



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Caracterización *in vivo* del potencial dopaminérgico de células troncales pluripotentes inducidas derivadas de pacientes con la enfermedad de Parkinson que sobreexpresan Lmx1a/FoxA2/Otx2

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Maestro en Ciencias

PRESENTA:

Lic. Rodrigo Ramos Acevedo

TUTOR PRINCIPAL:

Dra. Magdalena Guerra Crespo

IFC

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Anayansi Molina Hernández

INPER

Dr. Félix Recillas Targa

IFC

Ciudad de México, 2020.



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## Agradecimientos

Este trabajo se realizó bajo la tutoría de la Dra. Magdalena Guerra Crespo en el laboratorio AL-201 del Instituto de Fisiología Celular y en el laboratorio de Medicina Regenerativa de la Facultad de Medicina.

Para la realización de este trabajo se contó con el donativo de DGAPA-PAPIIT IN207116 e IN211419 y CONACyT A1-S-10064. Así como beca de posgrado para Maestría por parte de CONACyT. Además, le agradezco al Programa de Apoyo a los Estudios del Posgrado (PAEP) por el apoyo recibido para ir asistir a un congreso en Juriquilla.

El proyecto se desarrolló gracias a la ayuda de la Bióloga Marcela Palomero Rivero que nos auxilió en el manejo adecuado de los animales, la obtención de las muestras y logística; así como con el de la Bióloga Diana Millán Aldaco que nos auxilió en el corte de los cerebros y de los cuerpos embrioides para realizar las inmunofluorescencias.

A Sandra Daniela Rodríguez Montañó de la unidad de histología IFC, UNAM que también nos brindó constante apoyo en el procesamiento de diversas muestras y tinciones.

A la M. V. Z Claudia V. Rivera Cerecedo y al equipo del Bioterio del IFC por proveernos de animales aún en circunstancias inesperadas, así como enseñarme el correcto manejo de estos.

A Francisco Pérez Eugenio y a Ana María Escalante Gonzalbo de la Unidad de Computo por su apoyo en los problemas de hardware y software que enfrentamos.

A la Dra. Carolina Escobar Briones por el préstamo de su microscopio de luz para la obtención de imágenes. También al M. en C. Andrés Saraleguí Amaro y al Dr. Abraham Rosas Arellano por su invaluable ayuda y paciencia para la obtención de las imágenes. Un grato agradecimiento al LNMA del IBT y a toda la Unidad de Imagenología del IFC.

Un gran agradecimiento a la Dra. Anayansi Molina Hernández y al Dr. Félix Recillas Targa, por brindarme su tiempo, crítica y retroalimentación para la realización de esta, mi tesis y proyecto de investigación.

Un especial agradecimiento a la Dra. Birgitt Schüle por habernos donado las líneas celulares y apoyado en la realización del proyecto con reactivos, sugerencias y críticas constructivas.

Doctora Magdalena Guerra Crespo, muchas gracias por guiarme durante estos cuatro años, tan difíciles como recompensantes. Aprendí muchísimo de usted y siempre le estaré agradecido. Le deseo lo mejor.

## *Agradecimientos*

*A mi familia, amigos, compañeros y aquellos que estuvieron ahí en esta etapa tan  
contrastante pero formativa*

*A mi padre, por ser mi gran maestro*

*A mi madre, por ser mi guía y soporte*

*A mi hermano, por ser mi compañero de vida*

*A toda mi familia, por creer en mi*

*A mis amigos, que nunca me dejaron y estuvieron ahí, aún en lo más difícil*

*A mis compañeros, que se volvieron mis amigos y su apoyo nunca faltó*

*A cada uno de ustedes*

*Les debo todo*

*gracias*

# INDICE

ABREVIATURAS.....	1
RESUMEN.....	3
ABSTRACT.....	4
INTRODUCCIÓN.....	6
1. La enfermedad de Parkinson (EP).....	5
1.1 Epidemiología.....	5
1.2 Sintomatología .....	6
1.3 Factores de riesgo .....	7
1.4 Alfa-sinucleína y su relación con la EP.....	8
1.5 Terapia celular en la EP.....	10
2. Células troncales.....	11
2.1 Células troncales pluripotentes inducidas (CTPi).....	11
2.2 El cuerpo embrioide (CE).....	12
3. Células troncales en la EP.....	14
3.1 Diferenciación dopaminérgica mesencefálica (DAm) en el desarrollo embrionario.....	14
ANTECEDENTES.....	16
3.2 Diferenciación dopaminérgica inducida en cultivo.....	16
3.3 Diferenciación neuronal en la Sustancia Nigra <i>pars compacta</i> (SNpc) .....	17
JUSTIFICACIÓN.....	20
PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	21
HIPÓTESIS.....	21
OBJETIVOS.....	21
MATERIALES Y MÉTODO.....	22
Animales.....	22
Modelo de la EP (Lesión en la SNpc con 6-hidroxidopamina).....	23
Medios de cultivo.....	24
Cultivo de fibroblastos embrionarios de ratón.....	25
Cultivo de células troncales pluripotentes inducidas humanas (CTPih).....	25

Pasaje manual.....	26
Formación de CE.....	26
Trasplante de CE en la SNpc.....	26
Inmunosupresión.....	27
Soluciones para perfusión.....	27
Extracción de cerebros.....	27
Tinción de Hematoxilina y Eosina.....	27
Inmunofluorescencia.....	28
Microscopía.....	29
RESULTADOS.....	30
DISCUSIÓN.....	45
CONCLUSION.....	49
REFERENCIAS.....	50

## ABREVIATURAS

6-hidroxidopamina.....	6-OHDA
ALFA-SINUCLÉINA.....	A-SIN
Célula troncal.....	CT
Célula troncal embrionaria.....	CTE
Célula troncal embrionaria humana.....	CTEh
Célula troncal embrionaria de ratón.....	CTEr
Célula troncal pluripotente inducida.....	CTPi
Célula troncal pluripotente inducida humana.....	CTPih
Cuerpo embrioide.....	CE
Días post-trasplante.....	dpt
Doblecortina.....	DCX
Dopaminérgico/a(s).....	DA
Dopaminérgico/a(s) mesencefálicas.....	DAm
Enfermedad de Parkinson.....	EP
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 <i>Forkbox</i> .....	FoxA2
Fibroblastos embrionarios de ratón.....	MEFs
Rosetas Neurales.....	RN
Sustancia Nigra <i>pars compacta</i> .....	SNpc
Tirosina Hidroxilasa.....	TH
Triplicación del gen SNCA.....	3XSNCA
Tubulina beta-III.....	Tuj1

LINEAS CELULARES:

Línea del paciente con 3XSNCA.....3XSNCA-Cnt

Línea del paciente con 3XSNCA y los FT Lmx1a, Foxa2 y Otx2 .....3XSNCA-LFO

Línea de la hermana del paciente con 3XSNCA.....1XSNCA-Cnt

Línea de la hermana del paciente con 3XSNCA y los FT Lmx1a, Foxa2 y Otx2.....1XSNCA-LFO

## RESUMEN

La enfermedad de Parkinson es una condición neurodegenerativa que conduce a la pérdida del control del movimiento y alteraciones cognitivas, a través de la muerte progresiva de las neuronas dopaminérgicas mesencefálicas de la Sustancia Nigra *pars compacta*. Actualmente, se postula que la agregación intracelular de la proteína alfa-sinucleína propicia la muerte de las neuronas dopaminérgicas mesencefálicas, siendo la triplicación del gen de  $\alpha$ -sin, *SNCA*, determinante en el incremento de los niveles de alfa-sinucleína en casos genéticos de la enfermedad de Parkinson. Por otra parte, hemos estudiado la diferenciación de células troncales embrionarias de ratón trasplantadas en la Sustancia Nigra *pars compacta* de ratas adultas. Determinamos que las células embrionarias troncales de ratón en etapa de cuerpo embriode, un conglomerado celular que mimetiza el desarrollo embrionario temprano, tiene el potencial de diferenciarse en neuronas, más no al fenotipo dopaminérgico mesencefálico. Más aún, también observamos que células troncales embrionarias humanas que sobre expresan 3 factores de transcripción importantes para la adquisición del compromiso dopaminérgico, dirigen la diferenciación dopaminérgica al trasplantarse en etapa de cuerpo embriode en la Sustancia Nigra *pars compacta*. En el trasplante de la línea con los factores de transcripción, *Lmx1a* (FT de homeocaja 1 alfa asociado a LIM), *FoxA2* (proteína A2 de *Forkbox*) y *Otx2* (homeocaja ortodentícula 2) (en conjunto nombrado LFO), se observan rosetas neurales desde 7 hasta 15 días post-trasplante. Las rosetas neurales expresaron los factores de transcripción *Lmx1a*, *Otx2* y doblecortina, marcador de neuroblastos y neuronas jóvenes. Además, a 30 días post-trasplante observamos la expresión de tirosina hidroxilasa, la enzima limitante en la síntesis de dopaminérgica. Ante la relevancia del potencial dopaminérgico observado con los factores de transcripción y debido a que la sobre expresión de la alfa-sinucleína disminuye la diferenciación dopaminérgica *in vitro*, en este trabajo nos propusimos evaluar el proceso de diferenciación *in vivo* de células troncales pluripotentes inducidas humanas que sobre expresan los factores de transcripción LFO provenientes de un paciente con 3XSNCA a 7, 15 y 30 días post-trasplante. Al ser trasplantadas en etapa de cuerpo embriode en la Sustancia Nigra *pars compacta* de ratas adultas, observamos que la línea 1XSNCA-Cnt (proveniente de la hermana del paciente, 3XSNCA-/LFO-), la línea 1XSNCA-LFO (3XSNCA-/LFO+) y la del paciente, 3XSNCA-Cnt (3XSNCA+/LFO-), no fueron capaces de sobrevivir en ratas intactas o lesionadas con 6-hidroxidopamina a 7 y 15 días post-trasplante. Por el contrario, solamente en los trasplantes de cuerpo embriode de la línea del paciente 3XSNCA-LFO (3XSNCA+/LFO+) se observó tejido vivo en 50% de los animales a 7 y 15 días post-trasplante tanto en ratas lesionadas como en intactas. Además, las células trasplantadas presentaron marcadores de diferenciación neural como nestina, y neuronal como doblecortina y tubulina beta-III desde 7 días post-trasplante, siendo más prominente su expresión a los 15 días post-trasplante. De forma inesperada, no se detectó la expresión de los factores de transcripción LFO en estas etapas, indicando la ausencia de especificación

dopaminérgica. De manera interesante, en ratas intactas a 30 días post-trasplante se continuó observando sobrevivencia, así como marcaje para doblecortina y tubulina, aunque no para tirosina hidroxilasa. Por el contrario, en ratas lesionadas no se observó sobrevivencia. Nuestros resultados sugieren que la sobreexpresión de Lmx1a, FoxA2 y Otx2 en etapa de cuerpo embrioide permitieron sobrevivir, más no diferenciar a un fenotipo dopaminérgico, a las células 3XSNCA-LFO, posiblemente debido a que la alfa-sinucleína reguló negativamente la expresión de estos factores.

## ABSTRACT

Parkinson's disease is a neurodegenerative condition which induces loss of control movement through progressive dopaminergic mesencephalic neuronal death in the Substantia Nigra *pars compacta*. Currently, it is proposed that intracellular aggregation of alpha-synuclein promotes death of mesencephalic dopaminergic neurons, being SNCA gene triplication crucial for the increment of alpha synuclein in genetic cases of Parkinson's disease. On the other hand, we have been studying mouse embryonic stem cells grafted in the Substantia Nigra *pars compacta* of adult rats. We found that mouse embryonic stem cells at embryoid body stage, a cell conglomerate that mimics early embryonic development, has the potential to differentiate into neurons, but not to the dopaminergic phenotype. Furthermore, we have also observed that human embryonic stem cells overexpressing 3 mesencephalic dopaminergic transcription factors important for the acquisition of dopaminergic commitment, can direct dopaminergic differentiation after grafting on embryoid body stage in the Substantia Nigra *pars compacta*. Indeed, in the transplant of the cell line carrying the transcription factors Lmx1a, FoxA2 and Otx2 -called together LFO- we observed neural rosettes from 7 to 15 days post-transplant. The neural rosettes expressed the transcription factors Lmx1a and Otx2, as well as doublecortin, a neuroblast and young neurons marker. Furthermore, at 30 days post-transplant we observed the expression of tyrosine hydroxylase, the rate limiting enzyme of dopaminergic synthesis. Given the relevance of the dopaminergic potential observed with the transcription factors, we decided to evaluate in this project the process of differentiation *in vivo* of human induced pluripotent stem cells overexpressing the LFO transcription and derived from a patient with the 3XSNCA at 7, 15 and 30 days post-transplant. Once transplanted in embryoid body stage in the Substantia Nigra *pars compacta* of adult rats, we observed that the line 1XSNCA-Cnt (obtained from the sibling of the patient, 3XSNCA-/LFO-), the line 1XSNCA-LFO (3XSNCA-/LFO+), and the line 3XSNCA-Cnt (3XSNCA+/LFO-) were not able to survive on intact nor lesioned with 6-hydroxidopamine rats at 7 or 15 days post-transplant. On the contrary, only grafts with the cell line derived from the patient 3XSNCA-LOF (3XSNCA+/LFO+) presented living tissue on 50% of intact and lesioned animals at 7 and 15 days post-transplant. Grafted cells presented neuronal differentiation

markers such as nestin, doublecortin and tubulin beta-III from 7 days post-transplant, being more prominent its expression at 15 days post-transplant. Unexpectedly, we did not detect the expression of LFO transcription factors on any stage of the transplant, indicating null dopaminergic specification. Interestingly, on intact rats at 30 days post-transplant we observed surviving and expression of doublecortin and tubulin, although tyrosine hydroxylase was not present. In contrast, on lesioned rats there was no grafts with surviving cells. Our results suggest that overexpression of Lmx1a, FoxA2 and Otx2 in embryoid body stage allowed to survive, but not differentiate into a dopaminergic phenotype, 3XSNCA-LFO cells, probably due to alpha-synuclein downregulating the expression of this factors.

# INTRODUCCIÓN

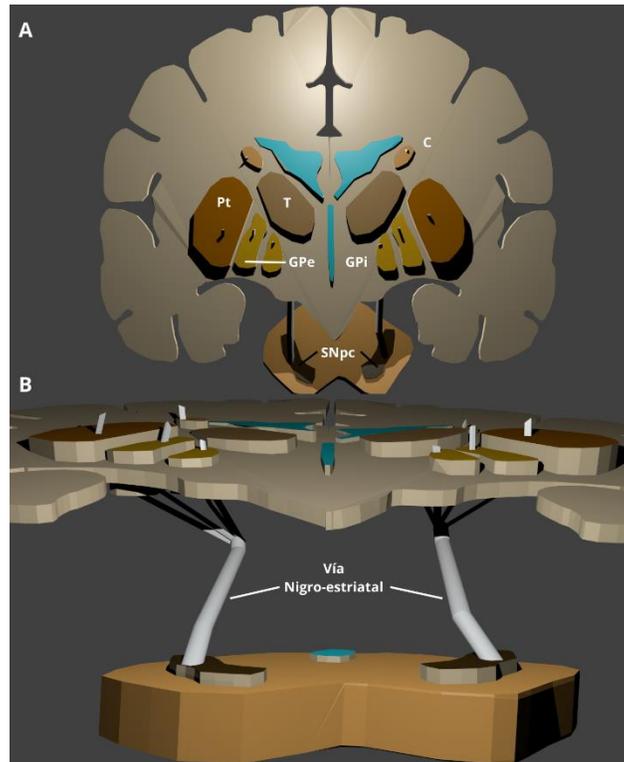
## 1. La Enfermedad de Parkinson

### 1.1 Epidemiología

La enfermedad de Parkinson (EP) es el segundo desorden neurodegenerativo con más incidencia en la población después del Alzheimer (Lebouvier et al., 2009). Mundialmente afecta alrededor de 4.5 millones de personas al año (Pringsheim et al., 2014). Se proyectó que para el año 2040 la población con EP excederá los 12 millones de personas (Dorsey, Sherer, Okun, & Bloem, 2018). En México no se cuenta con estudios multicéntricos de la prevalencia de la EP. No obstante, un estudio del año 2002 realizado en la Ciudad de Tepatlán, Jalisco, encontró una prevalencia de 0.27% (Alcalá y Castellanos, 2002), cercano a la estadística mundial. Aunado a esto, el estudio ReMePARK (Registro Mexicano de Enfermedad de Parkinson) reportó un retraso considerable entre el inicio de los síntomas motores y el diagnóstico clínico (Cervantes-Arriaga et al., 2013). Adicionalmente, se estima que el 90% de los casos de EP tienen una etiología idiopática, mientras que el resto presenta origen genético asociado a mutaciones (Klein & Westenberger, 2012).

### 1.2 Sintomatología

Los síntomas motores característicos de la EP son temblor en reposo, rigidez, bradicinesia, e inestabilidad postural (Jankovic, 2008; Pfeiffer et al., 2015). Estas manifestaciones se deben en parte a la muerte progresiva de las neuronas dopaminérgicas (DA) mesencefálicas (DAm) de la sustancia nigra *pars compacta* (SNpc; A9) que forman parte de la vía nigro-estriatal del movimiento (Figura 1) (Hornykiewicz, 2006; Kalia y Lang, 2015; Smith y Kiehl, 2000). Puesto que desde la SNpc se secreta la dopamina necesaria para activar los receptores D1 y D2 en el putamen, la pérdida de las neuronas DA disminuye la cantidad de dopamina necesaria para regular la conducta motora (Dauer y Przedborski, 2003). Esta degeneración neuronal se extiende a medida que la EP continúa su historia natural, afectando el *locus ceruleus*, el núcleo pedúnculo-pontino, el núcleo basal de Meyert, los núcleos del rafe, el núcleo motor dorsal del vago, la amígdala y el hipotálamo (Dickson, 2012).



**Figura 1. Vía nigro-estriatal.** (A) Corte coronal de los ganglios basales y el mesencéfalo de cerebro humano. (B) Visión desde un ángulo ventral de la vía nigro-estriatal procedente de la SNpc en el mesencéfalo tiene eferencias hacia los ganglios basales: GPe, GPi, Pt. GPe, Globo pálido externo; GPi, Globo pálido interno; Pt, Putamen; SNpc, sustancia nigra *pars compacta* (Ramos-Acevedo, Bernal-Conde, & Guerra-Crespo, en revisión).

### 1.3 Factores de riesgo

La causa de la muerte de las neuronas DAm ha estado en constante debate debido a sus posibles orígenes (Engelender y Isacson, 2017; Michel et al., 2016). Entre los principales factores de riesgo para la EP se encuentra la edad y el sexo, pues tiene una prevalencia entre los adultos mayores de 40 años de 0.3%, llegando a alcanzar más del 2% en personas mayores a 80 años. Además, se presenta dos veces más en hombres que en mujeres (Reeve et al., 2014). También predisponen para el desarrollo de la EP la existencia de antecedentes familiares de EP (Noyce et al., 2012), antecedentes de melanoma (Olsen et al., 2006) e hipercolesterolemia (Hu et al., 2008) y de traumatismo craneoencefálico

(Gardner et al., 2018), así como la exposición a agentes tóxicos. La rotenona, el paraquat y la desmetilprodina o MPPP (1-metil-4-fenil-4-propionoxipiperidina), un pesticida que al ser metabolizado por el organismo produce MPTP (1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina), son considerados los agentes químicos más riesgosos para el desarrollo de la EP (Lee y Gilbert, 2016).

La EP de origen genético se ha asociado a diversos genes y a sus mutaciones (A. Lee & Gilbert, 2016). Las variaciones de mayor riesgo son mutaciones en los genes *Park*, *Pink* y *Lrrk2* (Klein y Westenberger, 2012). Otras mutaciones importantes son las que se producen en el gen *SNCA*, del cual se traduce la proteína ALFA-SINUCLÉINA (A-SIN): A53T, A30P y E46K (Xu et al., 2015). Asimismo, el efecto de dosis génica ocasionado por la duplicación y triplicación del locus genómico del gen *SNCA* (duplicación o triplicación en un solo alelo, dando lugar a 3 o 4 copias del gen, respectivamente) promueve el incremento de la A-SIN a nivel fisiológico y predispone al desarrollo temprano de síntomas característicos de la EP. Dicha (Byers et al., 2011; Dauer y Przedborski, 2003; Poewe et al., 2017; Zafar et al., 2018). Creciente evidencia apunta a que la agregación de la A-SIN, lo cual genera oligómeros y fibrillas insolubles, en diversos organelos promueve la muerte de neuronas DAM (Luth et al., 2014; Vasquez et al., 2017; Xilouri et al., 2016; Zafar et al., 2018).

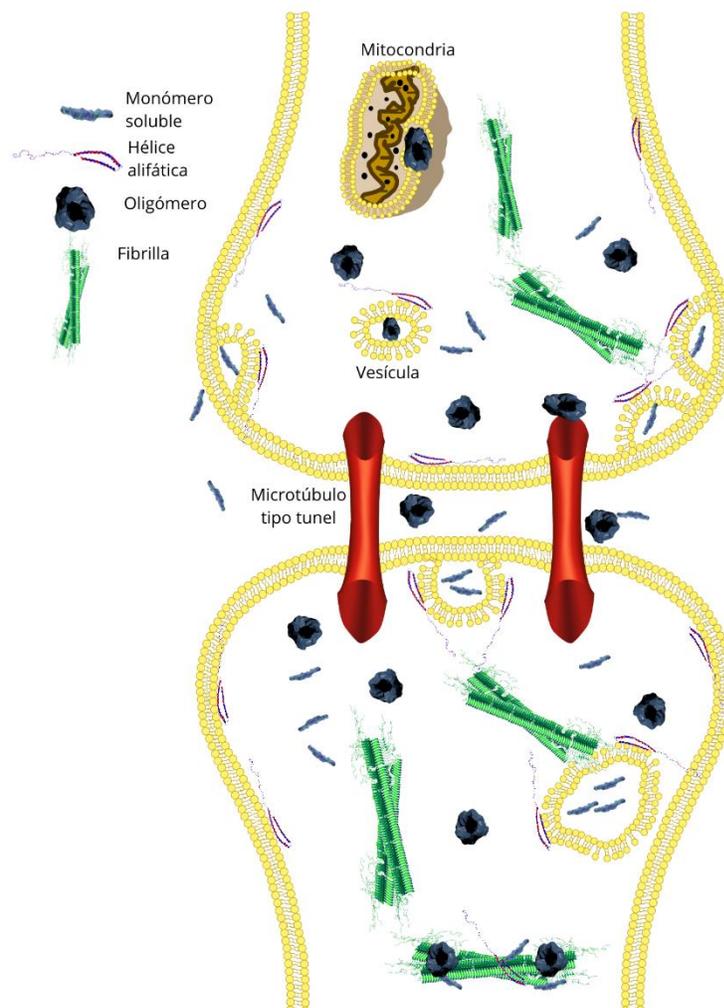
#### **1.4 Alfa-sinucleína y su relación con la EP**

La A-SIN es una proteína de aproximadamente 14-kDa y 140 residuos de aminoácidos (Iwai et al., 1995). El hallazgo histopatológico característico en la EP idiopática y familiar es la agregación de la A-SIN en inclusiones intracitoplasmáticas denominadas cuerpos de Lewy (CL; Nalls et al., 2014; Simón-Sánchez et al., 2009; Spillantini et al., 1997). Los agregados de A-SIN también se pueden encontrar en el mesencéfalo, el núcleo vago y, conforme avanza la enfermedad, en la corteza, siendo la SNpc la más afectada (Burré et al., 2014; Burré et al., 2013).

El plegamiento aberrante de la A-SIN es considerado el responsable de la agregación y toxicidad observada en las neuronas (Scheckel y Aguzzi, 2018), pues la formación de la A-SIN en oligómeros insolubles o conformaciones fibrilares comprometen la viabilidad celular (Devi et al., 2008; Mullin y Schapira, 2013; Oliveira et al., 2015). Más aún, el 90% de la A-SIN encontrada en tejido cerebral postmortem de pacientes con EP, se encuentra fosforilada en la serina 129 (PS129), lo cual parece promover la conformación patogénica (Spinelli et al., 2014; Walker et al., 2013).

En efecto, la presencia de oligómeros de A-SIN afecta la morfología de las neuritas, el transporte vesicular y la degeneración axonal (Koch et al., 2015). Además, activa la macroautofagia (Xilouri et al., 2016); también se unen a membranas del retículo endoplasmático asociadas a la mitocondria (Guardia-Laguarta et al., 2014) y a la membrana interna de la mitocondria (Figura 2; Robotta et al., 2014). Además, los oligómeros de A-SIN promueven la disfunción del complejo I mitocondrial (Luth et al., 2014; Reeve et al., 2015), aumentando las especies reactivas de oxígeno (Bernal et al., *Alpha-synuclein physiology and pathology: A cellular organelles overview*, sometido; Mullin y Schapira, 2013; Xu et al., 2015) promoviendo apoptosis o necrosis celular.

El mecanismo de movilización de la A-SIN en el encéfalo aún no está bien esclarecido. La evidencia actual indica que se produce liberación de A-SIN mediante exocitosis por medio de vesículas sinápticas y posteriormente es endocitada por células en la periferia (Figura 2) (Dunning et al., 2012; Lee et al., 2005; Lee et al., 2008). Además, puede ser transportada a través del espacio sináptico mediante su liberación desde la membrana presináptica y hasta la postsináptica a través de nanotubos tipo túnel que pueden llegar a medir 100 micrómetros de longitud (Figura 2) (Abounit et al., 2016).



**Figura 2. Mecanismos de agregación y movilización de la A-SIN.** Los monómeros de A-SIN se encuentran en el citoplasma. La hélice anfipática le permite a la A-SIN asociarse a membranas mitocondriales, así como vesículas para ser exocitada y endocitada. La A-SIN también se moviliza mediante nanotubos tipo túnel. Los agregados fibrilares pueden asociarse entre sí y otras proteínas para formar los CL. Imagen tomada de Ramos-Acevedo, Bernal-Conde y Guerra-Crespo, en revisión.

### **1.5 Terapia celular en la EP**

A pesar de no conocer la o las causas principales de la EP, se han desarrollado diferentes tratamientos enfocados en revertir los síntomas motores de la enfermedad (Boronat-García et al., 2017). Actualmente, el fármaco más usado y eficiente para disminuir los síntomas motores es la levodopa. Sin embargo, éste no detiene el avance de la EP y su uso prolongado conlleva a desarrollar afectaciones secundarias severas como discinesias (Ellis y Fell, 2017).

Por ello, desde hace 5 décadas se ha explorado la opción de terapia celular, cuyo fin es proveer al núcleo estriado de células que liberen dopamina, restaurando así los niveles basales de este neurotransmisor. Con este método se han obtenido mejoras conductuales significativas en pacientes y en animales que modelan de la EP. Sin embargo, la variación de los resultados obtenidos no justifica la aplicabilidad de este método en pacientes con EP (Boronat-García et al., 2017).

Por lo anterior, es necesario explorar alternativas a los procedimientos hasta ahora realizados. Esto debido a que aún no se ha logrado esclarecer totalmente la permisividad del encéfalo para integrar células liberadoras de dopamina. Más aún, describir una fuente segura y estable que se autoregule la liberación de la dopamina requerida es un objetivo deseable para el desarrollo de un tratamiento celular. Además, hasta ahora las células usadas en pacientes provienen de tejido fetal, lo cual resulta en incompatibilidad inmunológica así como argumentos de índole ético. Por lo tanto, las células troncales (CT) pluripotentes representan una fuente potencial de tratamientos en la EP.

## **2. Células troncales**

Las CT están definidas por su capacidad de auto renovación y diferenciación hacia múltiples fenotipos celulares. En conjunto con la señalización proveniente del microambiente (región con moléculas señalizadoras como factores tróficos) pueden mantener una población troncal y dar origen a células especializadas, lo que se conoce como división asimétrica (Suda et al., 1984). Las células totipotentes pueden dar origen a un organismo entero, incluyendo tejido extraembrionario; por su parte, las CT pluripotentes son capaces de diferenciarse en cualquiera de las 3 capas germinales: endodermo, mesodermo y ectodermo. Mientras que las multipotentes solo pueden diferenciarse en células de un linaje específico de alguna de las capas germinales (Morrison, Shah, & Anderson, 1997)

Las CT se pueden obtener a partir de la masa celular interna (MCI) del blastocisto y se obtuvieron inicialmente en ratón (Martin, 1981). La MCI da lugar al epiblasto y posteriormente al embrión. Una vez aisladas y cultivadas, estas células expresan marcadores de pluripotencia, por lo cual fueron denominadas células troncales embrionarias (CTE) de ratón (CTEr) (Martin, 1981). Tiempo después se obtuvieron las primeras CTE humanas (CTEh) que mostraban las mismas características fenotípicas (Thomson et al., 1998). Se generaron varias líneas de CTEh (Thomson et al., 1998). Sin embargo, su uso para terapia celular en el ámbito clínico no ha sido exhaustivamente explorado.

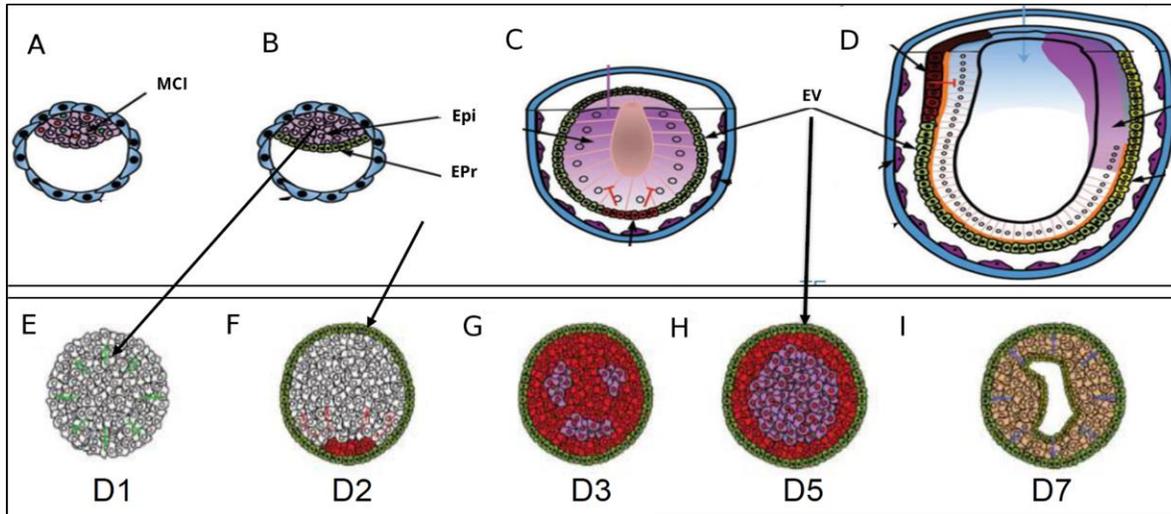
### **2.1 Células troncales pluripotentes inducidas**

En el año 2006 Kazutoshi Takahashi y Shinya Yamanaka transfectaron hasta 24 factores de transcripción (FT) asociados al potencial pluripotente en fibroblastos de ratón para determinar cuáles eran los necesarios para inducir células somáticas al estado pluripotente (Takahashi y Yamanaka, 2006). Ellos lograron determinar que eran 4 los FT mínimos necesarios para lograr este efecto: Oct3/4, Sox2, Klf4 y c-Myc. Los fibroblastos reprogramados mostraron todas las características de células pluripotentes. Takahashi y Yamanaka nombraron a estas células reprogramadas células troncales pluripotentes inducidas (CTPi). Un año después, el mismo grupo publicó un estudio donde transfectaban los FT de pluripotencia en fibroblastos humanos bajo las mismas condiciones, generando así las denominados ahora células troncales pluripotentes inducidas humanas (CTPiH) (Takahashi et al., 2007). Con esta metodología se ha logrado obtener células pluripotentes sin necesidad de recurrir a al uso de embriones, evitando así un conflicto ético en investigación referente al desarrollo humano.

## 2.2 El cuerpo embriode

A partir de CTE y CTPi se pueden obtener cuerpos embrioides (CE). Estos son conglomerados esféricos que mimetizan las primeras etapas de desarrollo de los embriones, debido a lo cual obtienen ese nombre (Itskovitz-Eldor et al., 2000; Rathjen & Rathjen, 2001). El CE tiene la capacidad de retomar las primeras etapas embrionarias pues las células que están al interior del CE mantienen los marcadores del epiblasto, mientras que en la parte más externa se forma una capa celular que presenta marcadores del endodermo primitivo. Además, entre 5 y 7 días de cultivo el CE empieza un proceso de cavitación, similar a lo que ocurre en la formación del epitelio columnar (Figura 3) (Brickman y Serup, 2017).

Por esto, el CE es un modelo *in vitro* que puede ser usado para estudiar una etapa crítica en el inicio de la diferenciación celular y tisular; tanto en el estudio de modelos de desarrollo como patológicos. Más aún, mediante este valioso modelo se han logrado discernir cascadas de señalización en el proceso de diferenciación y maduración de neuronas DAm que, a su vez, han permitido generar neuronas DAm *in vitro* (Brickman y Serup, 2017; Liyang et al., 2014; Sathananthan, 2011). Por lo tanto, representa una estrategia potencial para entender la evolución y consecuente pérdida de las neuronas DA en la EP.



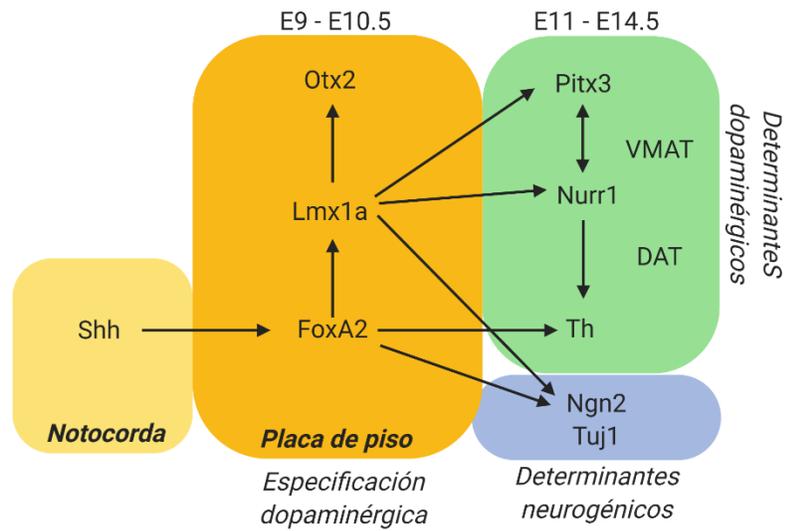
**Figura 3. La evolución del CE asemeja al desarrollo temprano embrionario humano. (A-D)** Desarrollo del blastocisto *in vivo*. (A) Blastocisto preimplantado donde se indica la MCI. (B) Blastocisto con el epiblasto (morado) y el endodermo primitivo (verde) señalados. (C-D) Etapas tempranas de desarrollo del saco primitivo donde se señala el endodermo visceral. (E-I) Desarrollo *in vitro* del CE. (E) Inicio de formación del CE. (F) CE ya formado con una capa externa de 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, se muestran células con expresión similar al epitelio columnar en el centro. MCI: masa celular interna; Epi: epiblasto; EPr: endodermo primitivo; EV: endodermo visceral. Modificada de Brickman y Serup, 2017 (Ramos-Acevedo, 2018).

### 3. Células troncales en la enfermedad de Parkinson

En la búsqueda de un tratamiento para la EP a través de terapia celular habitualmente se obtienen neuronas DA o células productoras de dopamina y posteriormente son trasplantadas en el núcleo estriado de modelos animales de la EP (Boronat-García et al., 2017). Para este propósito se han desarrollado algunos métodos de diferenciación DA entre los que destacan aquellos que usan morfógenos y citocinas involucrados en el desarrollo embrionario de las neuronas DA mesencefálicas al adicionarlos ya sea como suplemento al cultivo celular (Kirkeby et al., 2012), o por tecnología de recombinación homóloga para sobreexpresar FT (Andersson et al., 2006). LIM Homeobox Transcription Factor alpha (*Lmx1a*), Forkhead box protein A2 (*FoxA2*) y Orthodenticle homeobox 2 (*Otx2*) son algunos de los FT utilizados para este propósito pues se encuentran regulando de manera central a otros factores en la vía de diferenciación de las neuronas DAM (Andersson et al., 2006; Ferri et al., 2007; Omodei et al., 2008).

#### 3.1 Diferenciación DAM en el desarrollo embrionario.

Las cascadas de señalización que inducen la diferenciación DAM comienzan el día de desarrollo embrionario 7.5 (E7.5) (Wurst y Bally-Cuif, 2001). Ubicada ventralmente al tubo neural se encuentra la notocorda. Esta induce el establecimiento de la placa de piso a lo largo del tubo neural través de la expresión de sonic hedgehog, que promueve la expresión de *FoxA2* también en la notocorda y a su vez este a sonic hedgehog en la placa de piso. Una vez establecida la placa de piso, *Foxa2* inicia su expresión entre E9-10.5 e induce la transcripción de *Lmx1a*, que a su vez induce a *Otx2*, ambos presentes al E10, lo cual inicia el proceso de especificación DA en el mesencéfalo (Figura 4; Matisse et al., 1998). *Otx2* es necesario para la expresión de *Lmx1a* alrededor de E10 (Omodei et al., 2008), en las células de la placa de piso, mientras que este gen es esencial para la diferenciación de neuronas DAM (Andersson et al., 2006). A la par, *Lmx1a* induce la expresión de neurogenina 2 y *FoxA2* a tubulina beta-III (*Tuj1*), ambos determinantes neurogénicos (Figura 4; Ferri et al., 2007; Guerrero-Flores y Covarrubias, 2011; Kim et al., 2003; Saucedo-Cardenas et al., 1998). Más aún, *Lmx1a* activa la expresión del gen *Ptx3* (Paired-Like Homeodomain Transcription Factor 3) y *FoxA2* la de *Nurr1* (Nuclear Receptor Subfamily 4 Group A Member 2) y *Tirosina Hidroxilasa* (TH), la enzima limitante en la síntesis de dopamina. Juntos, *Ptx3* y *Nurr1* son necesarios para mantener la transcripción de genes que se encuentran involucrados en definir las características fenotípicas DAM como la presencia de TH, el transportador vesicular de monoaminas y el transportador de dopamina en neuronas maduras (Figura 4).



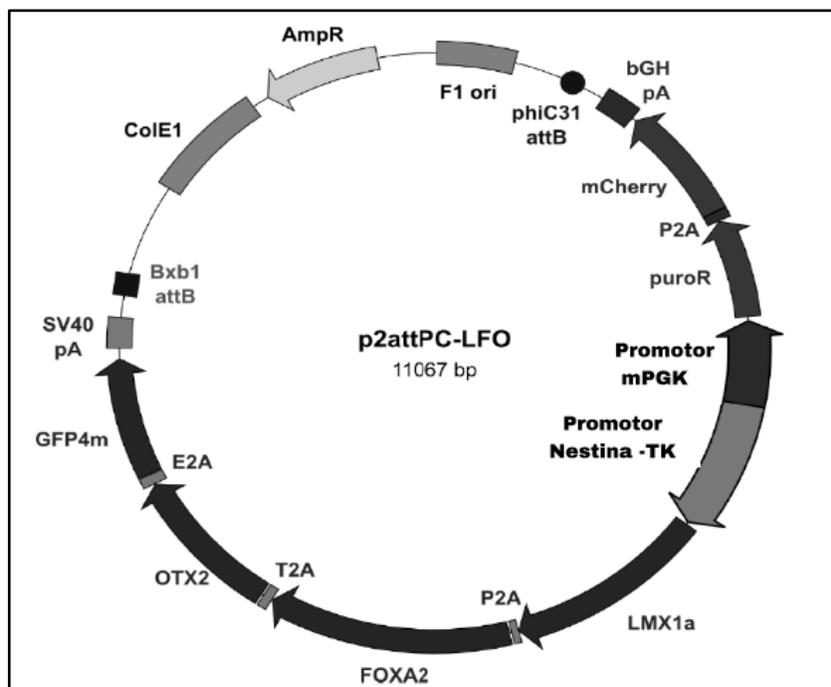
**Figura 4. Cascadas de factores de señalización de neuronas DA mesencefálicas.** Expresión de los morfógenos asociados al desarrollo DA. Regulación de expresión génica a la especificación DA. Lmx1a, FoxA2 y Otx2 se encuentran en posiciones ventrales clave para dirigir la diferenciación DAm. Día embrionario, E.

## Antecedentes

### 3.2 Diferenciación dopaminérgica inducida en cultivo

Para lograr diferenciar CTEr *in vitro* con mayor eficiencia, Andersson y su grupo transfectaron un vector de sobreexpresión de *Lmx1a* dirigido por el potenciador de nestina (activo solo en progenitores neurales) en CTEr, con lo cual obtuvieron una proporción elevada de neuronas DAM *in vitro* (Andersson et al., 2006). Posteriormente, trasplantaron líneas celulares similares ya diferenciadas a neuronas DAM en ratones lesionados en el estriado. Observaron que solo el 50% de los trasplantes logró sobrevivir y encontraron células que presentaban marcadores DAM (Andersson et al., 2006). Por otra parte, se generaron también líneas de CTEh a las cuales les insertaron el vector de sobreexpresión de *Lmx1a*. Estas células mostraron un incremento de 65-70% de diferenciación comparada con CTEr (Friling et al., 2009). Posteriormente, usando líneas celulares pluripotentes que sobreexpresaban *Lmx1a* bajo el potenciador de Nestina, se realizaron trasplantes de células diferenciadas a neuronas DAM en el estriado de ratas adultas, en los que se observó que el trasplante celular sobrevivía hasta 5 meses (Sánchez-Danés et al., 2012).

En el 2013, el equipo de la doctora Birgitt Schüle generó líneas de CTE que sobreexpresan los FT *Lmx1a*, *FoxA2* y *Otx2*. Para ello, empleó el método de inserción de plásmidos al genoma humano por medio de la técnica denominada DICE (Dual Integrase Cassette Exchange) (Zhu et al., 2014). Ellos usaron dos integrasas, que permiten, de forma específica, el posicionamiento de un plásmido en una región del genoma favorable para la transcripción. De esta manera, se logró insertar un policistrón cuya expresión está asociada al promotor timidina cinasa (TK) y al potenciador de nestina (Figura 5) (Zhu et al., 2014). Este policistrón fue asociado al gen de la proteína verde fluorescente modificada (eGFP), ubicándose al final del transcrito como gen reportero y fue denominada H9-LFO. Adicionalmente, realizaron la transfección de este vector en CTPIh derivadas de un paciente con la triplicación del gen SNCA (3XSNCA). Además, este vector también fue incorporado en la hermana del paciente con la 3XSNCA, en cuyo genoma no se encontraba la triplicación (Zhu et al., 2014).



**Figura 5. Vector p2attPC-LFO.** Vector insertado en la línea H9-LFO para comprometer a las células hacia diferenciación DAm. El promotor nestina-TK dirige la expresión de los FT Lmx1a, FoxA2 y Otx2, así como la GFP para su detección. Modificado de Zhu et al., 2014.

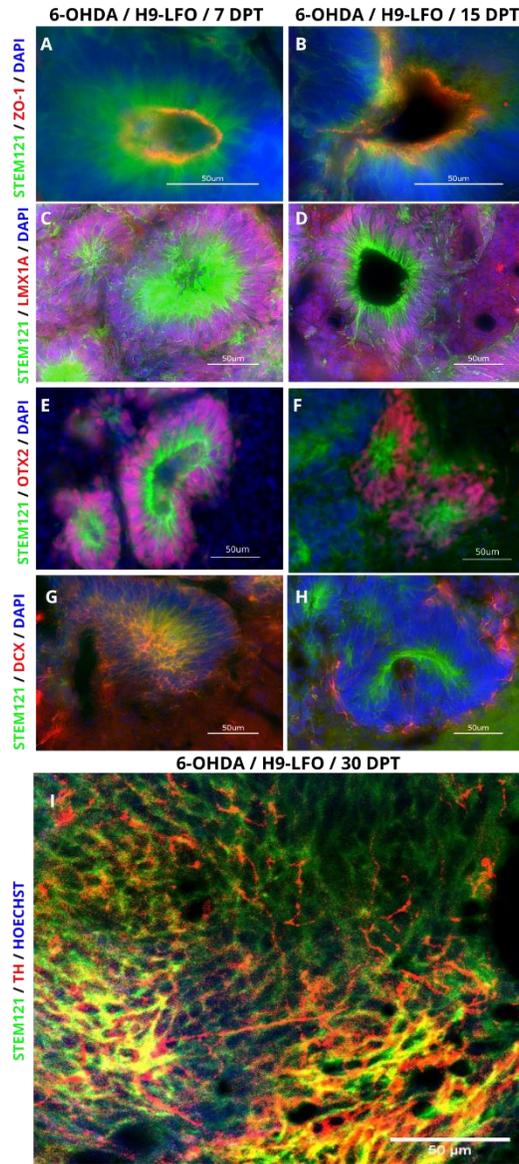
### 3.3 Diferenciación neuronal en la SNpc

Para analizar la capacidad del microambiente mesencefálico de inducir la diferenciación DAm, el laboratorio del Dr. Covarrubias desarrolló un sistema de implante a explante, donde colocó células CTEr, CE derivados de CTEr o células precursoras neurales sobre una sección del mesencéfalo ventral embrionario de ratón (Baizabal & Covarrubias, 2009). Encontraron que los CE eran capaces de diferenciarse en células DAm con mayor eficiencia que las otras células, indicando que el mesencéfalo ventral embrionario inducía en el CE el fenotipo DA, y que este, a su vez, tiene la capacidad de pensar y responder a dicho microambiente.

Por lo cual, con el fin de determinar la capacidad que tiene el CE para ser especificado a un linaje DAm en el nicho dopaminérgico adulto, la SNpc, nuestro grupo de trabajo realizó trasplantes de CE derivados de CTEr en la SNpc de ratas adultas. Observaron a 6 días post-trasplante (dpt), que un 32% de las células implantadas expresan doblecortina (DCX), una proteína expresada en neuroblastos y neuronas jóvenes. A los 15 dpt, este porcentaje incrementó a 64%; disminuyendo a 10% 15 días después.

Además, evaluaron el marcador NeuN, una proteína nuclear que se encuentra en neuronas maduras. Esta presentó 43% de marcaje positivo a 30 dpt. No se detectó GFAP ni TH a 6 ó 15 dpt (Maya-Espinosa et al., 2015). Estos resultados indicaron que los CE derivados de CTEr lograron iniciar un proceso de diferenciación neural más no DAm.

Por lo tanto, posteriormente evaluamos el potencial del CE para diferenciar a neuronas DAm, pero ahora sobreexpresando los 3 FT LFO, que sabemos dirigen en cultivo y durante el desarrollo embrionario hacia ese linaje neuronal. Para ello, recientemente trasplantamos en la SNpc de ratas adultas CE derivados de CTEh con el vector de sobreexpresión LFO (H9-LFO) (Ramos-Acevedo, 2018), donadas por nuestra colaboradora Birgit Schüle, y dueña de las líneas publicadas en Zhu et al., 2014. Encontramos que estas desarrollaron rosetas neurales (RN) en el área trasplantada a 7 y 15 dpt (Figura 6), retomando así, las primeras etapas de diferenciación neuronal (Koch et al., 2009; Malchenko et al., 2014). Observamos que las RN expresaban el marcador Zonula occludens-1 (ZO-1) (Figura 6A, B), expresado durante el desarrollo del tubo neural, confirmando que eran en efecto RN (Satomi et al., 2011). Además, presentaban los FT DAm Lmx1a (Figura 6C, D) y Otx2 (Figura 6E, F), así como DCX (Figura 6G, H). Más aún, a 30 dpt observamos la expresión de TH (Figura 6I). Indicando que los CE habían iniciado y continuado un proceso de diferenciación DAm. Con estos resultados comprobamos que la SNpc de ratas adultas es un nicho permisivo para la diferenciación DA de CE derivados de CTEh comprometidas al linaje DAm por los FT LFO.



**Figura 6. Los CE derivados de CTEh con el vector LFO generan rosetas neurales en la SNpc lesionada.** La inmunofluorescencia muestra RN encontradas en la SNpc a los 7 (A, C, E, G) y 15 (B, D, F, H) días post-trasplante de células de CE provenientes de la línea de CTE H9-LFO. En verde se presenta STEM121, el marcador citoplasmático de células humanas. En rojo se muestran el marcador de RN (A, B) ZO-1, los FT Lmx1a (C, D) Otx2 (E, F) y DCX (G, H). (I) Inmunofluorescencia del tejido a 30 dpt donde se observa que las células STEM121+ colocalizan con TH. Doblecortina, DCX; Tirosina Hidroxilasa, TH. Barra de escala 50 μm.

## JUSTIFICACIÓN

Debido a la condición neurodegenerativa de la EP, se continúan buscando terapias que logren restablecer los niveles de dopamina necesarios en los ganglios basales para disminuir los síntomas motores de la condición. Para esto, los trasplantes de CT han sido relevantes debido a que constituyen una fuente de células DA teóricamente ilimitada (Boronat-García et al., 2017). Por lo tanto, investigar la capacidad que tiene el encéfalo de permitir la sobrevivencia de células trasplantadas, así como incrementar la capacidad funcional de estas permitirá evaluar la viabilidad de estrategias que buscan explorar nuevas fuentes celulares.

Con este fin, es deseable determinar la viabilidad y el potencial de diferenciación DA de células sensibles al microambiente y comprometidas a un linaje DA por los factores LFO, que además provienen de un paciente con la triplicación del gen *SNCA* (Zhu et al., 2014). A su vez, evaluar ese potencial directamente en la SNpc, su sitio de origen ontogénico, para determinar la capacidad que tiene de sostener y permitir la diferenciación DAm de CTPih.

Por otra parte, la sobreexpresión de A-SIN afecta negativamente la diferenciación terminal de neuroblastos DA provenientes de CTPih, reduciendo el crecimiento de neuritas, induciendo deficiencia electrofisiológica y disminuyendo el porcentaje de neuronas con TH (Oliveira et al., 2015), lo cual indica que esta proteína puede comprometer o inhibir parcialmente la diferenciación y maduración DAm. Por lo tanto, investigar la influencia que tiene la sobre expresión de A-SIN en la diferenciación inducida *in vivo* en etapas tempranas podría ayudar a discernir el efecto que tiene sobre la diferenciación y/o maduración DAm. A la par, determinar si la sobre expresión de los FT LFO en los CE puede evitar el efecto previamente mencionado de la A-SIN al promover la diferenciación DAm ayudaría a explorar el potencial DAm que los factores LFO tienen sobre el CE en un modelo de la EP.

## **PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN**

¿Los trasplantes en etapa de CE de CTPih provenientes de un paciente con triplicación del gen *SNCA* con el potencial de sobreexpresar factores transcripcionales inductores de la diferenciación DA sobrevivirán y diferenciarán a neuronas DAm en la SNpc de ratas adultas en un modelo de la EP?

## **HIPÓTESIS**

Ho: La sobreexpresión simultánea de los factores transcripcionales *Lmx1a*, *Otx2* y *FoxA2* no logrará propiciar la diferenciación de la línea 3XSNCA-LFO trasplantada en etapa de CE a un fenotipo DA mesencefálico en la SNpc.

Ha: La sobreexpresión simultánea de los factores transcripcionales *Lmx1a*, *Otx2* y *FoxA2* propiciará la diferenciación de la línea 3XSNCA-LFO trasplantada en etapa de CE a un fenotipo DA mesencefálico en la SNpc.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo general**

Determinar si la línea 3XSNCA-LFO trasplantada en etapa de CE en la SNpc es capaz de sobrevivir y diferenciarse en neuronas DA mesencefálicas.

### **Objetivos específicos**

1. Determinar si la línea 3XSNCA-LFO trasplantada en etapa de cuerpo embriode en la Sustancia Nigra *pars compacta* de ratas intactas o lesionadas inicia un proceso de especificación dopaminérgica a corto y largo plazo, dado por los factores *Lmx1a*, *FoxA2* y *Otx2*.
2. Demostrar si la línea 3XSNCA-LFO trasplantada en etapa de cuerpo embriode en la Sustancia Nigra *pars compacta* de ratas intactas o lesionadas es capaz de diferenciarse al fenotipo dopaminérgico mesencefálico, dado por la enzima Tirosina Hidroxilasa.

## ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

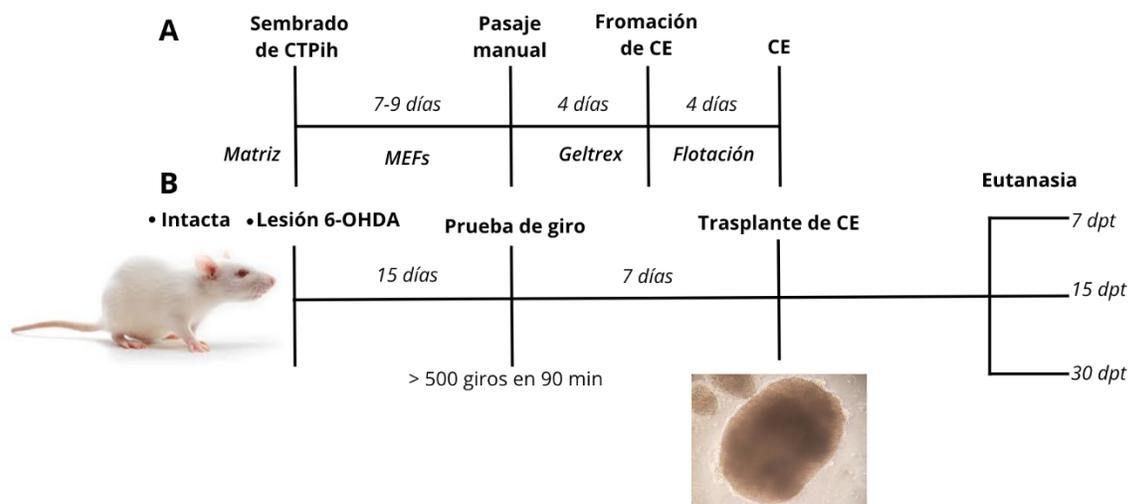
### Animales

Para el presente proyecto se usaron un total de 100 ratas macho de la cepa Wistar. Los animales fueron asignados de manera aleatoria a uno de 2 grupos: lesión unilateral o intacta, representados en la Tabla 1. No se utilizaron ratas inyectadas con solución salina o *Sham* debido a que no encontramos diferencias entre las RN de los trasplantes hechos con CTEh en esta condición con respecto a las condiciones lesión o intacta. En breve, los grupos se organizaron de la siguiente forma: **1)** A la rata lesión se le inyectó 6-hidroxidopamina (6-OHDA), una neurotoxina que afecta a las células dopaminérgicas. **2)** A la rata intacta no se le realizó procedimiento alguno previo al trasplante. Se trasplantaron las líneas 1XSNCA-Cnt (3XSNCA-/LFO-), 1XSNCA-LFO (3XSNCA-/LFO+), 3XSNCA-Cnt (3XSNCA+/LFO-) y 3XSNCA-LFO (3XSNCA+/LFO+) en ambas condiciones. Por último, se realizó la eutanasia a los 7, 15 o hasta 30 dpt para la obtención del encéfalo (Tabla 1).

Líneas	1XSNCA		3XSNCA		DPT
	1XSNCA-Cnt	1XSNCA-LFO	3XSNCA-Cnt	3XSNCA-LFO	
Lesionada	5/0	10/0	4/0	6/3	7
	4/0	10/0	4/0	6/3	15
	-	-	-	9/0	30
Intacta	4/0	4/0	5/0	5/2	7
	4/0	4/0	5/0	5/3	15
	-	-	-	6/1	30
Muestras analizadas / Muestras con tejido vivo					

**Tabla 1.** Grupos y número de ratas trasplantadas. Muestras con tejido vivo corresponden a aquellas células en la zona del trasplante con señal positiva del anticuerpo STEM121.

Los experimentos se llevaron a cabo como se muestra en la Figura 7. A las ratas se les inyectó con 6-OHDA o no se efectuó procedimiento alguno. Usamos este insulto como modelo estandarizado de la EP (Brooks & Dunnett, 2013). Se efectuó la prueba de giro 15 días después para seleccionar a las ratas correctamente lesionadas. Una semana más tarde se hicieron los trasplantes de las líneas CTPih en etapa de CE en la SNpc para finalmente obtener el cerebro a los 7, 15 ó 30 días siguientes (Figura 7).



**Figura 7. Diseño experimental de los trasplantes de CE.** (A) Las CTPIh fueron sembradas sobre fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs) durante 7 a 9 días, posteriormente fueron pasados manualmente a posos con una matriz de Geltrex durante 4 días. Al cuarto día se realizó la formación de CE donde se mantuvieron en flotación por 4 días hasta el trasplante. (B) Los animales fueron divididos en dos grupos, intacto y lesionado. Después de la lesión con 6-OHDA, se les realizó la prueba de giro a todas las ratas lesionadas para excluir aquellas que no cumplieron con el criterio de selección de >500 giros. El trasplante de CE se realizó 7 días después en ratas intactas o lesionadas y el cerebro fue procesado 7, 15 o 30 dpt.

### Lesión con 6-OHDA

En concordancia con lo reportado por (Boronat-García et al., 2016), 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 y 13 mg/kg, respectivamente). Los animales anestesiados fueron infundidos con 40  $\mu\text{g}$  de 6-OHDA mezclada con 32  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  de L-ascorbato, para impedir la oxidación de la 6-OHDA, en un volumen total de 0.5  $\mu\text{l}$  de solución salina, a una velocidad de 0.125  $\mu\text{l}/\text{min}$ ,

Después de 15 días a todas las ratas se les realizó la prueba de giro (Bové & Perier, 2012) para determinar si la SNpc había sido lesionada correctamente. Para esto, como ha sido descrito anteriormente (Garcia-Montes et al., 2013), se inyectó anfetamina (4 mg / kg)

intra peritonealmente y se cuantificó el número de giros realizados por medio del software Matlab®. Aquellas ratas con más de 500 giros en un lapso de 90 minutos fueron incluidas en el grupo Lesión, las que no superaron el número de giros requeridos fueron descartadas. La prueba de rotación también se efectuó en ratas intactas.

### **Medios de cultivo**

#### 1. Medio para células alimentadoras.

Para la elaboración de 500 ml de medio para las células alimentadoras se utilizaron 432.5 ml de DMEM High glucose (Thermo Fisher, SH30081.02) enriquecido con 50 ml de suero fetal bovino inactivado (10%) (Thermo Fisher, 30910.03), 5 ml de glutamax 100X (1X) (Thermo Fisher, 35050-061), 5 ml de aminoácidos no esenciales 100X (1X) (ThermoFisher, 11140 050), 2.5 ml de penicilina-estreptomina 100x (1X) (Thermo Fisher, 15140-122) y 2.5 ml de piruvato de sodio 100X (1X).

#### 2. Medio para CTPih

Para la elaboración de 500 ml de medio para las células alimentadoras se utilizaron 389.5 ml de DMEM/F12 (Thermo Fisher, 11320-082), enriquecido con 100 ml de suero de reemplazo 100X (20X) (Thermo Fisher, 10828-028), 5 ml de glutamax 100X (0.5X) (Thermo Fisher, 35050-061), 5 ml de aminoácidos no esenciales 100X (1X) (ThermoFisher 11140 050), 2.5 ml de penicilina-estreptomina 100x (0.5X) (Thermo Fisher, 15140-122), 0.5 ml de beta mercaptoetanol 100X (1X) (Thermo Fisher, 21985-025) y 30 µl de FGF2 (6 ng/ml) (Peprotech, 100-18B).

#### 3. Medio StemFlex

Para 500 ml de medio StemFlex (Thermo Fisher, A3349401) se mezclaron 447.5 ml de medio básico StemFlex, 2.5 ml de penicilina-estreptomina 100x (0.5x) (Thermo Fisher, 15140-122) y 50 ml de suplemento StemFlex.

#### 4. Medio para CE

Para preparar 100 ml de medio para CE se usaron 75 ml de Medio E6 (Thermo Fisher, A1516401) y 15 ml de suero fetal bovino inactivado (15%) (Thermo Fisher, 30910.03).

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

Para cultivar las CTPih se requirió sembrarlas sobre fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs), de modo que les proporcionaran factores tróficos para mantener el estado pluripotente (Jozefczuk et al., 2012). 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 el sembrado se preparó una matriz de gelatina de piel de porcino al 0.1% diluida en agua tratada con 0.1% de dietil pirocarbonato (DEPC) para evitar contaminación por RNAsas.

Los pozos de 6 cm<sup>2</sup> fueron recubiertos con 1 mL de gelatina. Se retiró la gelatina 20 minutos después para dejar que se formara una capa donde se pudieran adherir los MEFs.

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 suplementado, ver Medios de cultivo) 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 medio para MEFs para mezclar con el precipitado celular y se agregaron 3 ml más de medio. Una vez mezclado, fueron sembrados en la caja previamente gelatinizada. Las células permanecieron durante 2 h en la incubadora para permitir su adhesión a la caja, posteriormente, se añadió mitomicina C (20 µg/ml) por 2 h más para impedir la replicación celular. Se cambió el medio para MEFs, posteriormente se hicieron tres lavados para retirar cualquier posible residuo de mitomicina, y las células se mantuvieron en la incubadora durante la noche y se sembraron las CTPIh a la mañana siguiente.

### **Cultivo de CTPIh**

Se utilizaron líneas CTPIh con la 3XSNCA, derivadas de un paciente con Parkinson, y su control, 1XSNCA, derivada de la hermana del paciente con Parkinson, donadas por nuestra colaboradora la Dra. Birgitt Schüle de la Universidad de Stanford, quien es parte del grupo propietario de la patente, con clave US8669048B2.

Para cultivar las colonias de CTPIh seguimos el protocolo desarrollado por nuestra colaboradora B. Schüele (Zhu et al., 2014) y previamente estandarizado en el laboratorio. Para ello, se descongeló un vial con colonias de CTPIh sobre una cama de MEFs mitomizados. La descongelación se realizó mezclando lentamente 800 µl de medio para CTPIh (ver Anexo) 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 para CTPIh. Este fue centrifugado por 2.5 minutos a 1000 rpm. Una vez retirado el sobrenadante del tubo se tomaron 500 µl más de medio con los cuales fueron resuspendidas lentamente las colonias de CTPIh. El homogenizado se sembró en el pozo con los MEFs, a las cuales se les agregó 1.5 ml de medio para CTPIh y 3 µl de Tiazovivina (1 mM, concentración final 1.5 µM), para evitar que las células se despegaran.

El medio de cultivo se cambió cada 24 h durante los siguientes 5-7 días. A partir del quinto día, las colonias con 2 milímetros de diámetro eran suficientemente grandes para poder pasarlas manualmente a pozos sin MEFs mitomizados. Para la matriz de adhesión celular sin células alimentadoras se tomaron 500 µl de la concentración inicial de geltrex (Thermo

Fisher, A1413202), el cual permite una apropiada adhesión celular, y se diluyeron en 12 ml de medio para CTPIh. 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**

Las colonias de CTPIh fueron pasadas manualmente a pozos con medio Stem Flex (Thermo Fisher, A3349401, ver Anexo) y geltrex. Para esto, se trazaban cuadrículas uniformes sobre las colonias usando una aguja. Con una micropipeta de 200 µl se tomaban y depositaban los cuadrantes de las colonias en un pozo previamente preparado con medio a 32°C junto con 2 µl de Tiazovivina. Al tercer día, a una confluencia de entre 40% y 50% se removían aquellas colonias con alta densidad celular o áreas con células dispersas y se cambiaba el medio.

### **Formación de CE**

Para diferenciar las CTPIh a la etapa de CE se realizó un pasaje manual a un pozo con geltrex, donde se les dejó crecer hasta el día 4, a una confluencia de 70%. Posteriormente se retiró el medio y se adicionó 1 ml de colagenasa IV (1 mg/ml) en medio Essential 6, un medio de mantenimiento que no induce diferenciación celular (ver Medios de cultivo). 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 Essential 6 suplementado con 15% de suero fetal bovino inactivado. El medio fue cambiado 2 días después de la formación del CE.

### **Trasplante de CE**

Al cuarto día de cultivo los CE se transfirieron a un tubo Falcon de 15 cm donde se dejaron asentar por gravedad para posteriormente retirarles el medio. Se agregó una mezcla de tripsina (1 mg/ml) y colagenasa IV (1 mg/ml) para su disociación. Dicha mezcla se dejó en incubación a 37° C durante 5 minutos. Posteriormente, fueron resuspendidos con el fin de disociarlos por fuerza mecánica. Finalmente, las células se contaron para trasplantar 60,000 células viables por animal. Las células fueron introducidas a una jeringa Hamilton e inyectadas durante un minuto en las mismas coordenadas donde se lesionó a las ratas del grupo lesión. La jeringa se dejó 6 minutos más dentro del cerebro para que las células pudieran bajar en su totalidad, se realizó un solo depósito por trasplante.

## **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) (Ciclosuprim, Pisa) vía oral directamente mediante una jeringa de insulina y 0.1 ml diluido en 750 ml de agua (B. Jensen, 2012). Este tratamiento se mantuvo diariamente hasta el día previo a la perfusión.

## **Soluciones para perfusión**

Para obtener la solución amortiguadora de fosfatos (PBS) usada para perfundir intracardialmente a los animales, se diluyeron 58 gr de fosfato de Na dibásico (.16 mM) y 5.24 gr de fosfato de Na monobásico (.038 Mm) en 1 l de agua desionizada para obtener una concentración de 0.2 M. Posteriormente, añadimos 40 gr de paraformaldehído (PFA) en 500 ml de agua previamente calentada a 60° C (4% peso/volumen en 0.1 M de buffer de fosfatos, 1.33 mM). Una vez completamente homogeneizadas las diluciones, se tomaron 500 ml de PBS 0.2 M y se añadieron a los 500 ml de PFA. Finalmente, se adicionaron 500 ml de agua desionizada a la solución de PBS con 500 ml restantes para obtener 1 l a 0.1 M. Ambas soluciones fueron llevadas a un pH de entre 7.2 y 7.4.

## **Extracción de cerebros**

Para extraer el cerebro de las ratas trasplantadas, estas se perfundieron vía intracardiaca con 200 ml de PBS a 4°C seguido de 200 ml de PFA a 4°C. Los cerebros fueron extraídos y posterior a esto se realizó un proceso de posfijación en PFA 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 al nivel del mesencéfalo con un grosor de 40 µm.

## **Tinción de Hematoxilina y Eosina**

Para realizar la tinción de hematoxilina y eosina (HyE) se montaron los tejidos sobre portaobjetos con poly-L-lisina para evitar que se despegaran durante el procedimiento. Una vez deshidratados los tejidos, se colocaron por 10 min en una estufa a 58°-60° C. Posteriormente, se les dio un baño de agua destilada durante 1 min, seguido de un baño de etanol al 96% de 1 min, un baño más de etanol absoluto, otro baño de etanol al 96% y un último baño con agua destilada durante el mismo tiempo. Posteriormente, los tejidos fueron sumergidos durante 8 min en Hematoxilina Gill para después tener lavados de agua corriente y un baño de eosina de un minuto. Finalmente, se le dio a los tejidos un baño de etanol al 96%, uno de etanol absoluto, uno de etanol absoluto con xylol, y dos baños de xylol para después ser montados en resina.

## Inmunofluorescencia

Los cortes de los cerebros de las ratas fueron permeabilizados usando PBT (PBS y 0.3% Tritón X100) 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 mantuvieron una hora en solución de bloqueo (PBT, 5% de albúmina y 5% de suero fetal bovino). Se diluyó el anticuerpo primario en la solución de bloqueo de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Los tejidos se dejaron en esta solución durante toda la noche a 4° C. Al día siguiente, los cortes se lavaron en PBS 3 veces y posteriormente se dejaron en la solución de anticuerpo secundario (diluido 1:1000 en PBS) 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. Utilizamos anticuerpos secundarios que emiten en rojo lejano (longitud de onda 649 nm) para detectar los diferentes marcadores de diferenciación. La dilución de los anticuerpos utilizados fue Lmx1a (Millipore, AB10533) 1:1000; FoxA2 (Thermo Fisher, PA5-35097) 1:500; Otx2 (Thermo Fisher, 100034245) 1:1000; DCX (Santa Cruz, SC8066) 1:1000; Tuj1 (Biolegend, 801202) 1:1000; TH (SD, SB100698-T38) 1:500, STEM121 (Takara, Y40410) 1:1000; A-SIN 1° anticuerpo (BD, 610787) 1:250; A-SIN 2° anticuerpo (BD, 616756) ) 1:250.

Para realizar las inmunofluorescencias en los CE, primero fueron lavados con PBS y posteriormente fijados con formaldehído al 4% durante 5 minutos. Después de pasar al menos una noche en sacarosa al 30% fueron congelados y cortados en Tissue-tek, un gel que polimeriza a bajas temperaturas, para obtener secciones de 8 micrometros de ancho. Estas se colocaron en portaobjetos previamente tratados con poly-D-lisina. Una vez adheridos se hicieron 2 lavados de PBS de 2 minutos cada uno y se les colocó en solución de bloqueo (PBS, 0.3% Tritón X100, 5% de albúmina, 5% de suero fetal de bovino) durante 30 minutos. Se diluyó el anticuerpo primario en solución de bloqueo a la dilución recomendada por el fabricante, Alexa fluor 647 (Thermo Fisher, A21237) 1:1000. A continuación, se hicieron 3 lavados de PBS y se adicionó el anticuerpo secundario diluido en PBS durante 1 h. Para finalizar, se hizo un lavado de PBS durante 5 minutos, seguido de 5 minutos más con DAPI.

## **Microscopía y conteo celular**

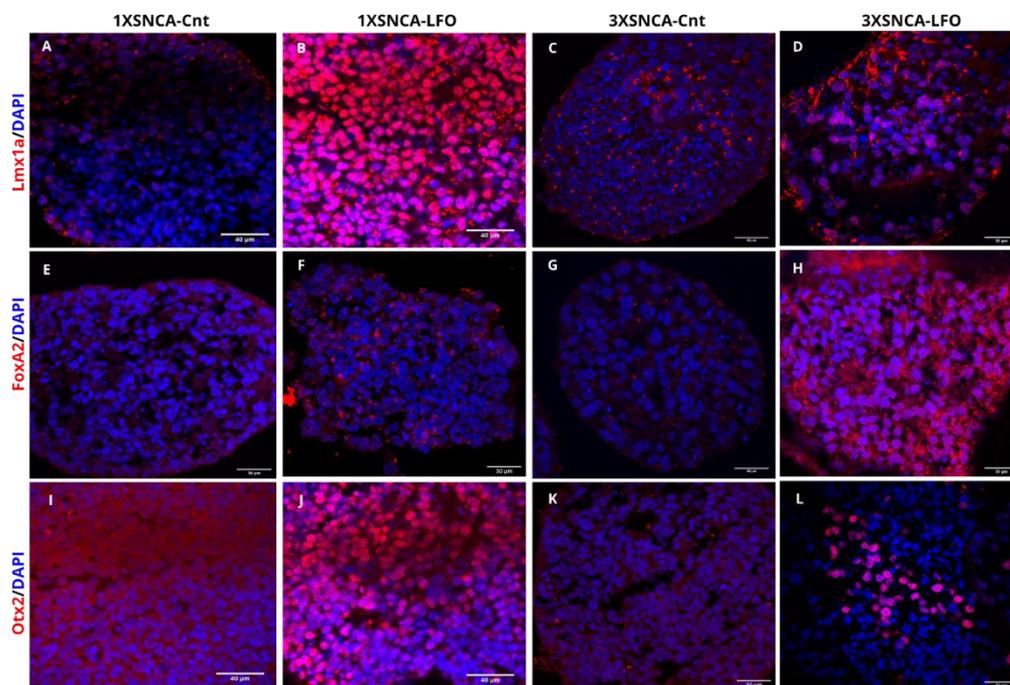
Se obtuvieron imágenes del tejido usando un microscopio confocal Zeiss LSM800 y un microscopio confocal Olympus FV1000 Multi-fotónico (Upright BX61WI e IX81 Invertido). Se utilizó el programa ImageJ/ FIJI para procesar las imágenes. Para realizar el conteo celular de los FT en los CE se utilizó la extensión *Cell Counter* del programa ImageJ/Fiji. Se utilizaron dos imágenes por cada línea celular y por cada marcador de interés (Lmx1a, FoxA2 y Otx2), contando a las células que presentaban únicamente señal positiva de DAPI, así como aquellas con señal del marcador, ambos datos se sumaron para obtener el número total de células y se realizó un porcentaje células con señal positiva por conteo. Se reporta el promedio de los porcentajes obtenidos.

## RESULTADOS

### *Los CE de las líneas 1XSNCA-LFO y 3XSNCA-LFO expresan los FT LFO*

Con el fin de evaluar la expresión de los FT LFO en las líneas 1XSNCA-LFO y 3XSNCA-LFO en los CE de 4 días de cultivo, momento en el cual son trasplantados, realizamos inmunofluorescencias para detectar su expresión. Observamos en esta etapa los tres FT en ambas líneas (Figura 8). En contraste, las líneas control 1XSNCA-Cnt y 3XSNCA-Cnt no mostraron señal para FoxA2 y Otx2, mientras que se observó Lmx1a pero en mucho menor proporción, comparado con las líneas expresando LFO (Figura 8A, C) observación que se ha reportado anteriormente (Belinsky et al., 2013) y que por lo tanto corresponde a los niveles basales de expresión durante esta etapa. Cabe hacer notar que en la línea 3XSNCA-LFO se observaron diferencias de expresión, siendo cualitativamente mayor la presencia de FoxA2 que la de Lmx1a y Otx2 (Figura 8D, H, L). Este efecto es distinto en la línea 1XSNCA-LFO, donde la expresión de FoxA2 es menor en relación con los otros 2 FT (Figura 8B, F, J). La cuantificación de la señal de los FT en esta etapa reveló que la expresión del FT FoxA2 tiene una diferencia porcentual de 50% menos en la línea 1XSNCA-LFO que en la línea 3XSNCA (Tabla 2). A su vez, el factor Otx2 tiene una diferencia porcentual de 30% menos en la línea 3XSNCA-LFO que en la 1XSNCA (Tabla 2). En contraste, entre ambas líneas celulares, Lmx1a tiene una diferencia porcentual de solo 10% (Tabla 2).

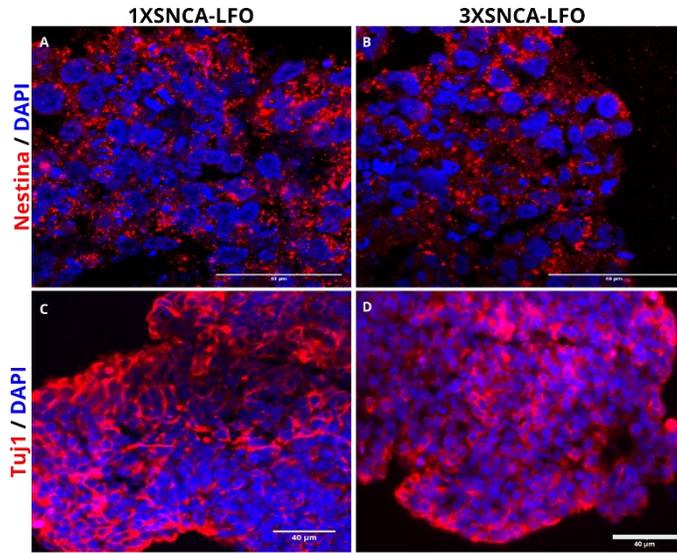
A la par, evaluamos la expresión de nestina, un marcador de precursores neurales y de Tuj1, un marcador de citoesqueleto de precursores neuronales y neuronas maduras en las líneas 1XSNCA-LFO y 3XSNCA-LFO para corroborar que, a pesar de las diferencias de expresión observadas entre ambas líneas, los CE expresaban los marcadores neurales y neuronales esperados en esta etapa. En efecto, ambas líneas expresaban nestina y Tuj1 a los 4 días de cultivo de CE (Figura 10). Indicando que su potencial de diferenciación neural es similar en esta etapa a pesar de las diferencias observadas entre la expresión de los FT.



**Figura 8. Los CE de las líneas LFO expresan los FT LFO.** Imágenes representativas de los CE a 4 días de cultivo de las líneas de CTPih 1XSNCA-Cnt (A, E, I), 1XSNCA-LFO (B, F, J), 3XSNCA-Cnt (C, G, K) y 3XSNCA-LFO (D, H, L). Inmunofluorescencia empleando anticuerpos para los FT Lmx1a (A, B, C, D), FoxA2 (E, F, G, H) y Otx2 (I, J, K, L). Barra de escala 40  $\mu$ m.

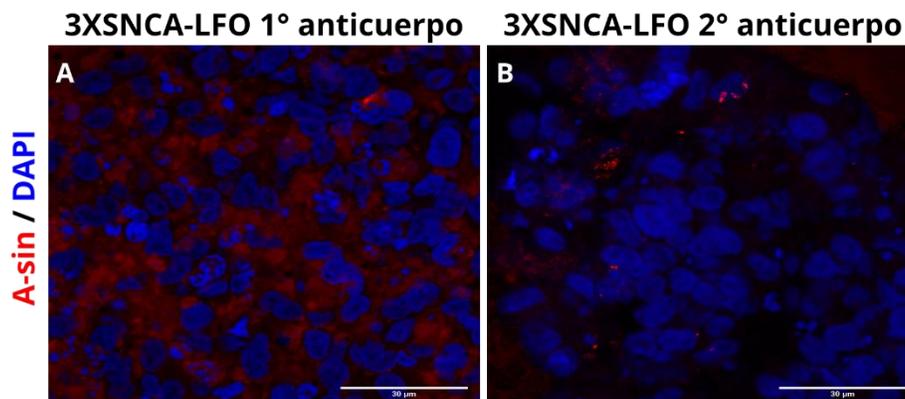
LC / FT	Lmx1a	FoxA2	Otx2
<b>1XSNCA-LFO</b>	91.14	31.89	67.34
<b>3XSNCA-LFO</b>	83.57	84.52	31.11

**Tabla 2. Porcentaje de marca positiva de Lmx1a, FoxA2 y Otx2 en los CE.** FoxA2 tiene una expresión menor en la línea 1XSNCA, mientras que Otx2 la tiene en la línea 3XSNCA-LFO que en la 1XSNCA. Porcentaje de células positivas en los CE de las líneas 1XSNCA-LFO y 3XSNCA-LFO. LC, línea celular; FT, factor de transcripción.



**Figura 9.** Los CE de las líneas 1XSNCA-LFO y 3XSNCA-LFO expresan nestina y Tuj1. Imágenes representativas de la expresión de nestina (A, B) y Tuj1 (C, D) en la etapa de CE de las líneas 1XSNCA (A, C) y 3XSNCA (B, D). Barra de escala 40  $\mu$ m.

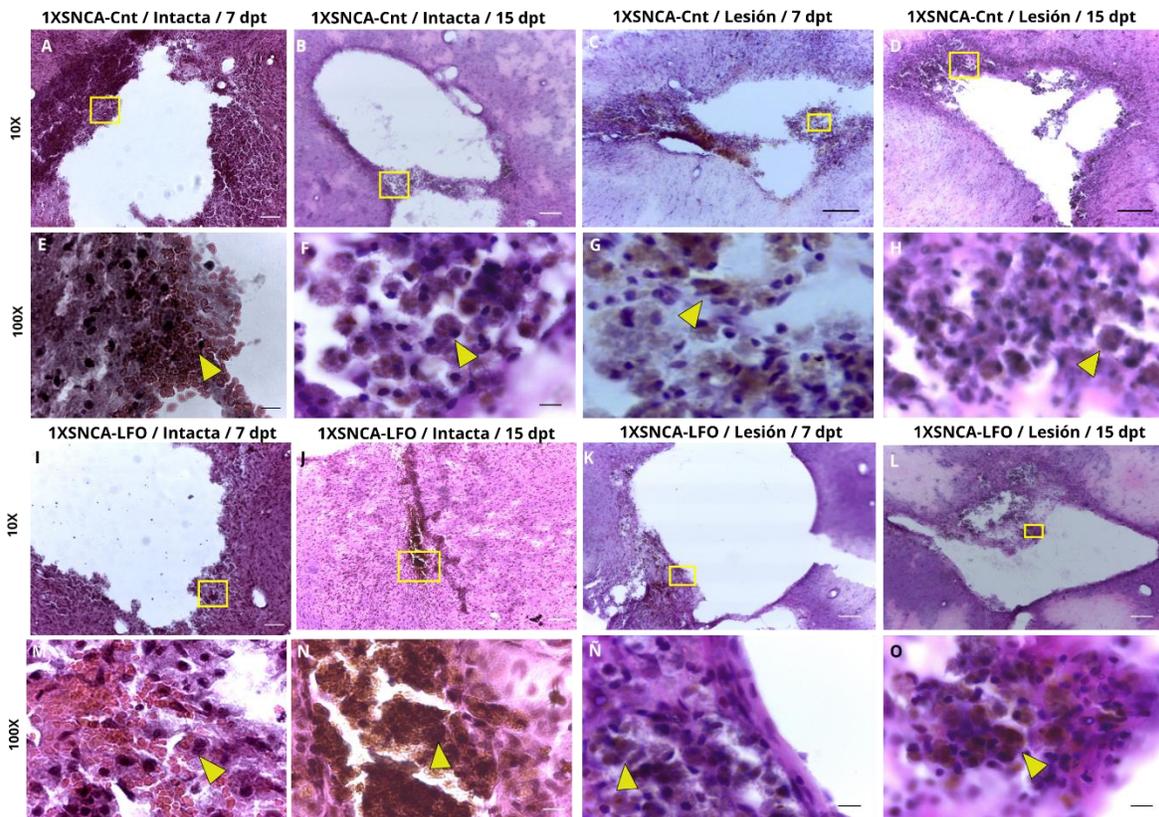
Posteriormente, quisimos analizar la expresión de A-SIN en esta etapa, para esto utilizamos dos anticuerpos diferentes. Sin embargo, la expresión que obtuvimos resultó inconsistente entre las mismas líneas celulares (Figura 10). Actualmente, nos encontramos a la espera de recibir un tercer anticuerpo de A-SIN para discernir si se expresa la proteína en esta etapa o no.



**Figura 10. Diferente señal de A-SIN entre anticuerpos.** Imágenes representativas de la señal obtenida con 2 diferentes anticuerpos en la línea 3XSNCA-LFO en etapa de CE. (A) Anticuerpo A-SIN 1 (BD, 610787) y (B) A-SIN 2 (BD, 616756). Barra de escala 30  $\mu$ m.

***Las líneas 1XSNCA-Cnt, 1XSNCA-LFO y 3XSNCA-Cnt no sobreviven en la SNpc***

Para determinar el potencial DAM de los FT LFO en las CTPIh derivadas de la hermana del paciente (sin la 3XSNCA) y con los FT, la línea 1XSNCA-LFO, y la línea control, 1XSNCA-Cnt, se cultivaron hasta etapa de CE y trasplantaron en ratas intactas o lesionadas (n= 45). En concordancia con los resultados obtenidos previamente (Ramos-Acevedo, 2018), los trasplantes de la línea 1XSNCA-Cnt mostraban morfología anormal con señales de muerte celular, evidenciado por la tinción histológica de HyE, tanto en tejidos obtenidos a 7 como a 15 dpt (Figura 11 A-H). Sorpresivamente, los trasplantes de la línea 1XSNCA-LFO también mostraban la misma morfología tanto a 7 como a 15 dpt (n = 28, Tabla 1) (Figura 11 I-O). Por lo tanto, contrario a lo observado con las CTEh (Ramos-Acevedo, 2018), en las CTPIh el vector LFO es incapaz de inducir la sobrevivencia y diferenciación DAM de los CE en la SNpc.

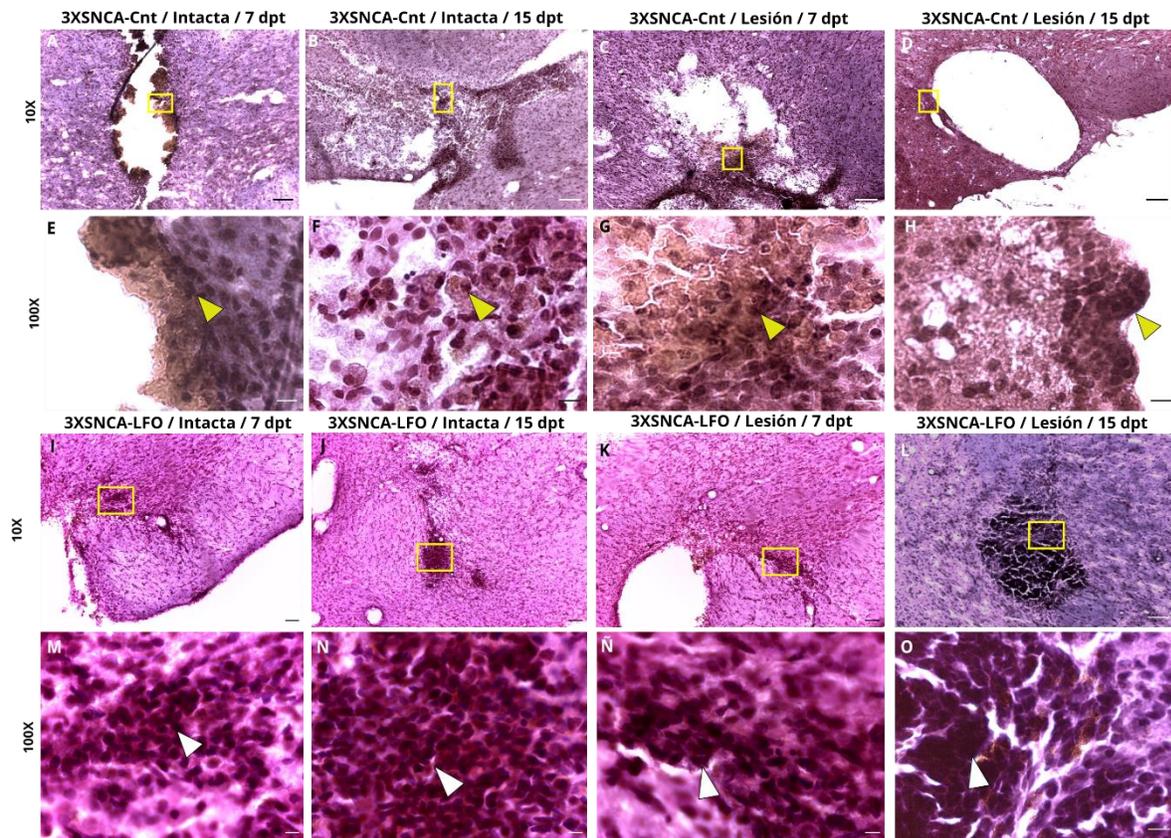


**Figura 11. Los trasplantes de la línea 1XSNCA-Cnt y 1XSNCA-LFO presentan muerte celular.** Imágenes representativas de los trasplantes de la línea 1761-Cnt (A-H) y 1761-LFO (I-O) de ratas intactas y lesionadas con tinción de HyE. Imágenes con amplificación original de 10x (A-D, I-L) y 100x (E-H, M-O) donde se puede apreciar la extensión del trasplante en el tejido circundante a la SNpc. En las imágenes a 100x se observa la morfología anormal (flecha amarilla) de las células trasplantadas. Barra de escala en 10x 200  $\mu\text{m}$  y en 100x 40  $\mu\text{m}$ .

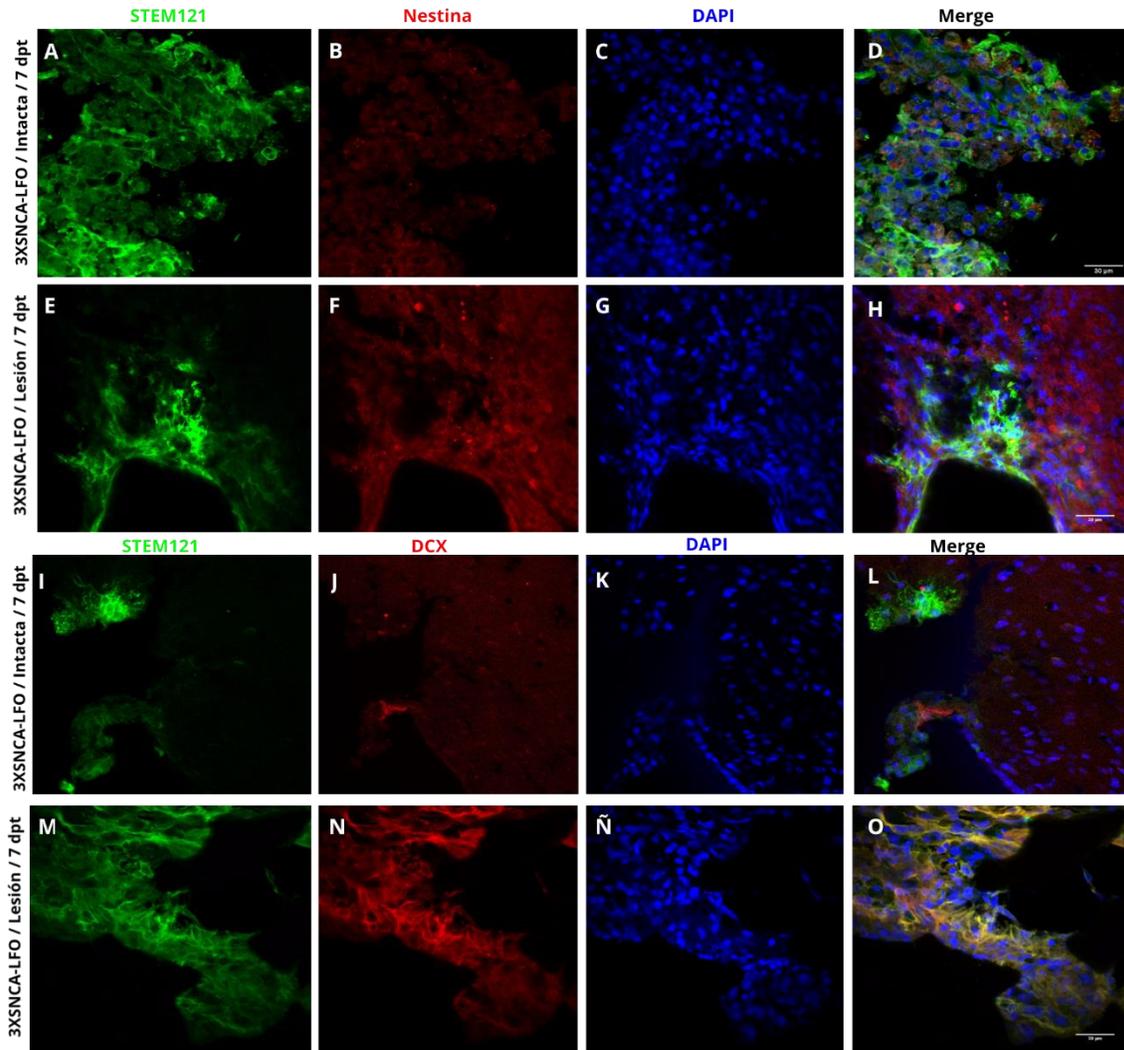
### ***La línea 3XSNCA-LFO sobrevive e inicia la diferenciación neuronal en la SNpc***

De la misma manera, para determinar si los FT LFO inducen la diferenciación DAm *in vivo* y son capaces de contrarrestar el efecto de la A-SIN sobre la diferenciación DA, trasplantamos en la SNpc CE derivados de CTPIh obtenidos de un paciente con la 3XSNCA que contenían el vector de sobreexpresión LFO (3XSCNA-LFO) y su respectiva línea control sin el vector LFO (3XSNCA-Cnt). En concordancia con los resultados anteriores, los trasplantes de las células sin los FT LFO presentaron morfología anormal en el área trasplantada en animales de ambos grupos tanto a 7 (n=9) como a 15 dpt (n=9) (Figura 12 A-H). A diferencia de las otras líneas de CTPIh, en el 50% de los animales trasplantados con la línea 1754-LFO sobrevivieron las células tanto en animales lesionados (n=12) como en intactos (n=10) a 7 (n=11) y 15 dpt (n= 11) (Figura 9 J-O). Para discernir entre el trasplante realizado y el tejido endógeno usamos el anticuerpo STEM121, con especificidad para una proteína de citoplasma humano.

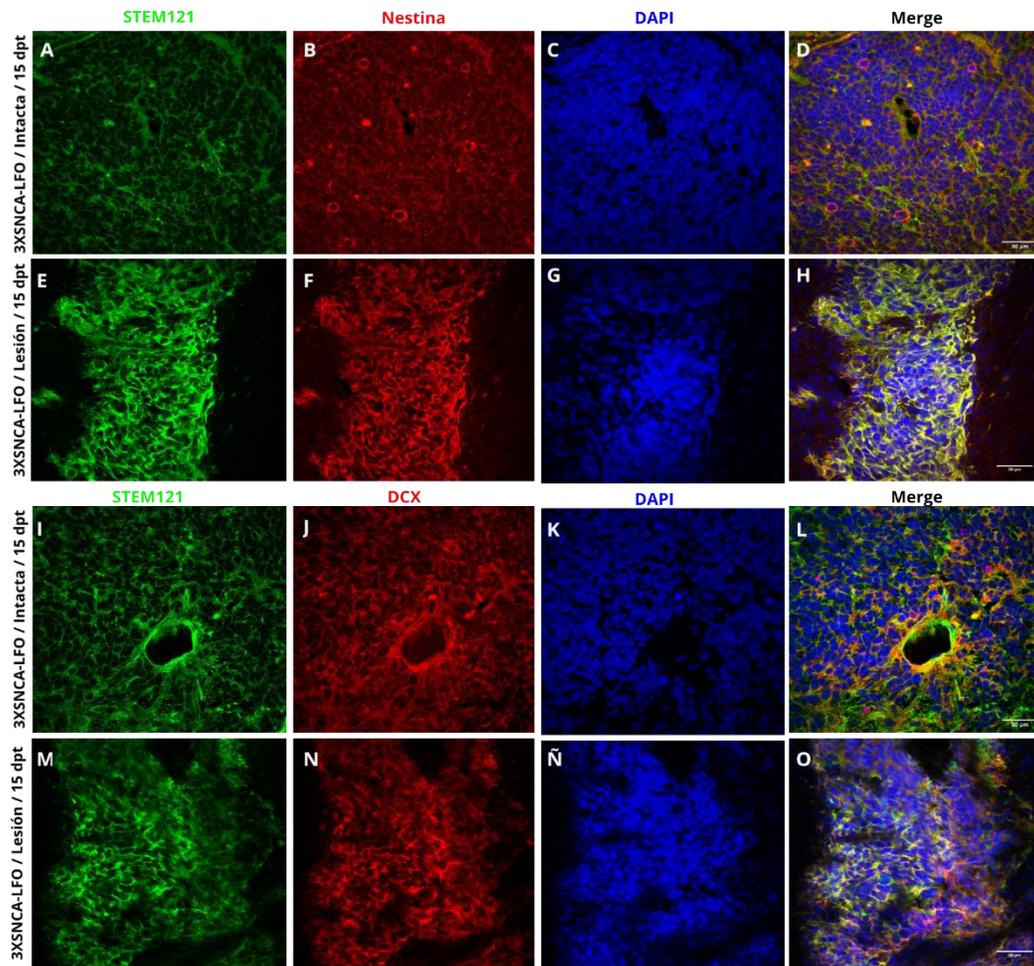
Encontramos que a 7 dpt en ratas intactas (n=3) o lesionadas (n=3) la señal de nestina colocaliza con las células STEM121+ (Figura 13 D, H), lo que sugiere el inicio de la diferenciación neural. A su vez, la expresión de DCX era especialmente prominente en las ratas lesionadas (Figura 13 O). A 15 dpt incrementó la expresión tanto de nestina como de DCX en animales lesionados (n=3) e intactos (n=3) (Figura 14 B, F, J, N). Por otra parte, la presencia de Tuj1 se observa con niveles similares de expresión en ambas condiciones del modelo experimental, tanto a 7 (n=6) como a 15 dpt (n=6) (Figura 15 A-L). Debido a que Tuj1 y STEM121 son anticuerpos producidos en ratón, no fue posible realizar una inmunofluorescencia doble.



**Figura 12. Los trasplantes de la línea 3XSNCA-LFO sobrevivieron.** Imágenes representativas de los trasplantes de la línea 3XSNCA-Cnt (A-H) y 3XSNCA-LFO (I-O) de ratas intactas y lesionadas con tinción de HyE. Imágenes con amplificación original de 10x (A-D, I-L) y a 100x (E-H, M-O) donde se puede apreciar la extensión del trasplante en el tejido circundante a la SNpc. En las imágenes a 100x se observa la morfología anormal de las células de la línea 3XSNCA-Cnt (E-H, flecha amarilla) y normal de la línea 3XSNCA-LFO (M-O, flecha blanca) de las células trasplantadas. Barra de escala en 10x 200  $\mu$ m y en 100x 40  $\mu$ m.

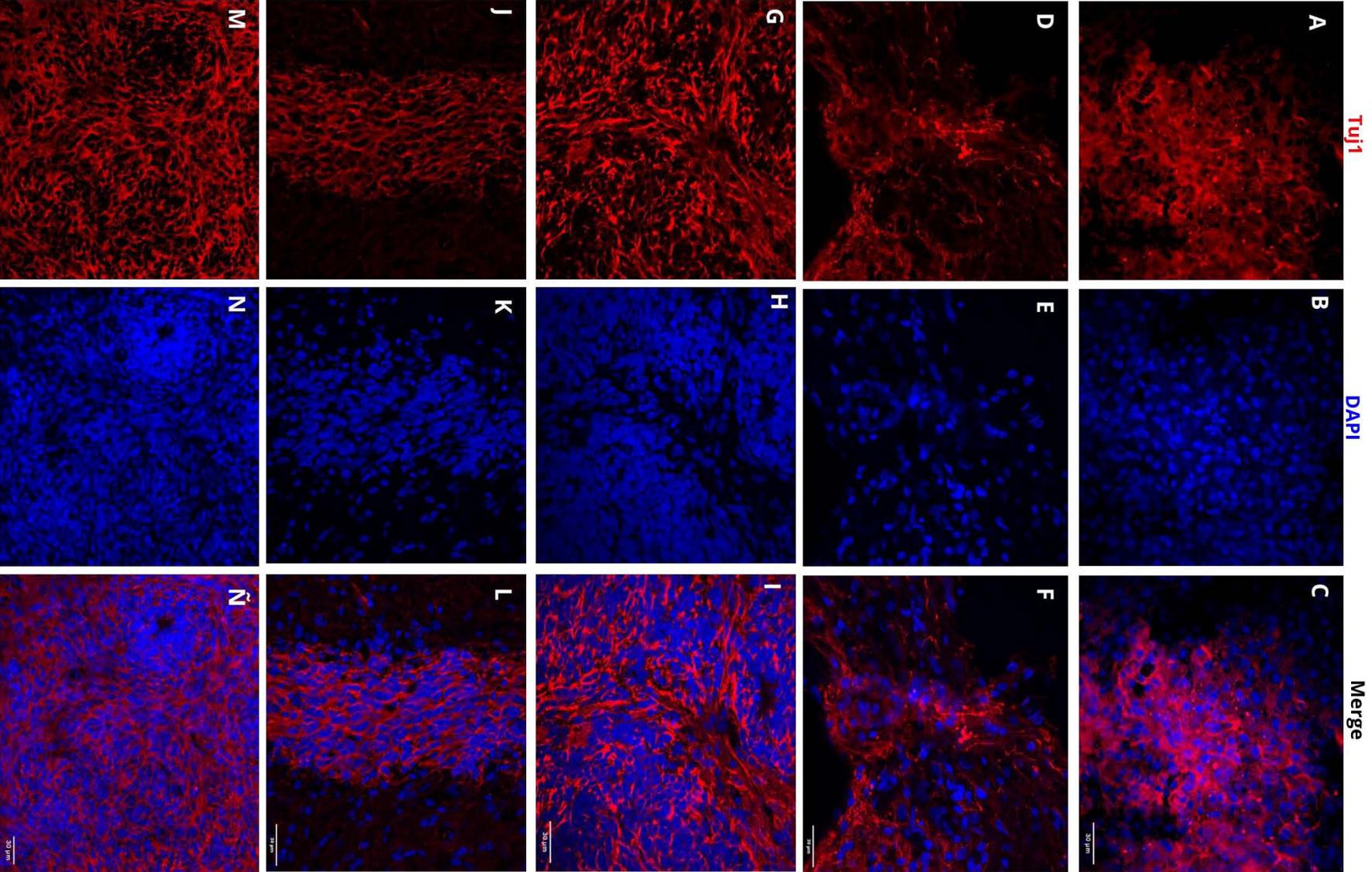


**Figura 13.** Nestina y DCX se expresan en la línea 1754-LFO a 7 dpt. Imágenes representativas de los trasplantes de la línea 3XSNCA-LFO a 7 dpt en las condiciones intacta (A-D y I-L) y lesionada (E-H y M-O) con STEM121 (A, E, I, M), nestina (C, G) y DCX (K, Ñ). Doblecortina, DCX. Barra de escala 30 μm.



**Figura 14.** Nestina y DCX se expresan en la línea 1754-LFO a 15 dpt. Imágenes representativas de los trasplantes de la línea 3XSNCA-LFO a 15 dpt en las condiciones intacta (A-D y I-L) y lesionada (E-H y M-O) con STEM121 (A, E, I, M), Nestina (C, G) y DCX (K, Ñ). Doblecortina, DCX. Barra de escala 30  $\mu\text{m}$ .

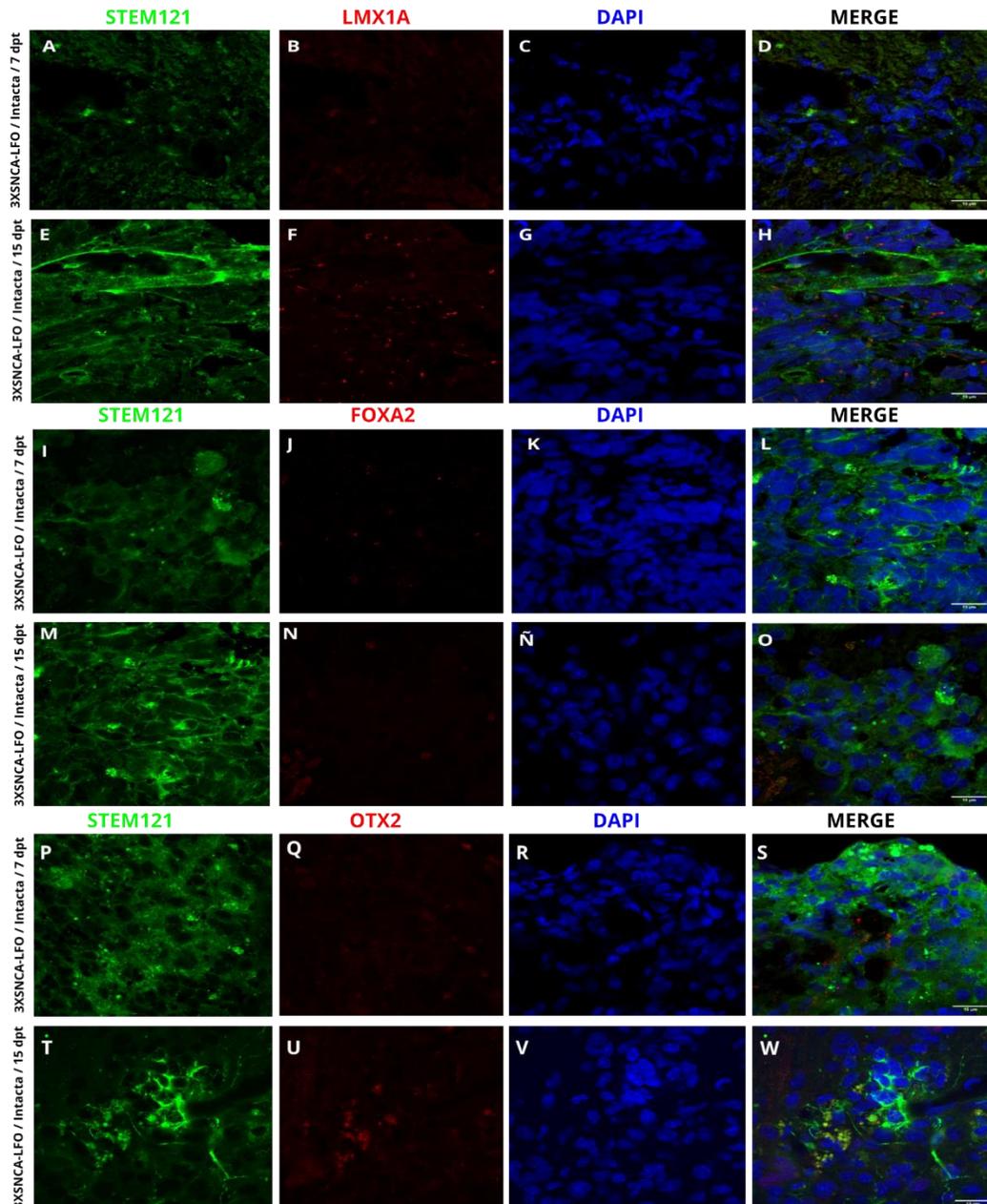
3XSNCA-LFO / Intacta / 30 dpt    3XSNCA-LFO / Lesión / 15 dpt    3XSNCA-LFO / Intacta / 15 dpt    3XSNCA-LFO / Lesión / 7 dpt    3XSNCA-LFO / Intacta / 7 dpt



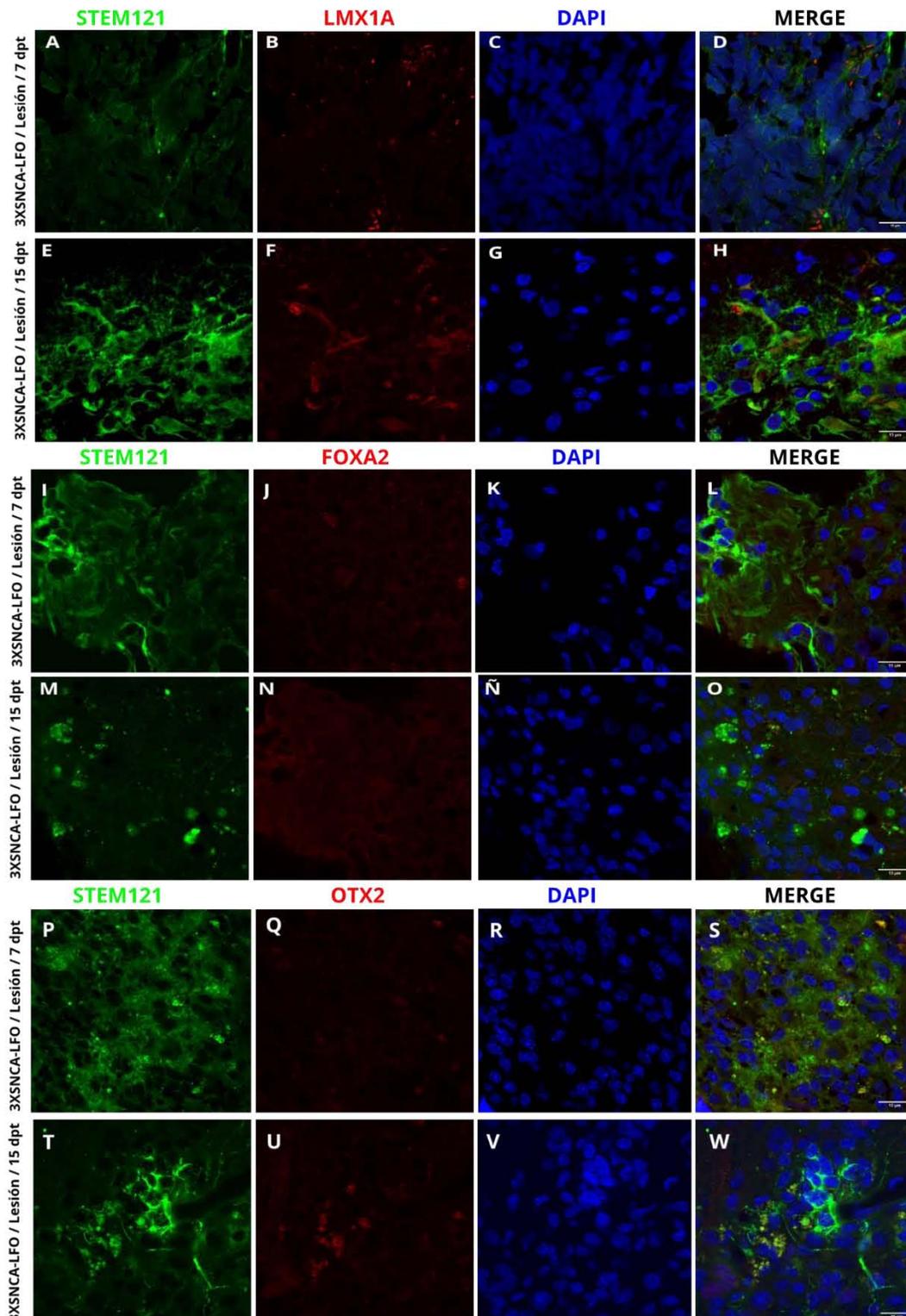
**Figura 15. Tuj1 se expresa desde los 7 dpt en la línea 3XSNCA-LFO y se mantiene a lo largo del proceso de diferenciación.** Imágenes representativas de la expresión de Tuj1 a 7 (A-F), 15 (G-L) y 30 (M-Ñ) dpt. Barra de escala 30  $\mu$ m.

***Los trasplantes de la línea 3XSNCA-LFO no se especifican al fenotipo DA***

Para evaluar si los FT LFO en la línea 3XSNCA-LFO indujeron la especificación DA en las células trasplantadas a 7 y 15 dpt, analizamos la expresión de Lmx1a, FoxA2 y Otx2 en estas etapas en los grupos intactas (Figura 16) y lesionadas (Figura 17). Sorpresivamente, no encontramos señal de ninguno de los marcadores en los tejidos trasplantados en esta etapa. Por lo tanto, las células de la línea 3XSNCA-LFO iniciaron un proceso de diferenciación neuronal más no de especificación DAM.



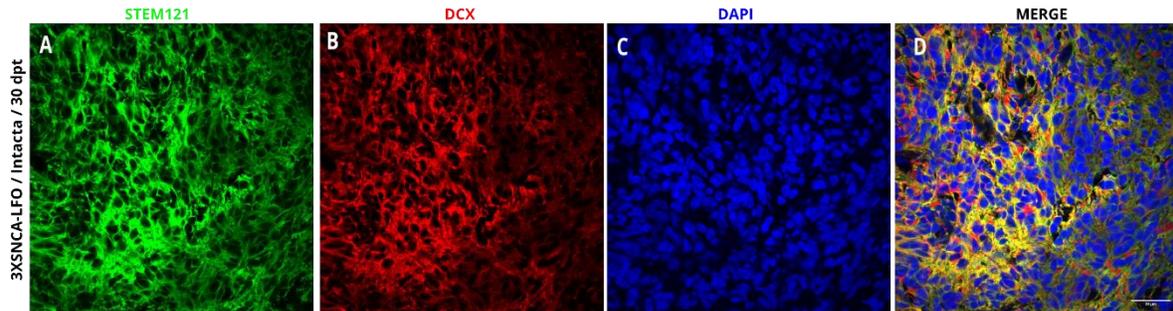
**Figura 16.** Los FT LFO no se expresan en los grupos intactos de la línea 3XSNCA-LFO. Imágenes representativas de los trasplantes de la línea 3XSNCA-LFO en la condición intacta a 7 (A-D, I-L, P-S) y 15 (E-H, M-O, T-W) dpt. Se muestra STEM121 (A, E, I, M, P, T), Lmx1a (C, G), FoxA2 (K, Ñ) y Otx2 (R, V). Barra de escala 30  $\mu$ m.



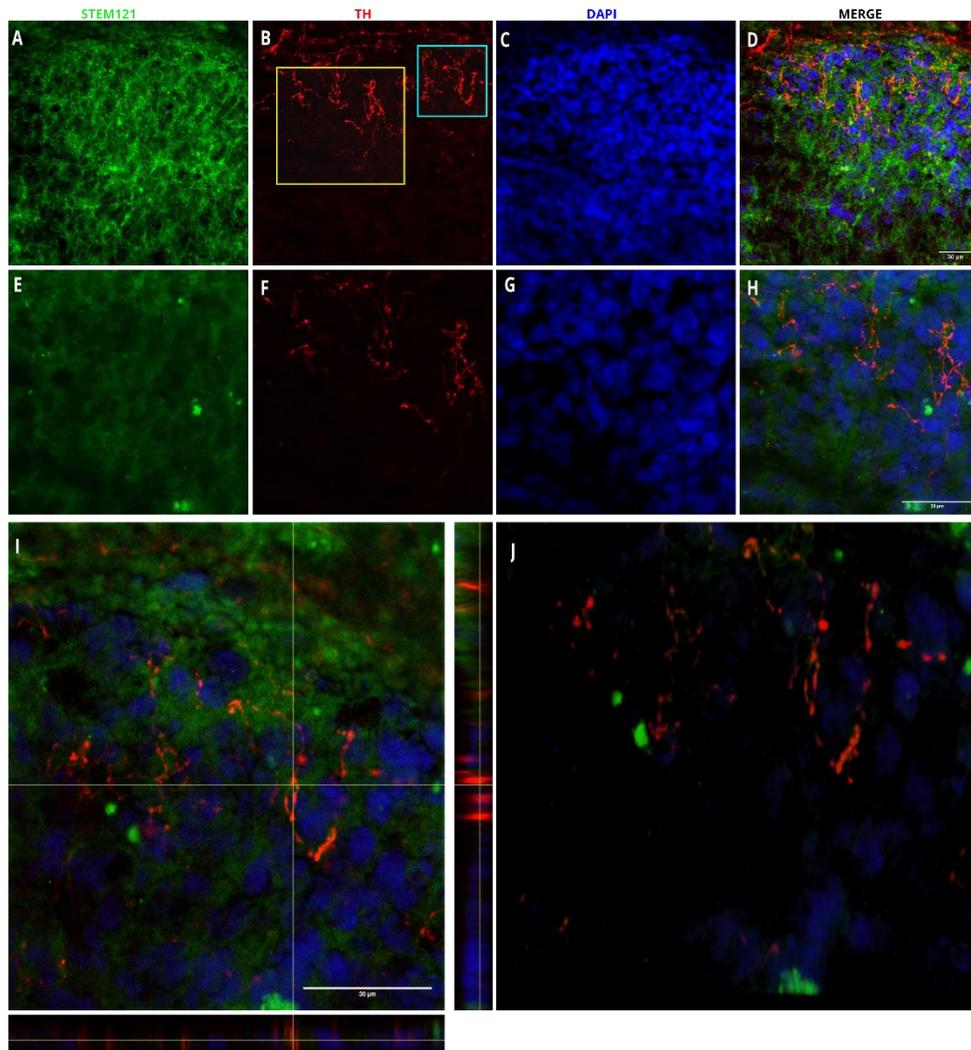
**Figura 17. Los FT LFO no se expresan en los grupos lesionados de la línea 3XSNCA-LFO.** Imágenes representativas de los trasplantes de la línea 3XSNCA-LFO en la condición lesión a 7 (A-D, I-L, P-S) y 15 (E-H, M-O, T-W) dpt. Se muestra STEM121 (A, E, I, M, P, T), Lmx1a (C, G), FoxA2 (K, Ñ) y Otx2 (R, V). Barra de escala 30  $\mu$ m.

### **Los trasplantes de la línea 3XSNCA-LFO no expresan TH**

Para explorar la diferenciación neuronal y DA a mayor plazo temporal en la línea 3XSNCA-LFO, llevamos nuestro análisis a 30 dpt para las condiciones de ratas con lesión e intactas (Lesión/n=9; Intacta/n=6). Encontramos que solamente un animal con la SNpc intacta tenía el trasplante vivo y con alta expresión de marcadores de diferenciación neuronal como Tuj1 (Figura 15 M-Ñ) y DCX (Figura 18). Sin embargo, la señal del marcador de diferenciación DA, TH, encontrada en el área del trasplante, no colocalizó con el de células humanas STEM121 en esta etapa, por lo que la señal pertenece a las neuronas DAM endógenas (animal intacto) (Figura 19). Por lo tanto, a 30 dpt la línea 3XSNCA-LFO en etapa de CE solo logró sobrevivir en un animal y presentó diferenciación neuronal, más no DAM.



**Figura 18. La línea 3XSNCA-LFO expresa DCX a 30 dpt.** Imagen representativa del trasplante de la línea 3XSNCA-LFO a 30 dpt en la condición intacta con STEM121 (A) y DCX (B). Doblecortina, DCX. Barra de escala 30  $\mu$ m.



**Figura 19. La línea 3XSNCA-LFO no presenta fenotipo DAM a 30 dpt.** (A-D) Imágenes representativas del trasplante de la línea 3XSNCA-LFO a 30 dpt en la condición intacta con STEM121 (A, E) y TH (B, F). (E-H) muestran una ampliación del cuadro amarillo en (B). (I) Se muestra una ampliación en ortogonal del cuadro azul en (B), donde se aprecia que la señal de TH no colocaliza con la de STEM121. (J) Se muestra una reconstrucción tridimensional del cuadro azul en (B), donde se aprecia que la señal de STEM121 se encuentra en otro plano. Tirosina hidroxilasa, TH. Barra de escala 30 µm.

## Discusión

### *Expresión de los FT LFO en etapa de CE*

Para determinar el potencial DAM de las líneas de CTPIh *in vivo*, en este proyecto comenzamos por evaluar la expresión de los FT Lmx1a, FoxA2 y Otx2 en etapa de CE de 4 días. La expresión de los 3 FT en las líneas LFO 1XSNCA-LFO y 3XSNCA-LFO confirmó que el vector se estaba expresando adecuadamente en los CE al momento del trasplante. Sin embargo, observamos que la señal del FT Lmx1a se encuentra presente y disminuida en las líneas control en comparación con las líneas LFO, lo cual ya se reportó anteriormente en esta etapa en CTEh medido por Western blot (Belinsky et al., 2013). Además, observamos cualitativamente la diferencia de expresión entre los factores, siendo FoxA2 menor en la línea 1761-LFO, lo que nos indicó una posible regulación transcripcional o traduccional.

Para analizar las posibles causas de la diferencia entre la expresión de los FT LFO en etapa de CE entre las líneas 1761-LFO y 1754-LFO se podría, en primer lugar, realizar un RT-PCR cuantitativo para los genes *Lmx1a*, *Foxa2* y *Otx2*. Con este método podríamos determinar si se transcribe el vector correctamente y, por lo tanto, los genes de los FT en cantidades similares. En segundo lugar, para cuantificar la cantidad de proteína traducida podría realizarse un Western blot. Con esto, determinaríamos si la regulación se encuentra a nivel postranscripcional. En ambos casos, la medición sería sobre toda la población celular evitando así la diferencia de señal que una inmunofluorescencia puede generar entre cada uno de los CE de un mismo cultivo.

Por otro lado, la expresión de la A-SIN se ha observado en neuronas DAM maduras (Africa, 2016; Nakai et al., 2007). Sin embargo, no existen reportes de su presencia en células con fenotipo troncal pluripotente. No obstante, al observar diferencias en la expresión de los FT LFO entre las líneas LFO y no entre las líneas con 3XSNCA, consideramos que, al menos en esta etapa, la A-SIN no parece tener un papel regulatorio. Al analizar la expresión de A-SIN en etapa de CE por medio de inmunofluorescencia, usando dos anticuerpos diferentes, encontramos discrepancias en la señal obtenida entre las mismas líneas celulares. Observando una expresión total de la A-SIN observada con el primer anticuerpo contra nula expresión usando el segundo anticuerpo. Por lo cual, evaluar la expresión de A-SIN con otros métodos como RT-PCR cuantitativa o Western blot desde etapa de CE, sería un paso más hacia la comprensión de la función de esta proteína en etapas tempranas de diferenciación, así como en la 3XSNCA.

### *Diferenciación neuronal de la línea 3XSNCA-LFO*

A lo largo del presente trabajo también evaluamos el potencial DAM de CE derivados de CTPih con los FT DAM LFO y con 3XSNCA en la SNpc en ratas adultas intactas o lesionadas. Observamos que solamente la línea 3XSNCA-LFO logró sobrevivir y diferenciar a un linaje neuronal, más no DA, en la SNpc desde 7 hasta 30 dpt en ratas intactas y a 15 dpt en ratas lesionadas.

Los trasplantes de las líneas 3XSNCA-Cnt y 3XSNCA-LFO, ambas obtenidas de un paciente con la EP derivado de la presencia de la triplicación del gen SNCA, presentaron resultados similares a los observados en nuestro proyecto con CTEh (Ramos-Acevedo, 2018). La línea 3XSNCA-Cnt no presentó sobrevivencia alguna, mientras que la línea con el vector LFO sí sobrevivió. Sin embargo, a diferencia de los resultados obtenidos con las líneas de CTEh, las células trasplantadas no presentaron los marcadores DAM. Por lo tanto, debido a que el vector insertado en ambas líneas es el mismo (Zhu, et al., 2014) hubo una o varias diferencias críticas entre ambas líneas celulares que afectó el potencial DAM que el vector LFO ejerció sobre los CE de la línea CTEh.

Las variables para tomar en cuenta para interpretar los resultados son, en primer lugar, la diferencia inherente entre CTEh y CTPih. Estas últimas son más susceptibles a diversos tipos de estrés. Por la longitud de sus telómeros se ha determinado que son células envejecidas, con un metabolismo diferente y una regulación epigenética única, pues, entre otras cosas, suelen silenciar transgenes (Choi et al., 2015; Kim et al., 2012; Mallon et al., 2014). Por lo cual, estas células, aunque similares, no son idénticas entre sí (Bilic y Belmonte, 2012; Marei et al., 2017; Zhao et al., 2017).

En segundo lugar, se encuentra la presencia de la 3XSNCA. Hasta el momento de la escritura de este proyecto no se ha reportado interacción alguna entre la proteína A-SIN y los FT LFO. No obstante, la actividad de la A-SIN en el núcleo está asociada a complejos remodeladores de la cromatina, como “escritores” y “borradores” epigenéticos. Uno de estos complejos asociados a represión transcripcional es H3K9 mono/dimetil transferasa (Zhao et al., 2016). En efecto, la sobreexpresión de A-SIN aumenta la actividad de esta enzima, promoviendo el silenciamiento génico (Sugeno et al., 2016). A la par, este complejo es propenso a silenciar transgenes activos (Alhaji et al., 2019; Wang y Goff, 2017). Por lo cual, en nuestro modelo de 3XSNCA, la A-SIN podría estar silenciando la expresión del vector LFO mediante la H3K9 metiltransferasa, evitando la diferenciación DAM de las células trasplantadas. Para evaluar este proceso *in vitro* sería factible medir la expresión de la enzima H3K9 metiltransferasa, así como el nivel de metilación que podría presentar en el cuerpo del vector o en el promotor mismo del vector LFO de la línea 1XSNCA-LFO con respecto de la línea 3XSNCA-LFO.

A pesar de la ausencia de los FT, el nicho mesencefálico de la SNpc resultó permisivo para la sobrevivencia de los trasplantes hasta los 15 dpt y en al menos un animal intacto hasta 30 dpt. Este resultado también resulta similar a lo previamente observado con respecto a la sobrevivencia de CE derivados de CTEh, donde la sobrevivencia de los trasplantes a 30 dpt en ratas intactas fue de dos animales (n=2) y en ratas lesionadas de uno (n=12). Esto nos indica que esta ventana temporal puede no favorecer el trasplante en etapa de CE en nuestro modelo experimental bajo nuestras condiciones. A la par, previamente también observamos que las CTEr sobreviven en la SNpc sin la sobreexpresión de los FT LFO donde la diferenciación DAm tampoco se observó. (Maya-Espinosa et al., 2015), indicando que existen otros mecanismos y señalización en la SNpc que permiten a los CE sobrevivir sin necesidad de los FT LFO, al menos en los primeros dpt.

Por otro lado, en las líneas CTPIh 1XSNCA-Cnt y 1XSNCA-LFO, ambas derivadas de la hermana del paciente con la EP, observamos en la periferia de secciones grandes sin tejido núcleos celulares amorfos y compactos, así como su morfología celular carente de definición. En concordancia con nuestro proyecto de inducción DAm usando CTEh (Ramos-Acevedo, 2018), las células sin los FT LFO (1XSNCA-Cnt y 3XSNCA-Cnt) presentaron sobrevivencia nula al ser trasplantadas en etapa de CE en la SNpc intacta y lesionada tanto a 7 como a 15 dpt. Los resultados obtenidos con la línea de CTEh sobreexpresando los factores LFO y la línea 3XSNCA-LFO confirman que estos factores son necesarios para la sobrevivencia de CE en la SNpc, y su diferenciación hacia el fenotipo DA en la línea de CTEh. Sin embargo, fue notable que la línea 1XSNCA-LFO tampoco sobrevivió a 7 dpt en la SNpc intacta o lesionada con 6-OHDA de ratas adultas (n = 30). Un segundo trasplante analizado a 7 (n= 15) y 15 (n=15) dpt confirmó el resultado de ausencia de sobrevivencia.

#### *Sobrevivencia de la línea 1XSNCA-LFO*

La sobrevivencia de la línea 3XSNCA-LFO (que no se observó con la línea 1XSNCA-LFO), se puede deber a la diferencia de expresión observada y cuantificada de FoxA2 entre ambas líneas en etapa de CE. Nuestros resultados apuntan a que FoxA2 podría ser un FT necesario para que los CE derivados de CTPIh sobrevivieran durante los primeros días del trasplante. FoxA2 es un factor que activa tanto la expresión de Lmx1a como la de Nurr1 y Pitx3, y mantiene la de marcadores clave del fenotipo DAm como TH y Girk2 (Matise et al., 1998; Andersson et al., 2006; Ferri et al., 2007; Omodei et al., 2008). Dada su relevancia en el desarrollo DAm (Matise et al., 1998; Wurst y Bally-Cuif, 2001), es posible que niveles insuficientes de este FT pueden disminuir las posibilidades de sobrevivencia de las CTPIh en etapa de CE en la SNpc. Esto debido a la correlación que observamos entre la expresión elevada de FoxA2 en los CE de la línea 3XSNCA-LFO y su subsecuente sobrevivencia en los trasplantes. En contraste con una menor expresión observada de este factor en la línea 1XSNCA-LFO y su nula sobrevivencia.

Una de las interrogantes que queda por esclarecer, es la causa de la diferencia entre la expresión observada de los FT LFO en etapa de CE. En efecto, el CE es un conglomerado celular heterogéneo (Tomov et al., 2015). Consideramos que la expresión de los FT LFO disminuyó casi en su totalidad (posiblemente a niveles solo detectables por medio de PCR o hibridación *in situ*). No obstante, la A-SIN pudo tener un efecto sobre la diferenciación DAm, al disminuir la expresión de genes como Nurr1, Girk2, Dlk1, Gabbr2 y TH, siendo Nurr1 uno de los genes más críticos para lograr la diferenciación DAm (Decressac et al., 2012; Martinat et al., 2006; Oliveira et al., 2015; Saucedo-Cardenas et al., 1998). Se ha determinado que las líneas de CTPih con la 3XSNCA al ser diferenciadas a neuronas DA tienen una menor proporción de neuritas, su comunicación celular se ve comprometida y tienen una menor proporción de marcadores DA comparadas con las líneas 1XSNCA. Mas aún, al realizar el knock-out del gen SNCA en las líneas 3XSNCA se logra rescatar el fenotipo DA (Oliveira et al., 2015). Indicando que, en efecto, la sobreexpresión de A-SIN afecta negativamente la fisiología y la diferenciación de neuronas DA.

Actualmente, no se ha reportado interacción directa alguna entre los FT LFO y la A-SIN que esté asociada con protección celular o neuronal. Sin embargo, nuestros resultados sugieren que puede haber una interacción indirecta asociada a este efecto. En ese sentido, se ha visto que la A-SIN es protectora de células neuronales derivadas de un tumor hipotalámico murino bajo condiciones de estrés oxidativo, específicamente a peróxido de hidrógeno (Hashimoto et al., 2002). En efecto, se observó que la sobreexpresión de A-SIN aumenta la viabilidad celular en presencia de esta especie reactiva a través de la inactivación de la vía c-Jun N-terminal cinasa. Vía por la cual la A-SIN podría ejercer un efecto a considerar dentro de nuestro modelo. En efecto, al no haber sobrevivido la línea 3XSNCA-Cnt, el papel protector pudo haber sido solo observable en conjunto con la expresión de los factores LFO.

Finalmente, usar los trasplantes autólogos como terapia celular para evitar rechazo inmunológico pueden resultar perjudicial para el organismo debido a que las células trasplantadas tienen la misma condición genética del paciente. Sin embargo, el advenimiento de tecnologías de edición genética cada vez más eficientes y precisas permiten corregir las mutaciones, duplicaciones o triplicaciones que originan el efecto patológico. Por lo tanto, la línea 3XSNCA-LFO podría ser corregida para inhibir la expresión de dos alelos sobrantes. De esta forma, sería posible evaluar si los factores LFO logran inducir el fenotipo DAm en esta línea celular.

## Conclusión

Los resultados obtenidos en este proyecto indican que la sobreexpresión de Lmx1a, FoxA2 y Otx2 en etapa de CE permitieron la sobrevivencia de la línea 3XSNCA. Sin embargo, no lograron inducir su diferenciación DA, posiblemente debido a un efecto de regulación a la baja por parte de misma sobreexpresión de la A-SIN. En contraste, la línea 1XSNCA no logró sobrevivir a pesar de la sobreexpresión de los FT, posiblemente debido a una menor expresión de FoxA2. Por lo tanto, son necesarios más estudios para entender los mecanismos que dirigen y/o regulan la diferenciación DAm de CTPih y de la 3XSCNA en el microambiente mesencefálico. Este modelo genético de la EP representa una gran oportunidad de estudio de esta sinucleopatía *in vitro* e *in vivo*.

## REFERENCIAS

- Aboutit, S., Bousset, L., Loria, F., Zhu, S., de Chaumont, F., Pieri, L., ... Zurzolo, C. (2016). Tunneling nanotubes spread fibrillar  $\alpha$ -synuclein by intercellular trafficking of lysosomes. *The EMBO Journal*, *35*(19), 2120–2138. <https://doi.org/10.15252/embj.201593411>
- Africa, S. (2016). Up-regulation of SNCA Gene Expression: Implications to Synucleinopathies, *4*(11), 145–157. [https://doi.org/10.1016/S2214-109X\(16\)30265-0](https://doi.org/10.1016/S2214-109X(16)30265-0). Cost-effectiveness
- Alcalá, C., & Castellanos, V. (2002). Prevalencia de algunas enfermedades neurológicas en la Ciudad de Tepatlán, Jalisco, México. *Revista Mexicana de Neurociencia*, *3*(2), 71–76.
- Alhaji, S. Y., Ngai, S. C., & Abdullah, S. (2019). Silencing of transgene expression in mammalian cells by DNA methylation and histone modifications in gene therapy perspective. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, *35*(1), 1–25. <https://doi.org/10.1080/02648725.2018.1551594>
- 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>
- B. Jensen, M. (2012). Injected Versus Oral Cyclosporine for Human Neural Progenitor Grafting in Rats. *Journal of Stem Cell Research & Therapy*, *01*(S10). <https://doi.org/10.4172/2157-7633.s10-003>
- Baizabal, J. M., & 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>
- Belinsky, G. S., Sirois, C. L., Rich, M. T., Short, S. M., Moore, A. R., Gilbert, S. E., & Antic, S. D. (2013). Dopamine Receptors in Human Embryonic Stem Cell Neurodifferentiation. *Stem Cells and Development*, *22*(10), 1522–1540. <https://doi.org/10.1089/scd.2012.0150>
- Bilic, J., & Belmonte, J. C. I. (2012). Concise Review: Induced Pluripotent Stem Cells Versus Embryonic Stem Cells: Close Enough or Yet Too Far Apart? *STEM CELLS*, *30*(1), 33–41. <https://doi.org/10.1002/stem.700>
- Boronat-García, A., Guerra-Crespo, M., & 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>
- Boronat-García, A., Palomero-Rivero, M., Guerra-Crespo, M., Millán-Aldaco, D., & Drucker-Colín, R. (2016). Intrastratial grafting of chromospheres: Survival and functional effects in the 6-OHDA rat model of Parkinson's disease. *PLoS ONE*, *11*(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0160854>

- Bové, J., & 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., & 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>
- Burré, J., Sharma, M., & Südhof, T. C. (2014).  $\alpha$ -Synuclein assembles into higher-order multimers upon membrane binding to promote SNARE complex formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *111*(40), E4274-83. <https://doi.org/10.1073/pnas.1416598111>
- Burré, J., Vivona, S., Diao, J., Sharma, M., Brunger, A. T., & Südhof, T. C. (2013). Properties of native brain  $\alpha$ -synuclein. *Nature*, *498*(7453), E4-6; discussion E6-7. <https://doi.org/10.1038/nature12125>
- Byers, B., Cord, B., Nguyen, H. N., Schüle, B., Fenno, L., Lee, P. C., ... Palmer, T. D. (2011). SNCA Triplication Parkinson's Patient's iPSC-derived DA Neurons Accumulate  $\alpha$ -Synuclein and Are Susceptible to Oxidative Stress. *PLoS ONE*, *6*(11), e26159. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0026159>
- 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.
- Choi, J., Lee, S., Mallard, W., Clement, K., Tagliazucchi, G. M., Lim, H., ... Hochedlinger, K. (2015). A comparison of genetically matched cell lines reveals the equivalence of human iPSCs and ESCs. *Nature Biotechnology*, *33*(11), 1173–1181. <https://doi.org/10.1038/nbt.3388>
- Dauer, W., & 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)
- Decressac, M., Kadkhodaei, B., Mattsson, B., Laguna, A., Perlmann, T., & Bjorklund, A. (2012). -Synuclein-Induced Down-Regulation of Nurr1 Disrupts GDNF Signaling in Nigral Dopamine Neurons. *Science Translational Medicine*, *4*(163), 163ra156-163ra156. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3004676>
- Devi, L., Raghavendran, V., Prabhu, B. M., Avadhani, N. G., & Anandatheerthavarada, H. K. (2008). Mitochondrial import and accumulation of  $\alpha$ -synuclein impair complex I in human dopaminergic neuronal cultures and Parkinson disease brain. *Journal of Biological Chemistry*, *283*(14), 9089–9100. <https://doi.org/10.1074/jbc.M710012200>
- Dickson, D. W. (2012). Parkinson's Disease and Parkinsonism: Neuropathology. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, *2*(8), a009258–a009258. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a009258>
- Dorsey, E. R., Sherer, T., Okun, M. S., & Bloem, B. R. (2018). The emerging evidence of the Parkinson pandemic. *Journal of Parkinson's Disease*. IOS Press.

<https://doi.org/10.3233/JPD-181474>

- Dunning, C. J. R., Reyes, J. F., Steiner, J. A., & Brundin, P. (2012). Can Parkinson's disease pathology be propagated from one neuron to another? *Progress in Neurobiology*, *97*(2), 205–219. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2011.11.003>
- Ellis, J. M., & Fell, M. J. (2017). Current approaches to the treatment of Parkinson's Disease. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, *27*(18), 4247–4255. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2017.07.075>
- Engelender, S., & Isacson, O. (2017). The Threshold Theory for Parkinson's Disease. *Trends in Neurosciences*, *40*(1), 4–14. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2016.10.008>
- Ferri, A. L. M., Lin, W., Mavromatakis, Y. E., Wang, J. C., Sasaki, H., Whitsett, J. A., & 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>
- 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), 7613–7618. <https://doi.org/10.1073/pnas.0902396106>
- Garcia-Montes, J.-R., Boronat-Garcia, A., Lopez-Colome, A.-M., Bargas, J., Guerra-Crespo, M., & Drucker-Colin, R. (2013). Is Nicotine Protective Against Parkinsons Disease? An Experimental Analysis. *CNS & Neurological Disorders - Drug Targets*, *11*(7), 897–906. <https://doi.org/10.2174/1871527311201070897>
- Gardner, R. C., Byers, A. L., Barnes, D. E., Li, Y., Boscardin, J., & Yaffe, K. (2018). Mild TBI and risk of Parkinson disease: A Chronic Effects of Neurotrauma Consortium Study. *Neurology*, *90*(20), e1771–e1779. <https://doi.org/10.1212/WNL.000000000000522>
- Guardia-Laguarta, C., Area-Gomez, E., Rub, C., Liu, Y., Magrane, J., Becker, D., ... Przedborski, S. (2014). -Synuclein Is Localized to Mitochondria-Associated ER Membranes. *Journal of Neuroscience*, *34*(1), 249–259. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2507-13.2014>
- Guerrero-Flores, G., & 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).
- Hashimoto, M., Hsu, L. J., Rockenstein, E., Takenouchi, T., Mallory, M., & Masliah, E. (2002).  $\alpha$ -synuclein protects against oxidative stress via inactivation of the c-Jun N-terminal kinase stress-signaling pathway in neuronal cells. *Journal of Biological Chemistry*, *277*(13), 11465–11472. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111428200>
- Hornykiewicz, O. (2006). The discovery of dopamine deficiency in the parkinsonian brain. *Journal of Neural Transmission. Supplementum*, (70), 9–15. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17017502>
- Hu, G., Antikainen, R., Jousilahti, P., Kivipelto, M., & Tuomilehto, J. (2008). Total cholesterol and the risk of Parkinson disease. *Neurology*, *70*(21), 1972–1979.

<https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000312511.62699.a8>

- 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>
- Iwai, A., Masliah, E., Yoshimoto, M., Ge, N., Flanagan, L., de Silva, H. A., ... Saitoh, T. (1995). The precursor protein of non-A beta component of Alzheimer's disease amyloid is a presynaptic protein of the central nervous system. *Neuron*, 14(2), 467–475. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7857654>
- Jankovic, J. (2008). Parkinson's disease: clinical features and diagnosis. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 79(4), 368–376. <https://doi.org/10.1136/jnnp.2007.131045>
- Jozefczuk, J., Drews, K., & 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>
- Kalia, L. V, & Lang, A. E. (2015). Parkinson's disease. *Lancet (London, England)*, 386(9996), 896–912. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)61393-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)61393-3)
- 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>
- Kim, S. Y., Kim, M. J., Jung, H., Kim, W. K., Kwon, S. O., Son, M. J., ... Bae, K. H. (2012). Comparative proteomic analysis of human somatic cells, induced pluripotent stem cells, and embryonic stem cells. *Stem Cells and Development*, 21(8), 1272–1286. <https://doi.org/10.1089/scd.2011.0243>
- Kirkeby, A., Nelander, J., & 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>
- Klein, C., & Westenberger, A. (2012). Genetics of Parkinson's Disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2(1), a008888–a008888. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a008888>
- Koch, J. C., Bitow, F., Haack, J., d'Hedouville, Z., Zhang, J.-N., Tönges, L., ... Lingor, P. (2015). Alpha-Synuclein affects neurite morphology, autophagy, vesicle transport and axonal degeneration in CNS neurons. *Cell Death & Disease*, 6(7), e1811–e1811. <https://doi.org/10.1038/cddis.2015.169>
- Koch, P., Opitz, T., Steinbeck, J. A., Ladewig, J., & 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>
- Lebouvier, T., Chaumette, T., Paillusson, S., Duyckaerts, C., Bruley des Varannes, S., Neunlist, M., & Derkinderen, P. (2009). The second brain and Parkinson's disease.

- European Journal of Neuroscience*, 30(5), 735–741. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2009.06873.x>
- Lee, A., & Gilbert, R. M. (2016). Epidemiology of Parkinson Disease. *Neurologic Clinics*, 34(4), 955–965. <https://doi.org/10.1016/j.ncl.2016.06.012>
- Lee, H.-J., Patel, S., & Lee, S.-J. (2005). Intravesicular Localization and Exocytosis of  $\alpha$ -Synuclein and its Aggregates. *Journal of Neuroscience*, 25(25), 6016–6024. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0692-05.2005>
- Lee, He-Jin, Suk, J.-E., Bae, E.-J., Lee, J.-H., Paik, S. R., & Lee, S.-J. (2008). Assembly-dependent endocytosis and clearance of extracellular  $\alpha$ -synuclein. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 40(9), 1835–1849. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2008.01.017>
- Liyang, G., Abdullah, S., Rosli, R., & Nordin, N. (2014). Neural commitment of embryonic stem cells through the formation of embryoid bodies (EBs). *Malaysian Journal of Medical Sciences*, 21(5), 8–16.
- Luth, E. S., Stavrovskaya, I. G., Bartels, T., Kristal, B. S., & Selkoe, D. J. (2014). Soluble, Prefibrillar  $\alpha$ -Synuclein Oligomers Promote Complex I-dependent,  $\text{Ca}^{2+}$ -induced Mitochondrial Dysfunction. *Journal of Biological Chemistry*, 289(31), 21490–21507. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.545749>
- 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>
- Mallon, B. S., Hamilton, R. S., Kozhich, O. A., Johnson, K. R., Fann, Y. C., Rao, M. S., & Robey, P. G. (2014). Comparison of the molecular profiles of human embryonic and induced pluripotent stem cells of isogenic origin. *Stem Cell Research*, 12(2), 376–386. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2013.11.010>
- Marei, H. E., Althani, A., Lashen, S., Cenciarelli, C., & Hasan, A. (2017). Genetically unmatched human iPSC and ESC exhibit equivalent gene expression and neuronal differentiation potential. *Scientific Reports*, 7(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-17882-1>
- 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>
- Martinat, C., Bacci, J.-J., Leete, T., Kim, J., Vanti, W. B., Newman, A. H., ... Abeliovich, A. (2006). Cooperative transcription activation by Nurr1 and Pitx3 induces embryonic stem cell maturation to the midbrain dopamine neuron phenotype. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(8), 2874–2879. <https://doi.org/10.1073/pnas.0511153103>
- Matise, M. P., Epstein, D. J., Park, H. L., Platt, K. A., & 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., & 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>
- Morrison, S. J., Shah, N. M., & Anderson, D. J. (1997). Regulatory mechanisms in stem cell biology. *Cell*, *88*(3), 287–298. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9039255>
- Mullin, S., & Schapira, A. (2013).  $\alpha$ -Synuclein and Mitochondrial Dysfunction in Parkinson's Disease. *Molecular Neurobiology*, *47*(2), 587–597. <https://doi.org/10.1007/s12035-013-8394-x>
- Nakai, M., Fujita, M., Waragai, M., Sugama, S., Wei, J., Akatsu, H., ... Hashimoto, M. (2007). Expression of  $\alpha$ -synuclein, a presynaptic protein implicated in Parkinson's disease, in erythropoietic lineage. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *358*(1), 104–110. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.04.108>
- Nalls, M. A., Pankratz, N., Lill, C. M., Do, C. B., Hernandez, D. G., Saad, M., ... Singleton, A. B. (2014). Large-scale meta-analysis of genome-wide association data identifies six new risk loci for Parkinson's disease. *Nature Genetics*, *46*(9), 989–993. <https://doi.org/10.1038/ng.3043>
- Noyce, A. J., Bestwick, J. P., Silveira-Moriyama, L., Hawkes, C. H., Giovannoni, G., Lees, A. J., & Schrag, A. (2012). Meta-analysis of early nonmotor features and risk factors for Parkinson disease. *Annals of Neurology*, *72*(6), 893–901. <https://doi.org/10.1002/ana.23687>
- Oliveira, L. M. A., Falomir-Lockhart, L. J., Botelho, M. G., Lin, K. H., Wales, P., Koch, J. C., ... Jovin, T. M. (2015). Elevated  $\alpha$ -synuclein caused by SNCA gene triplication impairs neuronal differentiation and maturation in Parkinson's patient-derived induced pluripotent stem cells. *Cell Death and Disease*, *6*(11), 1–13. <https://doi.org/10.1038/cddis.2015.318>
- Olsen, J. H., Friis, S., & Frederiksen, K. (2006). Malignant Melanoma and Other Types of Cancer Preceding Parkinson Disease. *Epidemiology*, *17*(5), 582–587. <https://doi.org/10.1097/01.ede.0000229445.90471.5e>
- Omodei, D., Acampora, D., Mancuso, P., Prakash, N., Di Giovannantonio, L. G., Wurst, W., & 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>
- Paxinos, G. (2004). *The rat brain in stereotaxic coordinates / (5°)*.
- Pfeiffer, R. F., Petrucci, S., Arena, G., & Valente, E. M. (2015). Parkinson disease. *Movement Disorders*, 229–276.

- 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>
- Pringsheim, T., Jette, N., Frolkis, A., & Steeves, T. D. L. (2014). The prevalence of Parkinson's disease: A systematic review and meta-analysis. *Movement Disorders*, 29(13), 1583–1590. <https://doi.org/10.1002/mds.25945>
- Ramos-Acevedo, R. (2018). *Análisis de marcadores dopaminérgicos en células troncales embrionarias humanas que sobre expresan *lmx1a*, *otx2* y *foxa2* en un modelo de parkinson*. UNAM.
- Ramos-Acevedo, R., Bernal-Conde, L. D., & Guerra-Crespo, M. (n.d.). La enfermedad de Parkinson y los avances en el estudio de esta sinucleopatía a través de células troncales pluripotentes inducidas humanas. In *Estudio de sinucleopatias en México*.
- Rathjen, J., & 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)
- Reeve, A. K., Ludtmann, M. H., Angelova, P. R., Simcox, E. M., Horrocks, M. H., Klenerman, D., ... Abramov, A. Y. (2015). Aggregated  $\alpha$ -synuclein and complex I deficiency: exploration of their relationship in differentiated neurons. *Cell Death & Disease*, 6(7), e1820–e1820. <https://doi.org/10.1038/cddis.2015.166>
- Reeve, A., Simcox, E., & Turnbull, D. (2014). Ageing and Parkinson's disease: Why is advancing age the biggest risk factor? *Ageing Research Reviews*, 14, 19–30. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2014.01.004>
- 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>
- Sathananthan, A. H. (2011). Neural Stem Cells in Neurospheres , Embryoid Bodies , and Central Nervous System of Human Embryos, (July 2011), 520–527. <https://doi.org/10.1017/S1431927611000584>
- Satomi, K., Morishita, Y., Sakashita, S., Kondou, Y., Furuya, S., Minami, 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), 4013–4018. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.7.4013>

- Scheckel, C., & Aguzzi, A. (2018). Prions, prionoids and protein misfolding disorders. *Nature Reviews Genetics*, *19*(7), 405–418. <https://doi.org/10.1038/s41576-018-0011-4>
- Simón-Sánchez, J., Schulte, C., Bras, J. M., Sharma, M., Gibbs, J. R., Berg, D., ... Gasser, T. (2009). Genome-wide association study reveals genetic risk underlying Parkinson's disease. *Nature Genetics*, *41*(12), 1308–1312. <https://doi.org/10.1038/ng.487>
- Smith, Y., & Kieval, J. Z. (2000). Anatomy of the dopamine system in the basal ganglia. *Trends in Neurosciences*, *23*(10 Suppl), S28-33. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11052217>
- Spillantini, M. G., Schmidt, M. L., Lee, V. M.-Y., Trojanowski, J. Q., Jakes, R., & Goedert, M. (1997).  $\alpha$ -Synuclein in Lewy bodies. *Nature*, *388*, 839. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1038/42166>
- Spinelli, K. J., Taylor, J. K., Osterberg, V. R., Churchill, M. J., Pollock, E., Moore, C., ... Unni, V. K. (2014). Presynaptic Alpha-Synuclein Aggregation in a Mouse Model of Parkinson's Disease. *Journal of Neuroscience*, *34*(6), 2037–2050. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2581-13.2014>
- Suda, T., Suda, J., & Ogawa, M. (1984). Disparate differentiation in mouse hemopoietic colonies derived from paired progenitors. *PNAS*.
- Sugeno, N., Jäckel, S., Voigt, A., Wassouf, Z., Schulze-Hentrich, J., & Kahle, P. J. (2016).  $\alpha$ -Synuclein enhances histone H3 lysine-9 dimethylation and H3K9me2-dependent transcriptional responses. *Scientific Reports*, *6*(November), 1–11. <https://doi.org/10.1038/srep36328>
- Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., & Yamanaka, S. (2007). Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell*, *131*(5), 861–872. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.11.019>
- Takahashi, K., & Yamanaka, S. (2006). Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell*, *126*(4), 663–676. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.07.024>
- Thomson, J. A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S. S., Waknitz, A. A., Swiergiel, J. J., Marshall, V. S., & Jones, J. M. (1998). Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts. *Science*, *282*(November), 1145–1147.
- Tomov, M. L., Olmsted, Z. T., & Paluh, J. L. (2015). The Human Embryoid Body Cystic Core Exhibits Architectural Complexity Revealed by use of High Throughput Polymer Microarrays. *Macromolecular Bioscience*, *15*(7), 892–900. <https://doi.org/10.1002/mabi.201500051>
- Vasquez, V., Mitra, J., Hegde, P. M., Pandey, A., Sengupta, S., Mitra, S., ... Hegde, M. L. (2017). Chromatin-Bound Oxidized  $\alpha$ -Synuclein Causes Strand Breaks in Neuronal Genomes in in vitro Models of Parkinson's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, *60*(s1), S133–S150. <https://doi.org/10.3233/JAD-170342>
- Walker, D. G., Lue, L.-F., Adler, C. H., Shill, H. A., Caviness, J. N., Sabbagh, M. N., ... Arizona Parkinson Disease Consortium. (2013). Changes in properties of serine 129

- phosphorylated  $\alpha$ -synuclein with progression of Lewy-type histopathology in human brains. *Experimental Neurology*, 240, 190–204.  
<https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2012.11.020>
- Wang, G. Z., & Goff, S. P. (2017). Transcriptional Silencing of Moloney Murine Leukemia Virus in Human Embryonic Carcinoma Cells. *Journal of Virology*, 91(1).  
<https://doi.org/10.1128/JVI.02075-16>
- Wurst, W., & Bally-Cuif, L. (2001). Neural plate patterning: upstream and downstream of the isthmic organizer. *Nature Reviews Neuroscience*, 2, 99–108.
- Xilouri, M., Brekk, O. R., & Stefanis, L. (2016a). Autophagy and Alpha-Synuclein: Relevance to Parkinson's Disease and Related Synucleopathies. *Movement Disorders*, 31(2), 178–192. <https://doi.org/10.1002/mds.26477>
- Xilouri, M., Brekk, O. R., & Stefanis, L. (2016b). Autophagy and Alpha-Synuclein: Relevance to Parkinson's Disease and Related Synucleopathies. *Movement Disorders*, 31(2), 178–192. <https://doi.org/10.1002/mds.26477>
- Xu, W., Tan, L., & Yu, J. T. (2015). The link between the SNCA gene and parkinsonism. *Neurobiology of Aging*, 36(3), 1505–1518.  
<https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2014.10.042>
- Zafar, F., Valappil, R. A., Kim, S., Johansen, K. K., Chang, A. L. S., Tetrud, J. W., ... Schüle, B. (2018). Genetic fine-mapping of the lowan SNCA gene triplication in a patient with Parkinson's disease. *NPJ Parkinson's Disease*, 4(1), 18.  
<https://doi.org/10.1038/s41531-018-0054-4>
- Zhao, M.-T., Chen, H., Liu, Q., Shao, N.-Y., Sayed, N., Wo, H.-T., ... Wu, J. C. (2017). Molecular and functional resemblance of differentiated cells derived from isogenic human iPSCs and SCNT-derived ESCs. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(52), E11111–E11120. <https://doi.org/10.1073/pnas.1708991114>
- Zhao, Q., Zhang, J., Chen, R., Wang, L., Li, B., Cheng, H., ... Wong, J. (2016). Dissecting the precise role of H3K9 methylation in crosstalk with DNA maintenance methylation in mammals. *Nature Communications*, 7(1), 12464.  
<https://doi.org/10.1038/ncomms12464>
- 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>