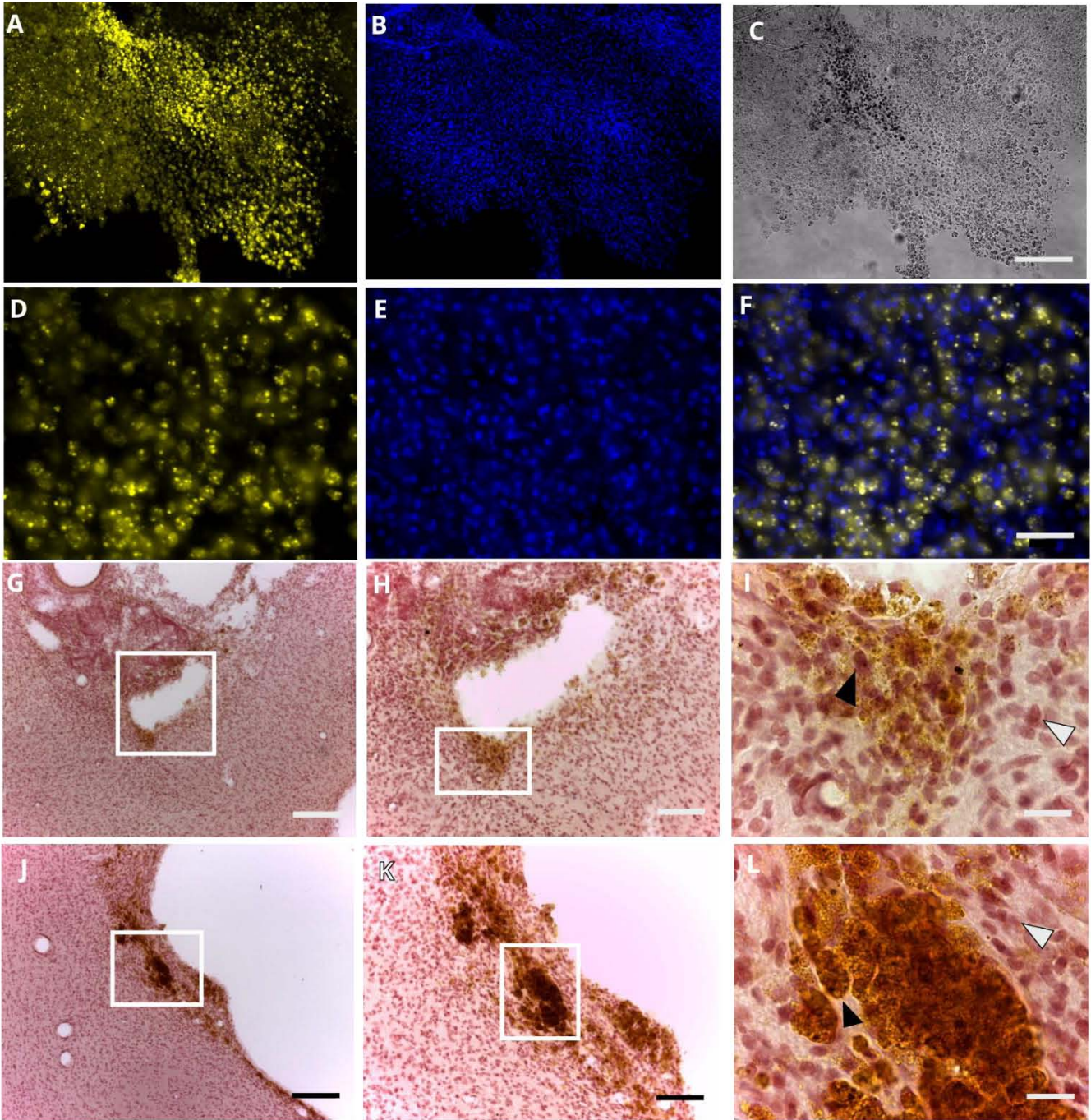
Debido al bajo nivel de señal observado de los reporteros mCherry y GFP en los trasplantes (resultado no mostrado), decidimos usar el anticuerpo STEM121 (Clontech, Y40410) específico para reconocer un antígeno presente en el citoplasma de células humanas, de forma que pudiéramos detectar aquellas células pertenecientes a nuestro injerto. Este fue a su vez reconocido con un anticuerpo secundario verde ( $\lambda$  488 nm).

Encontramos que el 64% (n=37) de los animales con trasplante de la línea H9-LFO presentaron estructuras similares a rosetas neurales (ESRN), siendo las rosetas neurales formaciones asociadas al desarrollo del TN y encontradas durante la diferenciación de neuronas *in vitro* (Elkabetz et al., 2008). Las ESRN expresaban STEM121, indicando que las células de CE pasaron por un cambio morfológico asociado a diferenciación neural (Figura 11).



**Figura 11. Los trasplantes con la línea H9-LFO forman ESRN.** Imágenes representativas de las ESRN encontradas en los trasplantes de la línea H9-LFO. Múltiples ESRN en un solo trasplante con **(A)** el anticuerpo STEM121 y **(B)** el marcador nuclear DAPI. **(C)** Sobrelape de las imágenes A y B. Barra de escala 200  $\mu\text{m}$ . **(D)** Ampliación a 40X de la imagen A con STEM121. **(E)** Ampliación a 40X de la imagen B con DAPI. **(F)** Sobrelape de las imágenes D y E. Barra de escala= 50  $\mu\text{m}$ . El tejido corresponde a una rata del grupo Lesión/H9-LFO/7dpt.

En contraste, al analizar los trasplantes de la línea H9-PC con el anticuerpo STEM121 no observamos la fluorescencia en verde propia del anticuerpo secundario y por el contrario encontramos que estos presentaban altos niveles de autofluorescencia (Figura 12A-F). Este efecto se ha reportado es producido por lipofuscinas, provenientes de la oxidación de ácidos grasos insaturados, un indicativo de degeneración membranar, en consecuencia, de muerte celular (Di Guardo, 2015; Spitzer, Sammons y Price, 2012). Para corroborar la muerte celular, realizamos una tinción de hematoxilina-eosina. La morfología de las células se observa de forma granular, agrandada y carente de delineado, lo que es indicativo de que las células se encontraban en proceso de muerte o muertas (Figura 12G-L). Esto fue corroborado para todas las condiciones (Lesión, Sham y Control), así como a 7 y 15 dpt (n=34).

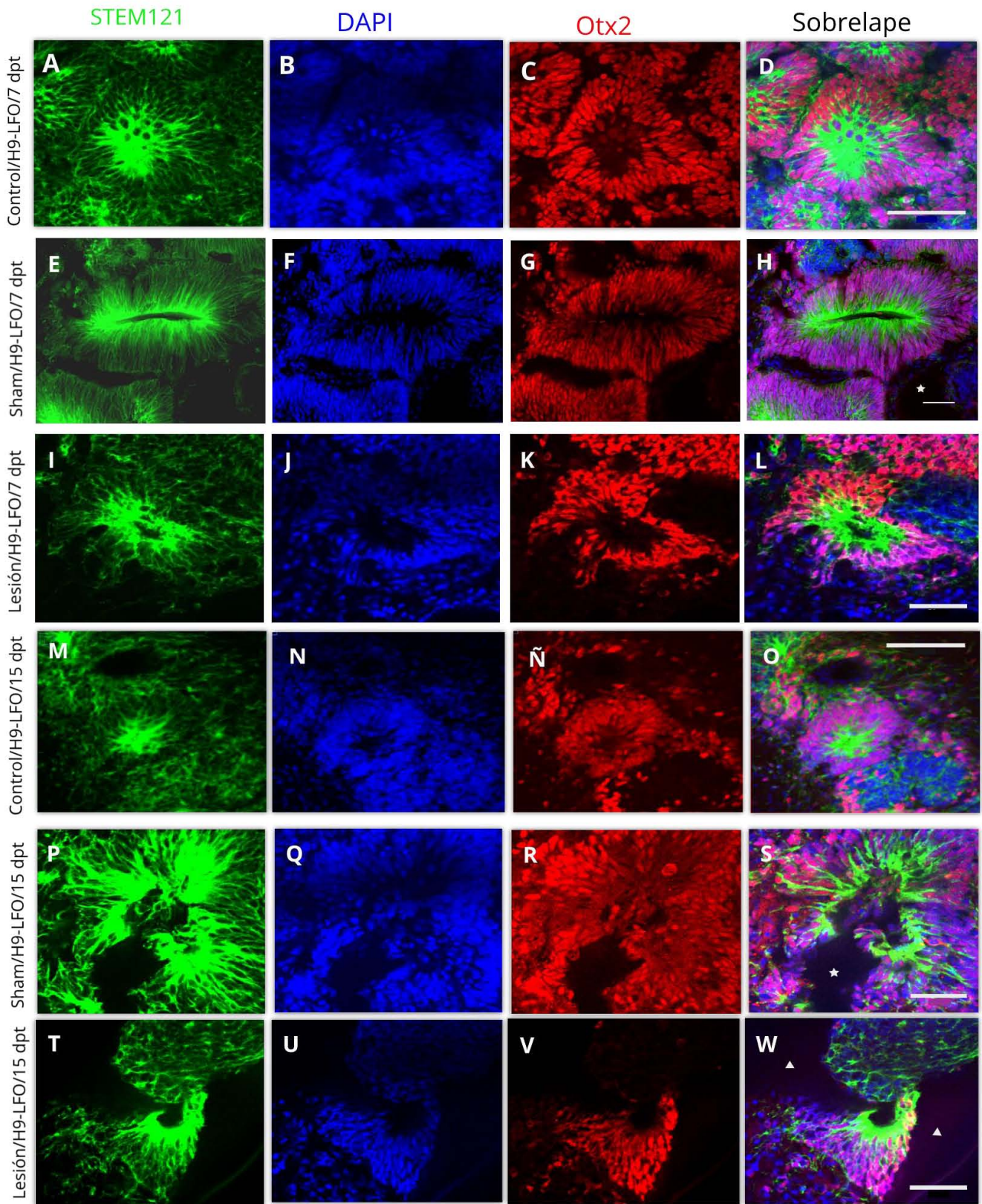


**Figura 12. La línea H9-PC presenta autofluorescencia y morfología anómala. (A-F)** Imágenes representativas de la autofluorescencia observada en los trasplantes de la línea H9-PC con el anticuerpo **(A)** STEM121, **(B)** el marcador nuclear DAPI y **(C)** campo claro. **(D)** Ampliación 40X de la imagen superior de STEM121 y **(E)** DAPI. **(F)** Sobrelape de E y F. Las imágenes corresponden a una rata del grupo Lesión/H9-PC/7dpt. **(G-L)** Fotografías representativas de la prueba para hematoxilina-eosina con magnificación subsecuente en el recuadro blanco. **(I y L)** En flechas blancas se muestra la morfología normal de una célula, mientras que las flechas negras señalan las células con tono amarillo y estructura anómala. Las imágenes corresponden a una rata de **(G-I)** 7 dpt y **(J-L)** 15 dpt. Barra de escala= **(C, G y J)** 200  $\mu\text{m}$ , **(H y K)** 100  $\mu\text{m}$ , **(F)** 50  $\mu\text{m}$ , **(I y L)** 20  $\mu\text{m}$ .

*El FT Otx2 se expresa a 7 y 15 dpt.*

El primer marcador de diferenciación DA analizado en las ESRN fue Otx2 (Omodei et al., 2008; Wurst y Bally-Cuif, 2001). Encontramos expresión robusta de este factor a 7 y 15 dpt tanto en animales lesionados con 6-OHDA como en Sham y Control (Figura 13). La señal colocaliza con el marcador de núcleo celular DAPI y no cambió durante esta ventana temporal, indicando que, a pesar de detectar la expresión del gen reportero eGFP en muy bajo nivel, las ESRN se encontraban en etapa de especificación DA.





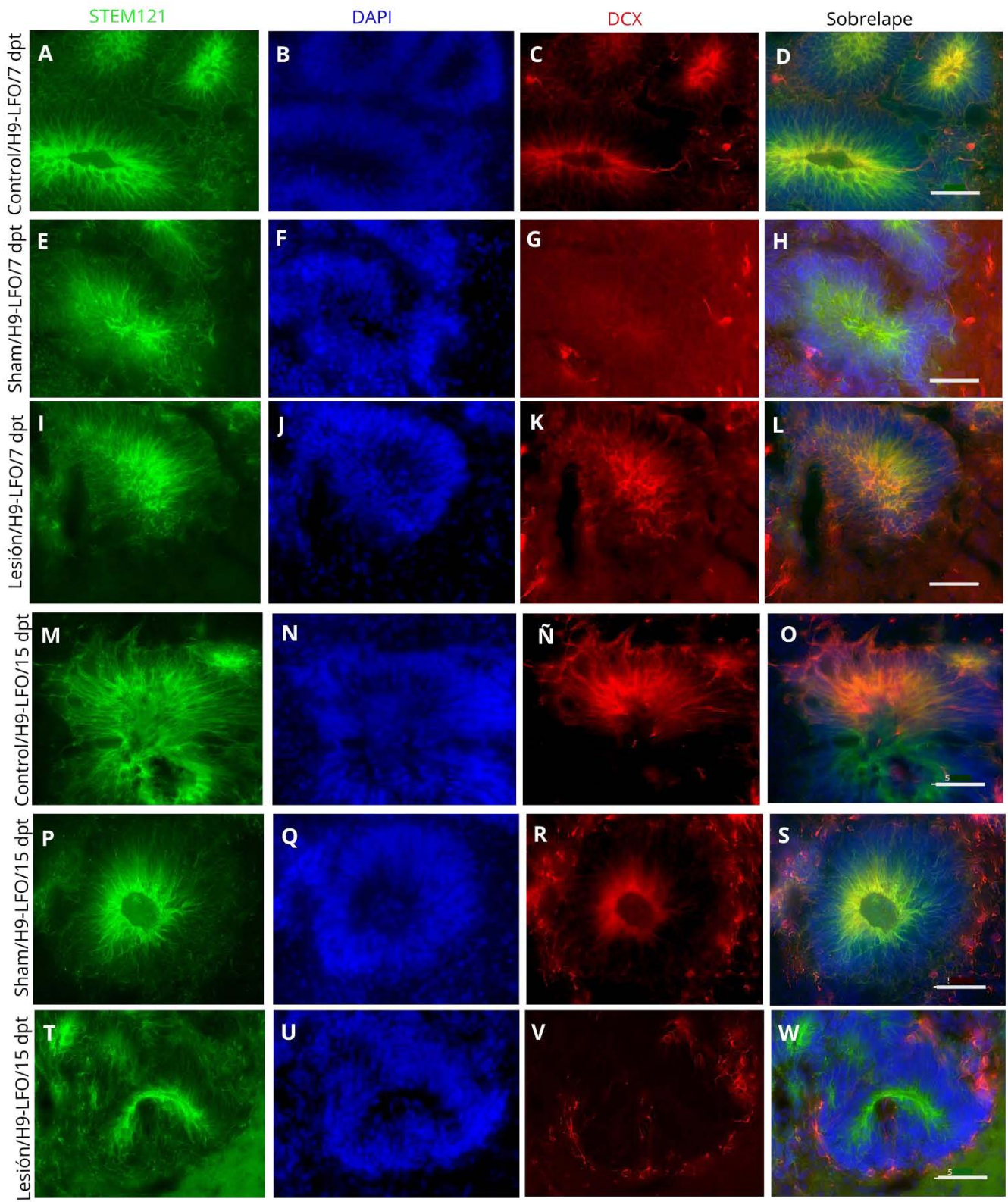
**Figura 13. Otx2 se expresa en ESRN de 7 y 15 dpt.** Imágenes representativas de ESRN encontradas a 7 (A-L) y 15 (M-W) dpt en animales control (A-D y M-O), Sham (E-H y P-S) y lesionados con 6-OHDA (I-L y T-W). En la primera columna se observa la señal citoplasmática de STEM121 (A, E, I, M, P, T). En la segunda columna el marcador nuclear DAPI (B, F, H, N, Q, U). En la tercera columna la del FT Otx2 (C, G, K, Ñ, R, V) y en la cuarta se muestran las imágenes sobrelapadas (D, H, L, S, O, W). Las estrellas en H y S señalan el tejido perdido durante la obtención y el manejo de la muestra. Los triángulos en W indican que el tejido circundante se encuentra en otro plano de la misma imagen. Barra de escala = 50 µm excepto en D y Q = 70 µm.

#### *Las ESRN expresan el marcador de TN ZO-1*

Durante el desarrollo de esta tesis, A. Morato-Torres (manuscrito en preparación) determinó que las ESRN encontradas expresaban Zonula occludens-1 (ZO-1) (datos no mostrados), una proteína de unión que se encuentra en el TN y en las rosetas neurales *in vitro* (Satomi et al., 2011). Por lo tanto, confirmó que las ESRN son, en efecto, rosetas neurales (RN). Por lo cual, el trasplante de CE de la línea H9-LFO en la SNpc inicia un proceso de diferenciación neural que mimetiza los protocolos de diferenciación en cultivo.

#### *DCX se expresa de manera diferencial a los 7 y 15 dpt en las RN*

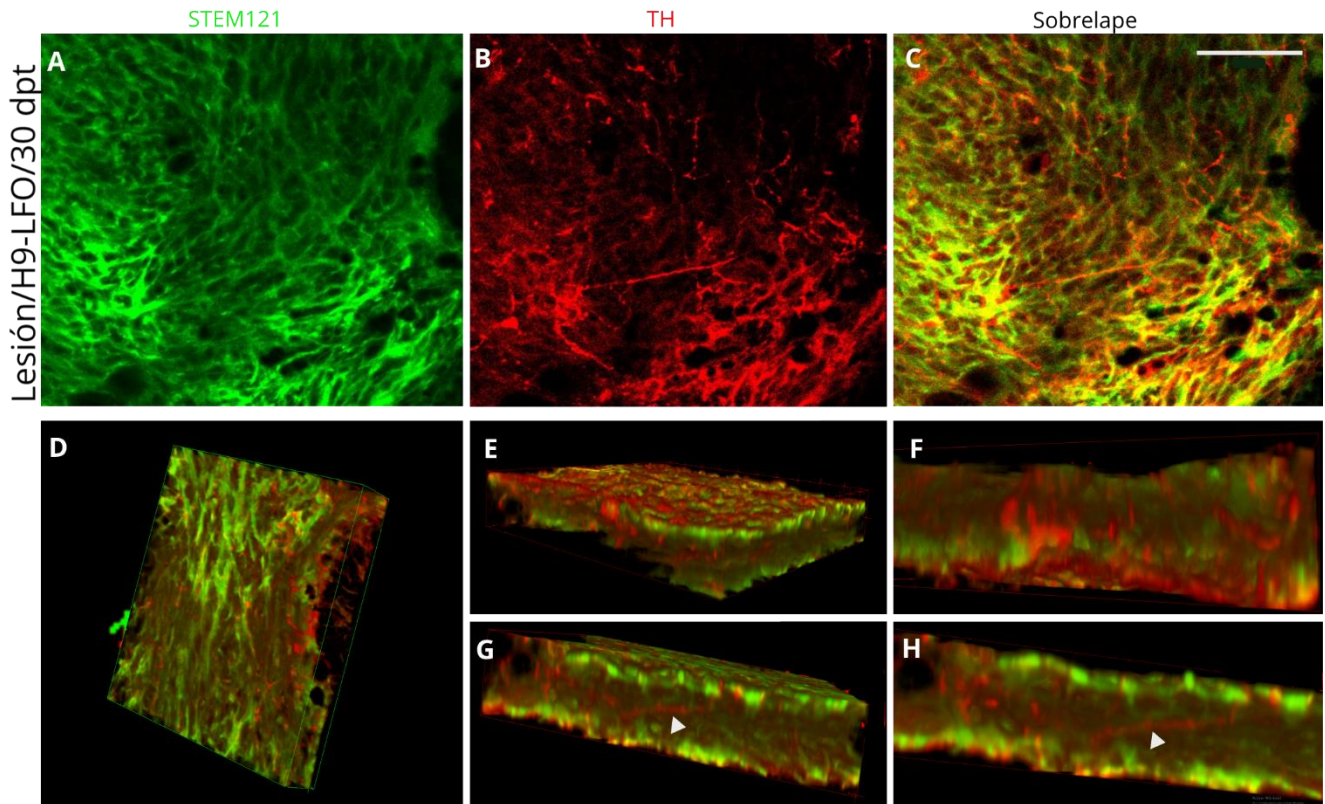
Al ser las RN una etapa formación que se produce en la etapa inicial de la diferenciación neural (Elkabetz et al., 2008; Malchenko et al., 2014) analizamos en ellas la expresión de la proteína de citoesqueleto neuronal DCX. La DCX forma parte de los microtúbulos en neuroblastos y neuronas jóvenes, además de ser un indicador de migración, neurogénesis y diferenciación neuronal (Brown et al., 2003; Francis et al., 1999; Gleeson et al., 1999). Encontramos que este marcador se expresa tanto a 7 como a 15 dpt en las RN (Figura 14). Además, su expresión cambió a lo largo de las diferentes etapas en que fue obtenido el cerebro, pasando la señal del interior de las RN a los 7 dpt al exterior de estas a 15 dpt y en todas las condiciones (Control, Sham y Lesión).



**Figura 14. DCX se expresa diferencialmente en las RN de 7 y 15 dpt.** Imágenes representativas de ESRN encontradas a 7 (A-L) y 15 (M-W) dpt en animales control (A-D y M-O), Sham (E-H y P-S) y lesionados con 6-OHDA (I-L y T-W). En la primera columna se observa la señal citoplasmática de STEM121 (A, E, I, M, P, T). En la segunda columna el marcador nuclear DAPI (B, F, H, N, Q, U). En la tercera columna la de DCX (C, G, K, Ñ, R, V) y en la cuarta se muestran las imágenes sobrelapadas (D, H, L, S, O, W). Barra de escala = 50  $\mu$ m.

#### *Las ESRN expresan TH a 30 dpt*

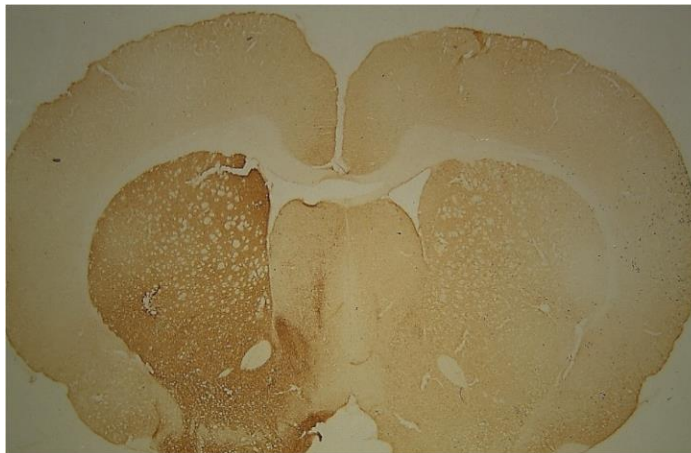
Dados los resultados de los marcadores de diferenciación obtenidos a 7 y a 15 dpt, decidimos ampliar la ventana temporal de la extracción del cerebro a 30 dpt para analizar la expresión de la enzima TH, un componente fundamental en la caracterización de las neuronas DA maduras. Encontramos que, al menos en las ratas lesionadas con 6-OHDA, las células de la línea H9-LFO adquirían una morfología de neurona madura y expresaban TH (Figura 15), indicando que la SNpc lesionada permite la diferenciación DA de CTEh comprometidas a un linaje DAm.



**Figura 15. Células derivadas de CE de la línea H9-LFO expresan TH a los 30 dpt.** Expresión de **(A)** STEM121 y **(B)** TH en un trasplante de la línea H9-LFO en un animal lesionado a 30 dpt. **(C)** Sobrelape de A y B. Barra de escala= 50  $\mu$ m. La morfología es claramente diferente a las RN observadas en tejidos de 7 y 15 dpt. **(D)** Reconstrucción tridimensional del trasplante con la expresión en verde de STEM121 y en rojo de TH. **(E-H)** Vista lateral de la reconstrucción. **(G)** Se apunta con una flecha blanca una proyección con TH. **(H)** Acercamiento digital de G.

*Verificación de la lesión con 6-OHDA a 30 dpt.*

Para verificar el nivel de denervación en el núcleo estriado provocado por la inyección de 6-OHDA en la SNpc, marcamos a la enzima TH mediante inmunohistoquímica en el estriado de una rata que fue trasplantada con células de la línea H9-LFO en etapa de CE y posteriormente sacrificada a los 30 dpt (Figura 16). La ausencia de TH indica que las células endógenas que proyectaban axones desde la SNpc fueron denervadas en su totalidad, indicando que a casi 2 meses de la lesión no hubo recuperación posible alguna de estas proyecciones.



**Figura 16. El núcleo estriado se encuentra denervado a 30 dpt.** Imagen panorámica representativa con tinción para TH donde se muestra la presencia del anticuerpo (café oscuro) en el hemisferio izquierdo y su ausencia en el hemisferio derecho.

## Discusión

Nuestros resultados sugieren que la SNpc ya sea lesionada con 6-OHDA, con inyección salina o sin intervención alguna previa al trasplante permite que células disgregadas de CE comprometidas a un linaje DAm por la sobre expresión de los factores Lmx1a, Foxa2 y Otx2 adquieran una morfología de RN, lo cual implica que empezaron un proceso de diferenciación neural.

La tasa de trasplantes que formaron RN, así como aquellas que no sobrevivieron nos permite determinar que, bajo nuestras condiciones de cultivo, trasplante e inmunosupresión no es posible que CTEh trasplantadas en etapa de CE sin estar comprometidas a un linaje celular sobrevivan en la SNpc, lo cual si ocurre con las células programadas para diferenciarse en neuronas DAm. Sin embargo, para determinar la causa de muerte de los trasplantes será necesario usar pruebas que identifiquen si se trató de un proceso apoptótico intrínseco de las células trasplantadas (Arya y White, 2015), o por señalización citotóxica del microambiente (Chan, Luz, y Moriwaki, 2015). Siendo la apoptosis propia lo más probable debido a que el microambiente permitió la sobrevivencia de los trasplantes de la línea H9-LFO.

La inmunohistoquímica realizada a los 30 dpt indica que, a pesar de que para esta etapa ya hay células con la enzima TH y, aunque pudieran estar produciendo dopamina, aun es una etapa muy temprana para que hubiese recuperación posible de las proyecciones desde la SNpc. Mas aún, indica que, en nuestro modelo, y con base a lo reportado anteriormente, no hay recuperación de estas proyecciones a esta etapa.

El vector presente en la línea H9-LFO consta de la expresión de 3 genes dirigidos por un promotor de Nestina. El orden en el que fueron diseñados para transcribirse Nestina → Lmx1a → Foxa2 → Otx2 → GFP nos indica que, si observamos la expresión de GFP es muy probable que los demás genes también se estén traduciendo. Sin embargo, la señal de GFP *in vivo* no fue lo suficientemente alta para que pudiésemos detectarla, pero si la del gen Otx2 en las RN. Por esto consideramos que el vector si se está traduciendo y decidimos que la mejor opción para distinguir las células trasplantadas de las endógenas era realizar un marcaje directo con el anticuerpo STEM121 en el canal verde.

Uno de los factores más importantes que cabe destacar es la aparente ausencia de diferencias entre las rosetas encontradas en las ratas lesionadas con 6-OHDA, inyectadas con solución salina e intactas. Todas presentaron Otx2 y DCX a los 7 y 15 dpt; las señales de migración encontradas en el marcaje de DCX son similares entre estas condiciones y el marcador ZO-1 se mantiene sin diferencia cualitativa (datos no mostrados). Por lo tanto, consideramos que las señales de muerte generadas por la inyección de la neurotoxina no son necesarias ni suficientes para que se desarrollen las RN. Dados nuestros resultados, postulamos que el microambiente del mesencéfalo ventral tiene más relevancia para permitir el desarrollo de neuronas DA, mientras se exprese el conjunto de FT Lmx1a, Foxa2 y Otx2, la SNpc será permisiva para la sobrevivencia y diferenciación de las CTEh.

El comportamiento que observamos en la proteína DCX, asociada a migración neuronal, resulta similar al comportamiento de otras proteínas asociadas al citoesqueleto en RN obtenidas *in vitro* (Grabiec et al., 2016; Hrívcová et al., 2018). Puesto que las células de las RN son dinámicas y evolucionan con respecto al tiempo hacia un fenotipo más maduro, es común que ciertos marcadores cambien su patrón de expresión conforme las rosetas se diferencian. El grupo de Sun (Hrívcová et al., 2018), estudió el desarrollo de las RN describiendo 5 etapas. En la primera etapa se observa la intercalación entre las células que formarán la roseta, en la segunda etapa se constriñen, en la tercera se polarizan hacia el centro o la parte apical de la roseta. La penúltima etapa está constituida por la elongación de las células de la roseta para finalmente formar el lumen, la zona del centro que no cuenta con células. Nuestros resultados sugieren que la expresión de DCX, proteína implicada en la migración de precursores neurales, difiere en las condiciones de 7 y 15 dpt en las RN, observándose inicialmente en la zona luminal y finalmente en la región basal. Además, señala que las RN se encuentran totalmente formadas, al observarse claramente el lumen.

ZO-1 es una proteína que forma parte de la formación del tubo neural y el neuroepitelio en general (Satomi et al., 2011; Hrívcová et al., 2018). Junto con beta-catenina, una molécula de adhesión neuronal que se encuentra asociada al desarrollo del tubo neural, se considera como un marcador de RN *in vitro*. Estas 2 moléculas aseguran la forma de las RN, pues en su ausencia no se generan estas estructuras (Hrívcová et al., 2018), lo que demuestra su dependencia a las moléculas de adhesión celular. Por lo cual, esperaríamos que al hacer un marcaje contra beta-catenina en las RN encontradas en nuestro trasplante, esta proteína se encontrara colocalizando con ZO-1.



Las RN se han descrito como parte del proceso temprano de diferenciación neuronal por los marcadores que expresan. Las RN que encontramos expresaban Otx2 y DCX en concordancia con lo previamente observado en estas formaciones (Elkabetz et al., 2008; Kindberg et al., 2014; Koch et al., 2009; Malchenko et al., 2014). Finalmente, el haber encontrado la expresión de uno de los marcadores clave para la identificación de las neuronas DA maduras como lo es TH en tan solo 30 días, nos da indicios del gran potencial de diferenciación que tiene la línea H9-LFO y del efecto sinérgico que tienen los 3 FT para dirigir la especificación DA (Daubner, Le, y Wang, 2012).

### **Modelo conductual**

Nuestro modelo de lesión degenera las neuronas noradrenérgicas de la SNpc, disminuyendo entre un 90 y 99 % los niveles de dopamina en el estriado del hemisferio lesionado (Brooks y Dunnett, 2012), lo que produce síntomas motores en los animales lesionados. Para probar que algún tratamiento incrementó la dopamina liberada en el estriado se realiza la prueba de giro antes y después de su aplicación, si el número de giros disminuyó significativamente se considera que la intervención en efecto aumentó la dopamina. En nuestro proyecto realizamos la prueba de giro una semana antes de trasplantar los cuerpos embrioides. Debido a que hasta los 30 dpt observamos la presencia de TH en las células trasplantadas consideramos que a partir de esta etapa sería necesario realizar la prueba de giro en las ratas, además de hacer pruebas sucesivas a 2, 4 y 6 meses post-trasplante. Esta información nos permitiría determinar si el trasplante genera una mejora conductual, esto es, se vuelve funcional o no.

Además de postura asimétrica y conducta motora, una lesión completa unilateral produce deficiencias en la iniciación del movimiento en la dirección contralateral de la lesión y de atención sensorial (Mokry, 1995; Fleming y Chesselet, 2006; Taylor, Greene y Miller, 2010; Plowman y Kleim, 2011; Brooks y Dunnett, 2012). Existen otras pruebas experimentales que evalúan la presencia y el grado de los síntomas mencionados anteriormente. En la prueba de Rotarod, por ejemplo, se coloca a una rata lesionada en un cilindro rotatorio por 10 minutos, si la rata cae se le da un estímulo eléctrico, se contabilizan los estímulos eléctricos y dependiendo del número que acumule se determina el nivel del daño motor (Plowman y Kleim, 2011). Otra prueba es la asimetría en uso en extremidades. En esta se evalúa que extremidad usa la rata preferentemente, si utiliza con mucho menor frecuencia el lado contralateral al lesionado, se considera daño motor. Además, se contabiliza el tiempo de

iniciación del movimiento. Otra forma de evaluar la conducta motora es al examinar los movimientos finos de agarre de objetos, al alcanzar objetos pequeños como pellets de comida, semillas o pastas delgadas, así como otras pruebas de habilidad motora como escalado, presionado de palanca o pruebas de escalera (Mokrý, 1995; Plowman y Kleim, 2011). Por lo tanto, aplicar estas pruebas antes y después de trasplantar las células H9-LFO podría permitirnos discernir la capacidad motora remanente y progresiva con datos adicionales a la prueba de giro.

También se han desarrollado pruebas para evaluar la atención a estímulos pues al examinar el lado contralateral e ipsilateral a la lesión se evidencian deficiencias de atención contralaterales al hemisferio inyectado con 6-OHDA; por eso se ha determinado que la orientación sensoriomotora también se ve comprometida. Para evaluar estas deficiencias sensoriales se puede realizar la prueba de reacción de elección lateralizada en la cual, en general, se colocan a las ratas lesionadas en un cilindro donde se les presenta un estímulo del lado ipsilateral o contralateral a la lesión y se registra el tiempo que tardan en responder a dicho estímulo. Se evalúa en su mayor parte el sentido del olfato, reacciones al dolor y al toque de las vibrisas de las ratas (Brooks y Dunnett, 2012).

Implementar las pruebas antes mencionadas nos ayudaría a evaluar de una manera más completa los efectos del trasplante celular y determinar si existe alguna mejoría en cualquiera de estas pruebas dadas nuestras condiciones. Sin embargo, este proyecto fue una primera aproximación al estudio de la capacidad de diferenciación de células dirigidas a un fenotipo específico en las variaciones del microambiente de la SNpc a una etapa a mediano plazo, *a posteriori* se requerirá contar con el número suficiente de animales para evaluar estas pruebas con una estadística robusta. Pero dado el número suficiente de animales trasplantados con la línea celular H9-LFO desde un plazo de 30 dpt (cuando ya hay expresión de TH) y 5 meses (cuando Grealish observó el desarrollo de proyecciones de neuronas en la SNpc hacia el estriado) realizar pruebas conductuales de esta índole podría elucidar el desarrollo de las proyecciones a la par de su efecto en la conducta motora. Estudiar los síntomas conductuales para comprobar la funcionalidad y el papel del trasplante para recuperar los niveles de DA en el estriado resulta necesario para complementar el conocimiento del potencial del microambiente y la línea H9-LFO para disminuir las deficiencias motoras.

## **Conclusión**

La línea H9-LFO trasplantada en etapa de CE en la SNpc lesionada y sin lesionar fue capaz de iniciar y mantener desde los 7 dpt hasta los 30 dpt un proceso de desarrollo de tipo DA, demostrado por la presencia de uno de los FT mesencefálicos Otx2, la proteína de desarrollo neuronal DCX en las ESRN y por la enzima TH en células trasplantadas. Por lo cual, la SNpc es un nicho permisivo para la diferenciación neuronal y DA.

## **Perspectivas**

Ampliar la ventana de tiempo del trasplante es un paso necesario para esclarecer si las CTEh son capaces de alcanzar la diferenciación DAm completa, así como su capacidad funcional en el encéfalo para proyectar axones al núcleo estriado y liberar dopamina. De igual importancia es determinar si existen mejoras conductuales a través pruebas motoras en el modelo de la EP.

## REFERENCIAS

- Andersson, E., Tryggvason, U., Deng, Q., Friling, S., Alekseenko, Z., Robert, B., Ericson, J. (2006). Identification of intrinsic determinants of midbrain dopamine neurons. *Cell*, 124(2), 393–405. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.10.037>
- Arya, R., y White, K. (2015). Cell death in development: Signaling pathways and core mechanisms., 25(4), 368–379. <https://doi.org/10.1016/j.cogdev.2010.08.003>. Personal
- Baizabal, J. M., y Covarrubias, L. (2009). The embryonic midbrain directs neuronal specification of embryonic stem cells at early stages of differentiation. *Developmental Biology*, 325(1), 49–59. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2008.09.024>
- Boronat-García, A., Guerra-Crespo, M., y Drucker-Colín, R. (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>
- Bové, J., y Perier, C. (2012). Neurotoxin-based models of Parkinson's disease. *Neuroscience*, 211, 51–76. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.10.057>
- Brickman, J. M., y Serup, P. (2017). Properties of embryoid bodies. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology*, 6(2). <https://doi.org/10.1002/wdev.259>
- Brooks, S. P., & Dunnett, S. B. (2013). Cognitive deficits in animal models of basal ganglia disorders. *Brain Research Bulletin*, 92, 29–40. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2012.04.011>
- Brown, J. P., Couillard-Després, S., Cooper-Kuhn, C. M., Winkler, J., Aigner, L., y Kuhn, H. G. (2003). Transient Expression of Doublecortin during Adult Neurogenesis. *Journal of Comparative Neurology*, 467(1), 1–10. <https://doi.org/10.1002/cne.10874>
- Castro, E. S., Santos-García, D., de Deus Fonticoba, T., Expósito Ruíz, I., Tuñas Gesto, C., y Arribí, M. M. (2016). Causes and factors related to dopamine agonist withdrawal in Parkinson's disease. *Brain and Behavior*, 453, 1–7. <https://doi.org/10.1002/brb3.453>
- Cervantes-Arriaga, A., Rodríguez-Violante, M., López-Ruiz, M., Estrada-Bellmann, I., Zuñiga-Ramírez, C., Otero-Cerdeira, E., Martínez-Ramírez, D. (2013). Caracterización de la enfermedad de Parkinson en México: estudio ReMePARK ARTÍCULO ORIGINAL. *Gaceta Médica de México*, 149, 497–501.
- Chan, F. K.-M., Luz, N. F., y Moriwaki, K. (2015). *Programmed necrosis in the cross talk of cell death and inflammation*. (Vol. 25). <https://doi.org/10.1016/j.cogdev.2010.08.003>. Personal
- Chen, Y., y Lai, D. (2014). Pluripotent States of Human Embryonic Stem Cells. *Cellular Reprogramming*, 17(1), 1–6. <https://doi.org/10.1089/cell.2014.0061>

- Daubner, S. C., Le, T., y Wang, S. (2012). Tyrosine Hydroxylase and Regulation of Dopamine Synthesis. *Arch Biochem Biophys*, 508(1), 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2010.12.017>.Tyrosine
- Dauer, W., y Przedborski, S. (2003). Parkinson's disease: Mechanisms and models. *Neuron*, 39(6), 889–909. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(03\)00568-3](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(03)00568-3)
- de la Riva, P., Smith, K., Xie, S. X., y Weintraub, D. (2014). Course of psychiatric symptoms and global cognition in early Parkinson disease. *Neurology*, 83(12), 1096–1103.
- Di Guardo, G. (2015). Lipofuscin, lipofuscin-like pigments and autofluorescence. *European Journal of Histochemistry*, 59(1), 1–2. <https://doi.org/10.4081/ejh.2015.2485>
- Elkabetz, Y., Panagiotakos, G., Al Shamy, G., Socci, N. D., Tabar, V., y Studer, L. (2008). Human ES cell-derived neural rosettes reveal a functionally distinct early neural stem cell stage. *Genes and Development*, 22(2), 152–165. <https://doi.org/10.1101/gad.1616208>
- Fahn, S. (2015). The medical treatment of Parkinson disease from James Parkinson to George Cotzias. *Movement Disorders*, 30(1), 4–18. <https://doi.org/10.1002/mds.26102>
- Ferri, A. L. M., Lin, W., Mavromatakis, Y. E., Wang, J. C., Sasaki, H., Whitsett, J. A., y Ang, S.-L. (2007). Foxa1 and Foxa2 regulate multiple phases of midbrain dopaminergic neuron development in a dosage-dependent manner. *Development*, 134(15), 2761–2769. <https://doi.org/10.1242/dev.000141>
- Fleming, S. M., & Chesselet, M. F. (2006). Behavioral phenotypes and pharmacology in genetic mouse models of Parkinsonism. *Behavioural Pharmacology*, 17(5–6), 383–391. <https://doi.org/10.1097/00008877-200609000-00004>
- Francis, F., Koulakoff, A., Boucher, D., Chafey, P., Schaar, B., Vinet, M. C., Chelly, J. (1999). Doublecortin is a developmentally regulated, microtubule-associated protein expressed in migrating and differentiating neurons. *Neuron*, 23(2), 247–256. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80777-1](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80777-1)
- French, I. T., y Muthusamy, K. A. (2016). A Review of Sleep and Its Disorders in Patients with Parkinson's Disease in Relation to Various Brain Structures. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 8(May), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2016.00114>
- Friling, S., Andersson, E., Thompson, L. H., Jönsson, M. E., Hebsgaard, J. B., Nanou, E., Ericson, J. (2009). Efficient production of mesencephalic dopamine neurons by Lmx1a expression in embryonic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(18), 7613–8. <https://doi.org/10.1073/pnas.0902396106>

- Fundament, T., Eldridge, P. R., Green, A. L., Whone, A. L., Taylor, R. S., Williams, A. C., y Schuepbach, W. M. M. (2016). Deep Brain Stimulation for Parkinson's Disease with Early Motor Complications: A UK Cost-Effectiveness Analysis. *Plos One*, *11*(7), e0159340.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0159340>
- Fuchs, E., Tumber, T., & Guasch, G. (2004). Socializing with the neighbors: Stem cells and their niche. *Cell*, *116*(6), 769–778. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(04\)00255-7](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(04)00255-7)
- Grabiec, M., Hříbková, H., Vařecha, M., Strítecká, D., Hampl, A., Dvořák, P., & Sun, Y. M. (2016). Stage-specific roles of FGF2 signaling in human neural development. *Stem Cell Research*, *17*(2), 330–341. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2016.08.012>
- Glavaski-Joksimovic, A., y Bohn, M. C. (2013). Mesenchymal stem cells and neuroregeneration in Parkinson's disease. *Experimental Neurology*, *247*, 25–38.  
<https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2013.03.016>
- Gleeson, J. G., Peter T, L., Flanagan, L. A., y Walsh, C. A. (1999). Doublecortin is a microtubule-associated protein and is expressed widely by migrating neurons. *Neuron*, *23*(2), 257–271.  
[https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80778-3](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80778-3)
- Goetz, C. G. (2011). The history of Parkinson's disease: Early clinical descriptions and neurological therapies. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, *1*(1).  
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a008862>
- Grealish, S., Diguët, E., Kirkeby, A., Mattsson, B., Heuer, A., Bramoulle, Y., Parmar, M. (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), 653–665.  
<https://doi.org/10.1016/j.stem.2014.09.017>
- Guerrero-Flores, G., y Covarrubias, L. (2011). Dopaminergic Differentiation Potential of Neural Precursor Cells Derived from Embryonic Stem Cells. In *Embryonic Stem Cells: The hormonal regulation of pluripotency and embryogenesis* (pp. 414–428).
- Hříbková, H., Grabiec, M., Klemová, D., Slaninová, I., & Sun, Y.-M. (2018). Five steps to form neural rosettes: structure and function. *Journal of Cell Science*, *131*(3), jcs206896.  
<https://doi.org/10.1242/jcs.206896>
- Itskovitz-Eldor, J., Schuldiner, M., Karsenti, D., Eden a, Yanuka, O., Amit, M., Benvenisty, N. (2000). Differentiation of human embryonic stem cells into embryoid bodies compromising the three embryonic germ layers. *Molecular Medicine (Cambridge, Mass.)*, *6*(2), 88–95.  
<https://doi.org/10859025>

- Jahanshahi, M. (2013). Effects of deep brain stimulation of the subthalamic nucleus on inhibitory and executive control over prepotent responses in Parkinson's disease. *Frontiers in Systems Neuroscience*, 7(December), 118. <https://doi.org/10.3389/fnsys.2013.00118>
- Jeong, Y., y Epstein, D. J. (2003). Distinct regulators of Shh transcription in the floor plate and notochord indicate separate origins for these tissues in the mouse node. *Development (Cambridge, England)*, 130, 3891–3902. <https://doi.org/10.1242/dev.00590>
- Jozefczuk, J., Drews, K., y Adjaye, J. (2012). Preparation of mouse embryonic fibroblast cells suitable for culturing human embryonic and induced pluripotent stem cells. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, (64), e3854. <https://doi.org/10.3791/3854>
- Keller, G. (2017). Embryonic stem cell differentiation: emergence of a new era in biology and medicine. *Genes & Development*, 19, 1129–1155. <https://doi.org/10.1101/gad.1303605>.)
- Kim, K.-S., Kim, C.-H., Hwang, D.-Y., Seo, H., Chung, S., Hong, S. J., Isacson, O. (2003). Orphan nuclear receptor Nurr1 directly transactivates the promoter activity of the tyrosine hydroxylase gene in a cell-specific manner. *Journal of Neurochemistry*, 85(3), 622–634. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2003.01671.x>
- Kindberg, A. A., Bendriem, R. M., Spivak, C. E., Chen, J., Handreck, A., Lupica, C. R., Lee, C.-T. (2014). An in vitro model of human neocortical development using pluripotent stem cells: cocaine-induced cytoarchitectural alterations. *Disease Models & Mechanisms*, 7(12), 1397–1405. <https://doi.org/10.1242/dmm.017251>
- Kirkeby, A., Grealish, S., Wolf, D. A., Nelander, J., Wood, J., Lundblad, M., Parmar, M. (2012). Generation of Regionally Specified Neural Progenitors and Functional Neurons from Human Embryonic Stem Cells under Defined Conditions. *Cell Reports*, 1(6), 703–714. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2012.04.009>
- Kirkeby, A., Nelander, J., y Parmar, M. (2012). Generating regionalized neuronal cells from pluripotency, a step-by-step protocol. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 6(January), 64. <https://doi.org/10.3389/fncel.2012.00064>
- Koch, P., Opitz, T., Steinbeck, J. A., Ladewig, J., y Brustle, O. (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), 3225–3230. <https://doi.org/10.1073/pnas.0808387106>
- Lee, A., y Gilbert, R. M. (2016). Epidemiology of Parkinson Disease. *Neurologic Clinics*, 34(4), 955–965. <https://doi.org/10.1016/j.ncl.2016.06.012>

- Malchenko, S., Xie, J., de Fatima Bonaldo, M., Vanin, E. F., Bhattacharyya, B. J., Belmadani, A., Soares, M. B. (2014). Onset of rosette formation during spontaneous neural differentiation of hESC and hiPSC colonies. *Gene*, 534(2), 400–407. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2013.07.101>
- Martin, G. R. (1981). Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 78(12), 7634–7638. <https://doi.org/10.1073/pnas.78.12.7634>
- Matise, M. P., Epstein, D. J., Park, H. L., Platt, K. A., y Joyner, A. L. (1998). Gli2 is required for induction of floor plate and adjacent cells, but not most ventral neurons in the mouse central nervous system. *Development (Cambridge, England)*, 125(15), 2759–2770. <https://doi.org/9655799>
- Maya-Espinosa, G., Collazo-Navarrete, O., Millán-Aldaco, D., Palomero-Rivero, M., Guerrero-Flores, G., Drucker-Colín, R., Guerra-Crespo, M. (2015). Mouse Embryonic Stem Cell-Derived Cells Reveal Niches that Support Neuronal Differentiation in the Adult Rat Brain. *Stem Cells*, 33(2), 491–502.
- Michel, P. P., Hirsch, E. C., y Hunot, S. (2016). Understanding Dopaminergic Cell Death Pathways in Parkinson Disease. *Neuron*, 90(4), 675–691. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.03.038>
- Mokry, J. (1995). Experimental models and behavioural tests used in the study of Parkinson's disease. *Physiological Research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca*, 44(3), 143–150.
- Morrison, S. J., & Spradling, A. C. (2008). Stem Cells and Niches: Mechanisms That Promote Stem Cell Maintenance throughout Life. *Cell*, 132(4), 598–611. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.01.038>
- Morizane, A., Darsalia, V., Guloglu, M. O., Hjalt, T., Carta, M., Li, J. Y., y Brundin, P. (2010). A simple method for large-scale generation of dopamine neurons from human embryonic stem cells. *Journal of Neuroscience Research*, 88(16), 3467–3478. <https://doi.org/10.1002/jnr.22515>
- Niakan, K. K., y Eggan, K. (2013). Analysis of human embryos from zygote to blastocyst reveals distinct gene expression patterns relative to the mouse. *Developmental Biology*, 375(1), 54–64. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2012.12.008>
- Omodei, D., Acampora, D., Mancuso, P., Prakash, N., Di Giovannantonio, L. G., Wurst, W., y Simeone, A. (2008). Anterior-posterior graded response to Otx2 controls proliferation and differentiation of dopaminergic progenitors in the ventral mesencephalon. *Development*, 135(20), 3459–3470. <https://doi.org/10.1242/dev.027003>
- Parkinson, J. (2002). An essay on the shaking palsy. *Journal of Neuropsychiatry Clinical Neuroscience*, 1–2. <https://doi.org/10.1007/s00702-017-1684-0>
- Paxinos, G. (2004). *The rat brain in stereotaxic coordinates / (5°)*.
- Pfeiffer, R. F., Petrucci, S., Arena, G., y Valente, E. M. (2015). Parkinson disease. *Movement Disorders*, 229–276.



- Plowman, E. K., & Kleim, J. A. (2011). Behavioral and neurophysiological correlates of striatal dopamine depletion: A rodent model of Parkinson's disease. *Journal of Communication Disorders*, 44(5), 549–556. <https://doi.org/10.1016/j.jcomdis.2011.04.008>
- Poewe, W., Seppi, K., Tanner, C. M., Halliday, G. M., Brundin, P., Volkman, J., Lang, A. E. (2017). Parkinson disease. *Nature Reviews Disease Primers*, 3, 17013. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.13>
- Rathjen, J., y Rathjen, P. D. (2001). Mouse ES cells: Experimental exploitation of pluripotent differentiation potential. *Current Opinion in Genetics and Development*, 11(5), 587–594. [https://doi.org/10.1016/S0959-437X\(00\)00237-9](https://doi.org/10.1016/S0959-437X(00)00237-9)
- Sánchez-Danés, A., Consiglio, A., Richaud, Y., Rodríguez-Pizà, I., Dehay, B., Edel, M., Izpisua Belmonte, J. C. (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>
- Satomi, K., Morishita, Y., Sakashita, S., Kondou, Y., Furuya, S., Minami, Y., y Noguchi, M. (2011). Specific expression of ZO-1 and N-cadherin in rosette structures of various tumors: Possible recapitulation of neural tube formation in embryogenesis and utility as a potentially novel immunohistochemical marker of rosette formation in pulmonary neuroendo. *Virchows Archiv*, 459(4), 399–407. <https://doi.org/10.1007/s00428-011-1120-z>
- Saucedo-Cardenas, O., Quintana-Hau, J. D., Le, W. D., Smidt, M. P., Cox, J. J., De Mayo, F., Conneely, O. M. (1998). Nurr1 is essential for the induction of the dopaminergic phenotype and the survival of ventral mesencephalic late dopaminergic precursor neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(7), 4013–8. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.7.4013>
- Spitzer, N., Sammons, G. S., y Price, E. M. (2012). Autofluorescent cells in rat brain can be convincing impostors in green fluorescent reporter studies, 197(1), 48–55. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2011.01.029> Autofluorescent
- Taylor, T. N., Greene, J. G., & Miller, G. W. (2011). Behavioral phenotyping of mouse models of Parkinson's disease. *Behavioral Neuroscience*, 211(1), 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2010.03.004> Behavioral
- Thomson, J. A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S. S., Waknitz, A. A., Swiergiel, J. J., Marshall, V. S., y Jones, J. M. (1998). Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts. *Science*, 282(November), 1145–1147.

- Villa-Diaz, L. G., Ross, A. M., Lahann, J., y Krebsbach, P. H. (2013). Concise review: The evolution of human pluripotent stem cell culture: From feeder cells to synthetic coatings. *Stem Cells*, *31*(1), 1–7. <https://doi.org/10.1002/stem.1260>
- Wurst, W., y Bally-Cuif, L. (2001). Neural plate patterning: upstream and downstream of the isthmic organizer. *Nature Reviews Neuroscience*, *2*, 99–108.
- Zhu, F., Gamboa, M., Farruggio, A. P., Hippenmeyer, S., Tasic, B., Schüle, B., Calos, M. P. (2014). DICE, an efficient system for iterative genomic editing in human pluripotent stem cells. *Nucleic Acids Research*, *42*(5), e34. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1290>